



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO**

---

**INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN**

**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE LA PARAOXONASA 1  
(PON1) DE HÍGADO EN RATAS WISTAR DIABETIZADAS Y  
ALIMENTADAS CON DIFERENTES DIETAS.**

**T E S I S**

Que para obtener el título de  
Licenciada(o) en Nutrición

**P R E S E N T A**

**BELEN VALADEZ HERNÁNDEZ**

Director de tesis:

**DR. GABRIEL BETANZOS CABRERA**

**PACHUCA, HGO., MAYO 2010.**



## **Agradecimiento.**

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Nutrición Molecular del Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, bajo la dirección del Dr. Gabriel Betanzos Cabrera. Proyecto parcialmente financiado por el CONACYT (46537), PAI 2006 y AMMFEN.

## **Agradecimiento.**

*A Dios, mi familia y a todas aquellas personas que me apoyaron durante ésta travesía, así como al Dr. Gabriel Betanzos Cabrera por su valioso tiempo y dedicación. Ya que sin su valioso apoyo de todos ellos no hubiera sido posible éste logro en mi vida personal.*

## INDICE

	Pág.
ÍNDICE.	I
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.	III
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.	V
RESUMEN.	VI
ABSTRACT.	VII
1. MARCO TEORICO.	1
1.1 Epidemiología de diabetes mellitus.	1
1.1.1 Definición	1
1.1.1.2 Clasificación etiológica de la diabetes mellitus.	1
1.1.2 Diabetes tipo 1.	2
1.1.3 Diabetes tipo 2.	3
1.1.4 Diabetes gestacional (DG).	4
1.1.5 Otros tipos de DM.	4
1.1.6 Diagnóstico de DM	5
1.1.6.1 Tamizaje de DM.	6
1.1.6.2 Prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG).	7
1.1.6.2.1 Condiciones para efectuar la (PTOG).	7
1.1.6.2.2 Clasificación de la PTOG.	7
1.1.7 Detección y diagnóstico de la DMG.	8
1.1.8 Prediabetes.	9
1.1.9 Obesidad y su relación con diabetes mellitus tipo 2 (DT2).	9
1.1.10 Síndrome metabólico.	11
1.1.11 Enfermedad de hígado graso y síndrome metabólico.	12
1.2. Anatomía del hígado.	13
1.2.1 Función Hepática.	13
1.2.2 Metabolismo de lipoproteínas.	13
1.2.3 Metabolismo de proteínas.	14
1.3 Paraoxonasa.	16
1.3.1 Definición.	16
1.3.2 Propiedades y características de la PON1.	18
1.3.3 Actividad destoxicante y antioxidante de la PON1.	18
1.3.4 Actividad sérica de la PON1 en daño hepático crónico	21
1.3.5 Alimentación y su relación con actividad enzimática de la PON1.	23
2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	25
3. JUSTIFICACIÓN.	26
4. OBJETIVO GENERAL.	27
4.1 Objetivos Específicos.	27
5. HIPÓTESIS.	27
6. MATERIALES Y METODOS.	28
6.1 Animales y dietas.	29
6.2 Inducción de Diabetes Mellitus utilizando Estreptozotocina.	29
6.3 Sacrificio mensual de ratas Wistar utilizando una guillotina.	29

6.4	Extracción del hígado.	29
6.5	Medición de la actividad Enzimática de la PON1 en hígado de ratas Wistar.	30
6.6	Análisis estadístico	31
7.	RESULTADOS	31
7.1	Actividad enzimática PON1 de hígado de ratas Wistar en diferentes grupos.	31
7.2	Peso del hígado de ratas en los diferentes tratamientos.	34
8.	DISCUSION.	37
9.	CONCLUSIONES.	40
10.	BIBLIOGRAFIA.	41

## ÍNDICE DE FIGURAS.

		Pág.
Figura 1.	Figura 1. Fisiopatología de la DT2.	4
Figura 2.	Figura 2. Esquema general del metabolismo de las lipoproteínas.	16
Figura 3.	Figura 3. Modelo de oxidación de las LDL por las células de la pared aórtica.	19
Figura 4.	Figura 4. Diagrama experimental.	28
Figura 5.	Figura 5. Comparación de la Actividad PON1 del grupo STZ y grupo control.	31
Figura 6.	Figura 6. Comparación de la Actividad PON1 del grupo STZ+OB y grupo control.	32
Figura 7.	Figura 7. Comparación de la Actividad PON1 del grupo OB y grupo control.	33
Figura 8.	Figura 8. Comparación de la Actividad PON1 del grupo Bajo en proteínas y grupo control.	34
Figura 9.	Figura 9. Comparación del peso Hepático entre el grupo STZ+OB, OB y control.	35
Figura 10.	Figura 10. Comparación del peso Hepático entre el grupo Bajo en Proteínas y control.	36
Figura 11.	Figura 11. Correlación entre la actividad PON1 y peso hepático del Grupo sometido a una dieta baja en proteínas y el grupo Control.	37

## INDICE DE TABLAS.

		Pág.
Tabla 1.	Clasificación etiológica de la DM.	2
Tabla 2.	Causas de diabetes	5
Tabla 3.	Recomendaciones de la ADA para el diagnóstico de DM.	6
Tabla 4.	Criterios diagnósticos DMG.	8
Tabla 5.	Alteraciones del metabolismo de glucosa.	9
Tabla 6.	Definiciones de Obesidad según índice de masa corporal (IMC).	10
Tabla 7.	Principales características funcionales de PON1, PON2 y PON3.	17

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

PON1	Paraoxonasa 1
DT2	Diabetes tipo 2
DMG	Diabetes Gestacional
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
IDL	Lipoproteínas de densidad intermedia
TG	Triglicéridos
EVC	Enfermedades cardiovasculares
OMS	Organización Mundial de la Salud
ADA	American diabetes association
IG	Intolerancia a la Glucosa
GAA	Glucosa Anormal en Ayuno
IMC	Indice de Masa Corporal
POTG	Prueba oral de tolerancia a la glucosa
SM	Síndrome metabólico
EHNA	Enfermedad de hígado graso no alcohólico
A1C	Hemoglobina glucosilada
RI	Resistencia a la insulina
EGIR	European Group for Study of Insulin Resistance
NCEP	National Colesterol Education Programme Adult Treatment Expert Panel III
AACE	American Association of Clínical Endocrinologists

## RESUMEN

La paraoxonasa/arilesterasa (PON-1) (EC 3.1.1.2) es una glicoproteína dependiente del calcio que se encuentra unida a las lipoproteínas de alta densidad (HDL). PON1 hidroliza los lípidos oxidados en las lipoproteínas de baja densidad (LDL) por lo tanto puede retardar el desarrollo de aterosclerosis. Se ha encontrado que la actividad PON1 está disminuida en pacientes con diabetes y que ciertos nutrimentos principalmente algunos ácidos grasos modulan su actividad. En este trabajo, se evaluó el efecto de diferentes tipos de dieta sobre la actividad de la PON1 en fracciones microsomales de hígado de rata. 150 ratas wistar macho, fueron divididas en 5 grupos como sigue: 1) control (C), 2) diabéticas inducidas con estreptozotocina, estos 2 grupos fueron alimentadas con alimento comercial para roedores (Harlan Teklad, 18% proteína); 3) obeso (OB) y 4) diabético-obeso, estos 2 alimentados con alimentos obesigénicos tales como mantequilla, manteca de cerdo entre otros, y 5) bajo en proteínas (6%). Los animales fueron sacrificados para extraer el hígado donde se obtuvieron fracciones microsomales y donde se midió posteriormente la actividad de la enzima por un método semiautomatizado, empleando como sustrato paraoxón. El grupo de ratas alimentadas con bajo contenido proteico, fue el grupo que dio los valores más significativos, en este grupo, siempre la actividad de la PON1 fue menor en todos los meses con un valor de  $p=0.003$  incluso por debajo de los animales diabetizados. Asimismo, se encontró correlación significativa ( $p=0.001$ ) entre la actividad PON1 y peso del hígado en este grupo. Nuestros resultados demuestran que las dietas empleadas influyeron en la actividad de la PON1, y que una dieta baja en proteínas afectó drásticamente la actividad como el peso del hígado. Aunque la PON1 se ha relacionado con el metabolismo de lípidos, sin embargo, una ingesta de baja en proteínas provoca un desorden metabólico que afecta más severamente a la actividad de la PON1. En general, los resultados apoyan la idea que los nutrimentos pueden modular la actividad de la PON1.

Palabras clave: actividad de la PON1, diabetes, fracciones microsomales, dieta, aterosclerosis.

## ABSTRACT

Paraoxnase/arylesterase (PON1) (EC 3.1.1.2) is a glycoprotein calcium-dependent associated to high density lipoproteins (HDL). Pon1 hydrolyzes oxidized lipids from low density lipoproteins therefore the development of atherosclerosis can be inhibited. It has been found that PON1 activity is decreased in patients with diabetes and some nutrients as fatty acids modulate its activity. In this work, the effect of different types of diet on PON1 activity in microsomal fractions of rat liver was evaluated. One hundred Fifty male rats Wistar, were divided in 5 five groups as follows: 1) control (C); 2) streptozotocin-induced diabetic (STZ), these two fed with commercial food for rodents (Harlan Teklad, 18% protein); 3) obese (OB) and 4) diabetic-obese (STZ-OB) these two fed with obesigenic foods such butter, lard and others., and 5) low in proteins (6%). The animals were sacrificed to obtain liver and later microsomal fractions were obtained where PON1 activity was measured by using a semiatumated method employing paraoxon as substrate. The group fed with low proteins content was the group that gave the most significant values, particularly in this group, the PON1 activity was smaller throughout all experiment ( $p=0.003$ ) even under the diabetized group. Likewise, significant correlation was found between PON1 activity and liver weight ( $p=001$ ). Our results, demonstrate that employed diets influenced in PON1 activity and a low proteins diet affect drastically the activity and liver weight. Although PON1 has been related to lipids metabolism, however, uptake of low proteins content causes a metabolic disorder that affects severally PON1 activity. Overall, the results support the idea that nutrients can modulate PON1 activity.

Key words: PON1 activity, diabetes, microsomal fractions, diet, atherosclerosis.

## **1. MARCO TEORICO**

### **1.1 Epidemiología de diabetes mellitus**

La diabetes mellitus (DM) afecta actualmente a más de 246 millones de personas en el mundo y se espera que alcance 333 millones en 2025, el 30% de la población es portadora de DM y no lo sabe. La mayoría de los casos se presentan en países en vías de desarrollo (King y Hernán, 1998; Inzucchi y Sherwin, 2005). La población en México de personas con DM oscila entre los 6.5 y los 10 millones (prevalencia nacional de 10.7% en personas entre 20 y 69 años). México ocupa el noveno lugar de DM en el mundo. No ha cambiado hasta 2007 según datos de la International diabetes federation IDF; 13 de cada 100 muertes en México son provocadas por la DM (Federación Mexicana de Diabetes, 2009).

#### **1.1.1 Definición**

La (DM) es un grupo de enfermedades del metabolismo caracterizadas por hiperglucemia, como resultado de defectos en la secreción de la insulina o en las acciones de la insulina, solas o combinadas. La hiperglucemia crónica ocasionada por DM se relaciona con trastornos funcionales, estructurales y falla de diversos órganos, principalmente ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos (The expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus, 2003). La DM se puede asociar a diversas complicaciones, que pueden ser agudas (metabólicas o infecciosas) o crónicas y éstas a su vez pueden ser micro o macrovasculares (American diabetes association "ADA", 2009).

#### **1.1.1.2 Clasificación etiológica de la diabetes mellitus**

Los cambios generados por el comité de expertos, fueron dirigidos para poder diferenciar entre formas de diabetes que parecen fenotípicamente similares pero que pueden tener etiologías distintas (Alberti y Zimmet, 1998).

Los criterios de clasificación de la diabetes fueron desarrollados por un grupo de expertos de la asociación americana de diabetes (ADA) y recomendados por la Organización mundial de la salud (OMS) (ADA, 2009) (Tabla 1).

Además, existen dos categorías denominadas como prediabetes: las cuales son glucemia en ayuno alterada (GAA) y/o intolerancia a la glucosa (ITG). Estas categorías no son entidades clínicas, sino factores de riesgo para desarrollar diabetes y enfermedades cardiovasculares (ECV) (The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes mellitus, 2003).

**Tabla 1. Clasificación etiológica de la DM**

<b>a) Diabetes tipo 1 (destrucción de células beta)</b> 1) Mediada por inmunidad 2) Ideopática
<b>b) Diabetes tipo 2 (con variantes de acuerdo con la secreción y acción de la insulina, así como el índice de masa corporal del paciente.</b>
<b>c) Otros defectos específicos.</b>
<b>d) Diabetes gestacional.</b>

Fuente. Casanueva *et al* 2001.

### 1.1.2 Diabetes tipo 1 (DT1)

Se caracteriza por la deficiencia absoluta de insulina, en el 90% de los casos debido a un proceso de destrucción autoinmune de las células  $\beta$  del páncreas, producción insuficiente o nula (López y Almudena, 2003); aunque hay formas idiopáticas en las que no es posible demostrar autoinmunidad y presenta como marcadores múltiples anticuerpos (Devendra *et al*, 2004).

La etiología de la destrucción de las células  $\beta$  es generalmente autoinmune pero existen casos de DT1 de origen idiopático, donde la medición de anticuerpos conocidos da resultados negativos. Por lo tanto, cuando es posible medir anticuerpos tales como anti GAD65, anticélulas de islotes (ICA), antitirosina fosfatasa (IA-2) y

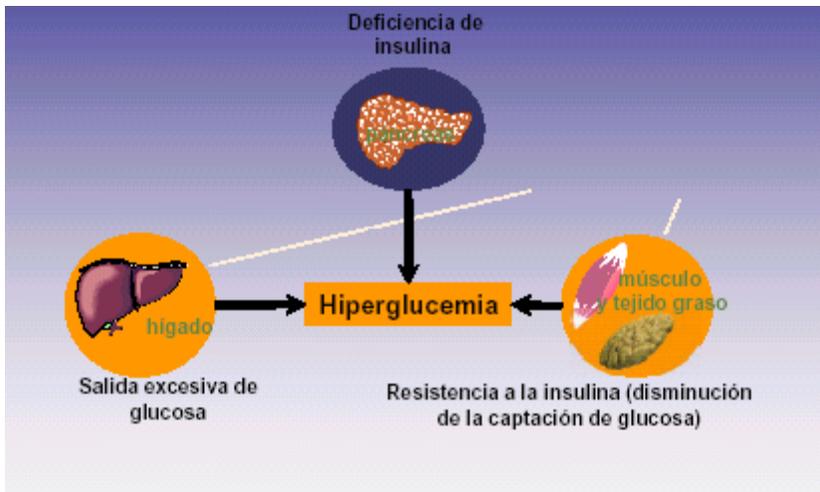
antiinsulina (Lu *et al*, 1996); su detección permite subdividir la DT1 en: Autoinmune e idiopática.

Se produce destrucción progresiva por apoptosis de las células  $\beta$ , con manifestaciones clínicas cuando se ha perdido aproximadamente un 50% de la masa total; la enfermedad evoluciona hacia la pérdida total de los islotes y el déficit completo de insulina (Mauricio y Mandrup, 1998). La enfermedad se presenta habitualmente en la infancia o la adolescencia, pero hay formas tardías con inicio en la edad media de la vida (LADA) (Pozzoli y Di, 2001).

### **1.1.3 Diabetes tipo 2 (DT2)**

La DT2 afecta a más del 90% de los adultos con DM, se desarrolla típicamente en la edad adulta. Está causada por la disminución de secreción de insulina y una disminución de la sensibilidad a esta. Se presenta en personas con grados variables de resistencia a la insulina (RI) pero se requiere también que exista una deficiencia en la producción de insulina que puede o no ser predominante (Figura 1). Ambos fenómenos están presentes en algún momento para que se eleve la glucemia (Inzucchi y Sherwin, 2008).

Aunque no existen marcadores clínicos que indiquen con precisión cual de los dos defectos primarios predomina en cada paciente, el exceso de peso sugiere la presencia de resistencia a la insulina mientras que la pérdida de peso sugiere una reducción progresiva en la producción de la hormona. La resistencia a la insulina, es pues, un aspecto crítico en el desarrollo de DT2. Esta situación aparece cuando los efectos biológicos son menores de lo esperado, en cuanto a la captación de glucosa por el músculo estriado y su producción hepática endógena (Gerich, 1998; De la Calle, 2005).



**Figura 1.** Fisiopatología de la DT2. El exceso de peso produce una resistencia a la acción de la insulina y da lugar a alteraciones en el hígado, páncreas y músculo. En la DT2, la falta de insulina impide la entrada de glucosa en la célula provocando que la glucosa no entre y no se convierta en energía. Buchanan TA Clin Ther 2003; 25(suppl B):B32-46.

#### 1.1.4 Diabetes gestacional (DG)

Esta se define como una alteración del metabolismo de los carbohidratos, de severidad variable, que se inicia o se reconoce por primera vez durante el embarazo. La DMG es una forma de ITG que se diagnostica en algunas mujeres durante el embarazo, también es más común en mujeres obesas y en mujeres con antecedentes familiares de DM (García, 2008).

#### 1.1.5 Otros tipos de diabetes.

El tercer grupo lo conforma un número considerable de patologías específicas donde se incluyen los casos cuyo defecto básico es conocido y puede ser identificado. (Genuth *et al*, 2003). (Tabla 2)

**Tabla 2. Causas de diabetes**

<b>Defectos genéticos de la función de la célula <math>\beta</math></b>	Defectos del cromosoma 20, HNF-4 $\alpha$ (antes MODY 1), del cromosoma 7, glucoquinasa (antes MODY 2) del cromosoma 12, HNF-1 $\alpha$ (antes MODY 3), del DNA mitocondrial y otros.
<b>Defectos genéticos en la acción de la insulina.</b>	Resistencia a la insulina tipo A, leprechaurismo, síndrome de Rabson-Mendernhall, diabetes lipoatrófica y otros.
<b>Enfermedades del páncreas exocrino.</b>	Pancreatitis, trauma del páncreas, pancreatectomía, neoplasia del páncreas, fibrosis quística, homocromatosis, pancreatopatía fibrocalculosa y otros.
<b>Endocrinopatías.</b>	Acromegalía, síndrome de Cushing, glucagenoma, feocromocitoma, hipertiroidismo, somatostinoma, aldosteronoma y otros.
<b>Inducida por drogas o químicos.</b>	Vacor, pentamidina, ácido nicotínico, glucocorticoides, hormonas tiroideas, diazóxido, agonistas betaadrenérgicos, tiazidas, fenitoína, $\alpha$ -interferón y otros.
<b>Infecciones.</b>	Rubéola congénica, citomegalovirus y otros.
<b>Formas poco comunes de diabetes mediada inmunológicamente.</b>	Síndrome de “hombre rígido”(stiff-man síndrome), anticuerpos contra el receptor de la insulina y otros.
<b>Otros síndromes genéticos algunas veces asociados con diabetes.</b>	Síndrome de Down, síndrome de Klinefelter, síndrome de Turner, síndrome de Wolfram. Ataxia de Friedreich, corea de Huntington, síndrome de Lawrence Moon Berdel, distrofia miotónica, porfiria, síndrome de Prader Will y otros.

Fuente: Organización Panamericana de la Salud. 2010 “Guías ALAD de diagnóstico, control y tratamiento de la DT2”.

### 1.1.6 Diagnóstico de diabetes

El descubrimiento temprano y tratamiento oportuno de DM son críticos para prevenir las complicaciones agudas y crónicas de la enfermedad. Los individuos con los

síntomas sugestivos de hiperglucemia deben someterse a diagnóstico rápidamente, como son los individuos con factores de riesgo para DM.

En 1997 de junio, la ADA anunció las nuevas recomendaciones para el diagnóstico de diabetes, y en el 2003 estas pautas se actualizaron respecto al diagnóstico de glucosa en ayuno dañada (IFG) y GAA. Las nuevas pautas que disminuyeron los valores de punto de corte en las concentraciones de glucosa en ayunas que diagnostican la DM como se muestra en la tabla 3.

### 1.1.6.1 Tamizaje de DM

La ADA justifica el cribado sólo en personas mayores de 45 años con factores de riesgo, tales como: sobrepeso; índice de masa corporal (IMC>27), hipertenso con otro factor de riesgo asociado, triglicéridos mayores de 150 mg/dl con lipoproteínas de alta densidad (HDL) menor de 35 mg/dl, antecedentes obstétricas DMG y/o hijos macrosómicos.

**Tabla 3. Recomendaciones de la ADA para el diagnóstico de DM.**

Sintomatología clínica	Pruebas de diagnóstico
a) Poliuria	a) Glucosa plasmática casual $\geq$ 200 mg/dl equivalente a 11.1 mmol/l.
b) Polifagia	b) Glucosa plasmática en ayuno (FPG) $>$ 126 mg/dl (7.00 mmol/l).
c) Polidipsia	c) Glucemia $>$ 200 mg/ dl (11.1 mmol/l) durante una prueba oral de tolerancia a la glucosa (OGTT).
d) Pérdida de peso	d) A1C (hemoglobina glucosilada) $\geq$ a 6,5% (en laboratorios con métodos estandarizados).
e) Visión borrosa	

Fuente: Diabetes Care. ADA 2010.

Si cualquiera de estos resultados de la prueba ocurre, deben repetirse en un día diferente para confirmar el diagnóstico ó ausencia de hiperglucemia inequívoca con descompensación metabólica aguda (The expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus, 2003).

#### **1.1.6.2 Prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG)**

Consiste en la medición de la glucemia dos horas después de dar una carga oral de 75 g de glucosa es más sensible y más específica . Se ha utilizado como parámetro de resistencia a la insulina. (Laakso, 1993; Komshian *et al.* 2000).

##### **1.1.6.2.1 Condiciones para efectuar la (PTOG)**

Ayuno de ocho a 14 horas (se puede tomar agua).

Evitar restricciones en la dieta durante los tres días precedentes (consumo mínimo de 150 gramos de hidratos de carbono al día).

En niños la PTOG rara vez se utiliza, pero cuando se requiere la carga de glucosa se calcula con base en 1.75/Kg de peso sin exceder 75 gr. en total.

##### **1.1.6.2.2 Clasificación de la PTOG**

1. Tolerancia normal a la glucosa: cuando a las 2 horas posteriores a la carga presenta glucemia < 140 mg/dl (7.8 mmol/l).
2. Intolerancia a la glucosa: cuando a las 2 horas posteriores a la carga presenta glucemia mayor o igual a 140 mg/dl (7.8 mmol/l) y menor a 200 mg/dl (11,1 mmol/l).
3. Diagnóstico de DM confirmado: cuando a las 2 horas posteriore a la carga presenta glucosa >200 mg/dl (11,1 mmol/l).

### 1.1.7 Detección y diagnóstico de la DMG

La valoración del riesgo de DMG debe hacerse en la primera visita del embarazo (Artola, *et al*, 2006), cuando las mujeres desarrollan DMG, la resistencia a la insulina es más acentuada, lo cuál modifica el medio intrauterino y causa crecimiento acelerado del feto, con riesgo elevado de macrosomía (García, 2008).

Los criterios de diagnóstico de la DMG es uno de los pocos aspectos en los que persiste diferencia entre los criterios de la OMS, los de la ADA y los grupos de expertos en el tema (OMS, 2005); la ADA mantiene los criterios de O'Sullivan y Mahan que se basan en una prueba de tamizaje una prueba confirmatoria con PTOG que debe realizarse siempre que la prueba de tamizaje resulte anormal (Langer *et al*, 2000), como se muestra en la siguiente tabla de criterios.

**Tabla 4. Criterios diagnósticos DMG.**

	Criterios de O'Sullivan y Mahan			Criterios de OMS	
	Tamizaje	Curva tolerancia a la glucosa (2).		Original	GTDE ALAD
		Original	4 taller		
Carga glucosa	50g	100g	100g	75g	75g
Glucemia ayunas	en	≥105	≥95	≥126 (3)	≥105
1 hora	≥140	≥190	≥180		
2 horas		≥165	≥155	≥140	≥140
3 horas		≥145	≥140		

Fuente. Nicholson *et al* 2009.

- 1) Sí el resultado de la pesquisa es anormal, se debe practicar una curva de tolerancia oral con 100 g de glucosa.
- 2) Con dos o más valores anormales se hace diagnóstico de DMG.
- 3) El significado de GAA (110-125 mg/dl) durante embarazo todavía no ha sido establecido. Toda mujer embarazada con GAA debe ser sometida a una carga de 75 g de glucosa.

### 1.1.8 Prediabetes

Estado de la glucosa de sangre elevada definida como tolerancia de glucosa dañada o la glucosa del ayuno dañada ó intolerancia a la glucosa (ITG) que se diagnóstica mediante una PTOG, ó a través de una glucemia de ayuno. Las personas con prediabetes tienen un riesgo del 1.5 veces más de Enfermedad cardiovascular comparado a las personas con la glucosa de sangre normal (Balkau *et al*, 2002).

Los criterios para las alteraciones del metabolismo de la glucosa establecidos por la OMS (The expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus, 2003) y la ADA (Genuth *et al*, 2003) aparecen detallados en la tabla 5.

**Tabla 5. Alteraciones del metabolismo de glucosa.**

Diagnóstico	Glucemia en ayunas		Glucemia PTOG	
	mg/dl	mmol/L	mg/dL	mmol/L
Regulación normal	<100	<5.6	<140	<7.8
Glucemia de ayuno alterada (GAA)	100-125	5.6-6.9	No aplica	
Intolerancia a la glucosa (ITG)	No aplica		140-199	7.8-11

Fuente. García, 2009.

### 1.1.9 Obesidad y su relación con DT2

La obesidad es una enfermedad crónica de etiología multifactorial que se desarrolla a partir de la interacción de la influencia de factores sociales, conductuales, psicológicos, metabólicos, celulares y moleculares. En términos generales, se define como el exceso de grasa en relación con el peso (World Health Organization, 1998).

La OMS menciona que, aunque los términos de sobrepeso y obesidad se usan recíprocamente, el sobrepeso se refiere a un exceso de peso corporal comparado con la talla, mientras que la obesidad se refiere a un exceso de grasa corporal. En poblaciones con un alto grado de adiposidad, el exceso de grasa corporal está

altamente correlacionado con el peso corporal. Por esta razón el IMC es una medición válida y conveniente de adiposidad. El IMC se calcula al dividir el peso en kilogramos sobre el cuadrado de la talla en metros (kg/m<sup>2</sup>). Un IMC mayor a 25 kg/m<sup>2</sup> se define como sobrepeso, y un índice de masa corporal mayor a 30 kg/m<sup>2</sup> como obesidad (Bray *et al*, 1997).

**Tabla 6. Definiciones de Obesidad según índice de masa corporal (IMC)**

<b>Categoría</b>	<b>Niños y Adolescentes</b>	<b>Adultos</b>	<b>Tipo de obesidad según IMC</b>
Peso escaso	< p5	<18.5	
Peso normal	p5-85	18.5-24.9	
Riesgo de sobrepeso	p85-90	-----	
Sobrepeso	>p95	25-29.9	Grado II (Preobesidad)
Obesidad grado 1	-----	30-34.9	Tipo I
Obesidad grado 2	-----	35-39.9	Tipo II
Obesidad mórbida	-----	40-49.9	Tipo III (Mórbida)
Obesidad supermórbida	-----	>50	Tipo IV (Extrema)

Fuente. Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (SEEDO), 2000.

Debido al aumento de la prevalencia de la obesidad en niños y adolescentes a nivel mundial en los últimos años, es de interés conocer y determinar la magnitud de esta patología mediante tablas de distribución del IMC por percentilas (p), como patrones de referencia tal y como se muestra en la (tabla 6).

Además que la obesidad favorece a alteraciones metabólicas tales como a RI e hiperglucemia ya que la sobreproducción hepática de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) parece ser el defecto principal y crucial del estado de resistencia a la insulina que acompaña a la obesidad y a la hiperinsulinemia. La incapacidad para

suprimir la producción hepática de glucosa, la incapacidad para adquirir glucosa por parte del músculo y la incapacidad de suprimir la liberación de ácidos grasos no esterificados del tejido adiposo son las consecuencias más importantes de la resistencia a la RI en el hígado, músculo y tejido adiposo, respectivamente. Estos eventos, dan origen al incremento de ácidos grasos no esterificados y al flujo de glucosa hacia el hígado, el cual es un regulador importante de la producción de las VLDL hepáticas (Nielsen *et al*, 2004).

Además, la RI de la obesidad se caracteriza por la disminución en la remoción de lípidos ricos en TG (Oria *et al*, 2002).

#### **1.1.10 Síndrome metabólico**

El síndrome metabólico (SM) corresponde a la asociación de una serie de anormalidades metabólicas que determinan un mayor riesgo de padecer ECV y DM en un individuo (Grundy, *et al*, 2005; Eckel, *et al*, 2005). Inicialmente, las definiciones de la OMS y el EGIR (European Group for Study of Insulin Resistance) fueron propuestas para fines científicos, mientras que las del NCEP (National Cholesterol Education Programme Adult Treatment Expert Panel III) y la AACE (American Association of Clinical Endocrinologists) lo fueron para uso clínico. La definición de la IDF de 2005 se elaboró para ser utilizada en la práctica clínica en todo el mundo (Balkau *et al* 2002).

Inicialmente se consideró al SM como la expresión fenotípica de la resistencia a la insulina (RI). Ésta corresponde a una respuesta subnormal del organismo a la acción insulínica en los tejidos periféricos. Secundario a la RI, las células  $\beta$  pancreáticas aumentan su secreción de insulina compensatoriamente, produciendo hiperinsulinemia, la cual se pensó era responsable de muchos de los fenómenos encontrados en el SM (Zick, 2001).

### **1.1.11 Enfermedad de hígado graso y síndrome metabólico**

En la fisiopatología del síndrome metabólico (SM), se vinculan alteraciones en el metabolismo glucolipídico, estados proinflamatorios y protrombóticos. El vínculo entre todas ellas se atribuye a la RI, favorecida por el aumento de ácidos grasos libres, muchas veces relacionado con el sobrepeso. Este estado provoca trastornos en la utilización de glucosa celular, así como alteraciones de su producción hepática. Últimamente se ha relacionado el SM y la RI con hígado graso (Bergua *et al*, 2005; Scott *et al.*, 2008). El estilo de vida sedentaria y cambios dietarios conducen a una ganancia de peso en países occidentales, subsecuentemente incrementa el riesgo para desarrollar Síndrome metabólico y enfermedad de hígado graso. Recientemente se ha encontrado una relación entre los componentes del síndrome metabólico con la progresión de hígado graso a esteatohepatitis (Camps y Joven, 2009).

La hiperinsulinemia y la RI juegan un papel en la patogénesis de hígado graso; ya que comúnmente existe obesidad. Aunque la IR se presenta aún en los pacientes no obesos. El aumento del flujo de ácidos grasos desde el tejido adiposo intraabdominal hacia el hígado y el aumento de la peroxidación mitocondrial, están relacionados con el aumento a la RI y con la esteatosis y progresión a cirrosis. Recientes estudios epidemiológicos sugieren un incremento de enfermedades coronarias, Diabetes tipo 2 (DT2) en individuos con sobrepeso y obesidad. En pacientes con DT2, aparece daño en tolerancia a la glucosa y RI que son factores de riesgo para desarrollar enfermedades coronarias. Una posible relación entre la RI y enfermedades coronarias es la reducción de HDL e incremento de estrés oxidativo (Araya, 2006; Scott, R *et al.*, 2008).

## **1.2. Anatomía del hígado**

El hígado es un órgano de 1,5 Kg de peso que filtra 1,5 litros de sangre por minuto destoxificándola de sustancias nocivas. Tiene una consistencia dura y un color rojo vinoso. Se encuentra en el hipocondrio derecho y epigastrio. Es un órgano supramesocólico e infradiafragmático. Se encuentra rodeado por la cápsula de Glisson (transparente) y es intraperitoneal. La irrigación arterial se realiza por la arteria porta y arteria hepática (Scornik *et al*, 1997).

### **1.2.1 Función Hepática**

El hígado es un órgano glandular más grande del cuerpo y es una víscera fundamental que interviene en gran variedad de procesos (Borsheim, *et al*, 2002) llevando a cabo las siguientes funciones:

1. Funciones vasculares, incluyendo la formación de la linfa, almacenamiento y filtración de la sangre.
2. Funciones metabólicas de carbohidratos, lípidos y proteínas.
3. Funciones secretoras y excretoras, en especial la producción de bilis.

Otras como el catabolismo de sustancias hormonales, el almacenamiento de vitaminas, metales y funciones inmunológicas como el sistema hepático fagocítico.

### **1.2.2 Metabolismo de lipoproteínas**

El hígado constituye el órgano central del metabolismo de los lípidos. Capta los lípidos de origen intestinal y los integra en nuevas lipoproteínas para redistribuirlas en los tejidos periféricos (Ruotolo, G y Howard, 2002). Esta vía involucra a las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) y lipoproteínas de baja densidad (LDL). El metabolismo de las lipoproteínas que se presenta en la (Figura 2), intenta resumir el transporte de lípidos biosintetizados en el hígado o provenientes de la ingesta alimentaria desde el intestino. En el ser humano aproximadamente el 80% del colesterol proviene de la síntesis hepática

mientras que el 20% restante es aportado por la dieta. En el metabolismo de las lipoproteínas, están implicados distintos órganos: el intestino, el hígado y los tejidos periféricos. En el intestino ocurre la absorción de los lípidos de los alimentos y se produce la incorporación de estos en quilomicrones, sintetizados por el enterocito. Durante el transporte entero-hepático los lípidos son hidrolizados y los ácidos grasos libres son captados por los tejidos periféricos donde se almacenan (tejido adiposo), o son catabolizados para obtención de energía (músculo estriado) (Berneis *et al*, 2002).

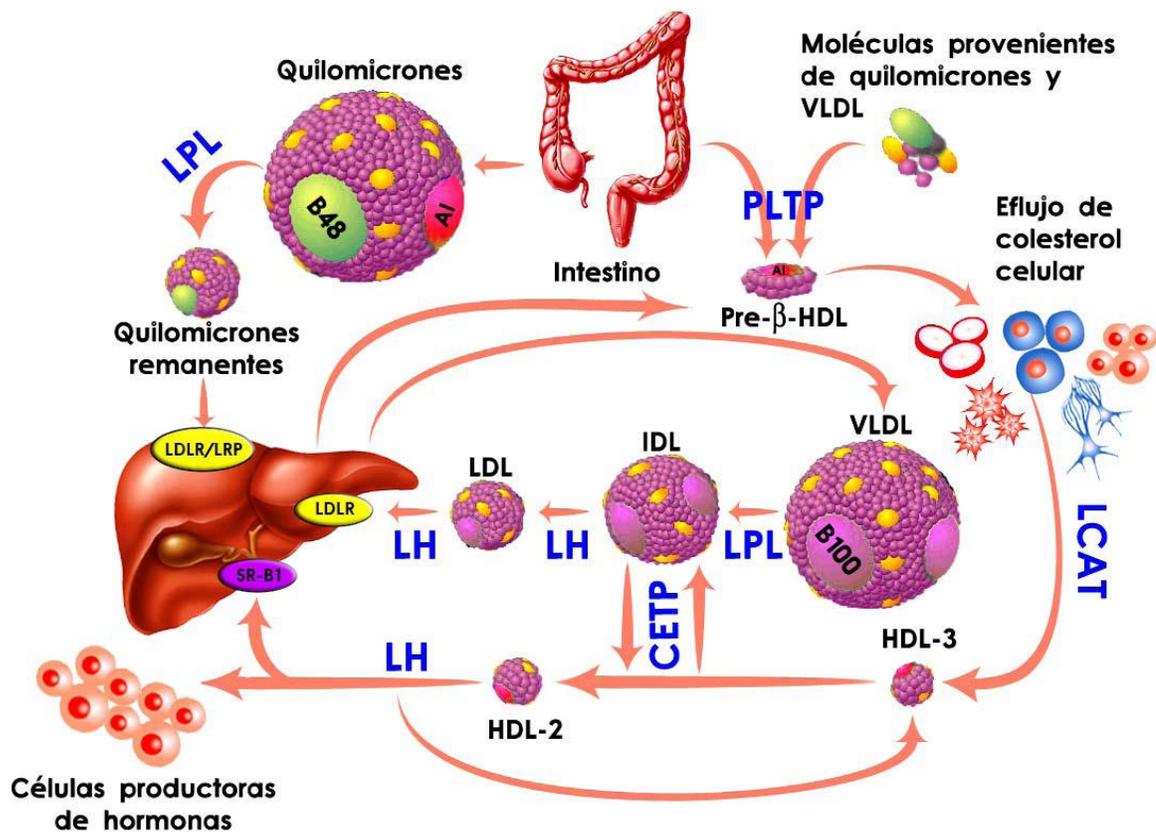
Finalmente, los tejidos periféricos recogen los lípidos (principalmente el colesterol no esterificado y los ácidos grasos libres) mediante endocitosis e hidrólisis de las lipoproteínas de origen hepático o intestinal. Con respecto al exceso de colesterol, este es eliminado de las células de los tejidos periféricos, por transferencia a HDL, que lo transporta al hígado, donde es eliminado como tal o transformado en sal biliar, en la bilis. Esta ruta metabólica es conocida como Transporte reverso de colesterol (TRC) (Forcato, 2008).

### **1.2.3 Metabolismo de proteínas**

La síntesis hepática de proteínas es importante, ya que la mayoría de las proteínas plasmáticas se sintetizan en el hígado. Y la enfermedad hepatocelular puede alterar la síntesis de proteínas tanto cuantitativa como cualitativamente (Hernández, *et al*, 2003).

Cuando el hígado es dañado frecuentemente el metabolismo de proteínas es alterada. Las manifestaciones de la alteración del metabolismo de proteínas en hígado dañado son variadas. Estos cambios clínicamente están acompañados por pérdida de músculo manifestada como malnutrición caloríca-proteíca y esta asociada a niveles disminuidos de proteínas sintetizadas en hígado. Mientras que la patogénesis de estos cambios en proteínas y aminoácidos no han sido aclarados (Charlton, 1996; Casanueva *et al*, 2001).

Los animales deben reponer continuamente los aportes nitrogenados mediante la alimentación, con objeto de reemplazar el nitrógeno que se pierde a través del catabolismo. Los aminoácidos que han de proporcionarse en el alimento para satisfacer las necesidades metabólicas de un animal se denominan aminoácidos esenciales; son aquellos que tienen estructuras complejas (Mathews, *et al*, 2002). La transaminación desempeña un papel algo más amplio en el metabolismo de los aminoácidos. Las reacciones de transaminación están catalizadas por enzimas denominadas aminotransferasas. La transaminación comporta la transferencia del grupo amino, generalmente del glutamato a un  $\alpha$ -cetoácido, con la formación del correspondiente aminoácido más el derivado  $\alpha$ -ceto del glutamato que es  $\alpha$ -cetoglutarato. Así pues, podemos considerar la transaminación como un mecanismo de síntesis o degradación de aminoácidos. Dado que los aminoácidos del interior de una célula rara vez se encuentran en las proporciones necesarias para la síntesis de las proteínas específicas de la célula. Las proteínas que se segregan a un medio extracelular, como las enzimas digestivas, las hormonas polipeptídicas y anticuerpos, tienen un recambio metabólico bastante rápido, mientras que las proteínas que desempeñan un papel predominante estructural, como el colágeno del tejido conjuntivo, son metabólicamente más estables. En los animales cuyo consumo de proteínas en la alimentación supera a las necesidades existentes para la síntesis de proteínas y otras biosíntesis, el exceso de nitrógeno se degrada en su mayor parte, y los esqueletos carbonados se metabolizan en el ciclo del ácido cítrico o puede utilizarse para biosíntesis de carbohidratos (Hernández, *et al*, 2003).



**Figura 2.** Esquema general del metabolismo de las lipoproteínas. Se muestra el flujo de lípidos y lipoproteínas desde y hacia el hígado. Las VLDL se forman en el hígado. Su síntesis esta regulada por la formación de ApoB100:E y los triglicéridos sintetizados en el hígado y otra parte sigue hidrolizando sus triglicéridos y pierde Apo E transformándose en LDL. Forcato, 2008.

### 1.3 Paraoxonasa

#### 1.3.1 Definición

Existen mecanismos enzimáticos que interrumpen el proceso de lipoperoxidación de los cuales se ha descrito dos familias de proteínas, las carboxilesterasas y esterasas. A estas últimas también se les han denominado genéricamente como grupo de las Paraoxonasas (PON) (Mackness, *et al*, 1996).

La PON es un grupo de enzimas de una familia génica que en los mamíferos tiene al menos tres miembros codificados por los genes PON1, PON2 y PON3.

Esta familia de genes probablemente se originó a partir de la duplicación de un precursor común, puesto que los tres son muy semejantes, en el 70% de la secuencia de nucleótidos y en el 60% de la de aminoácidos y se encuentran localizados en posiciones adyacentes del cromosoma 7 en la especie humana y del cromosoma 6 en ratones (Primo-Parmo, *et al*, 1996; Sentí, *et al*, 2003).

El grupo de la PON tiene diferentes actividades enzimáticas que se determina a partir del substrato que permite cuantificarlas. La actividad que utiliza paraoxon (insecticida) se denomina actividad paraxonasa y la determinada utilizando fenilacetato se denomina arilesterasa. También tiene actividad tiolactonasa, y es capaz de hidrolizar tiolactonas de homocisteína ((Aviriam *et al.*, 1998; Aviram *et al.*, 2004; Watson *et al.*, 1999; Watson *et al.*, 1995).

En la Tabla 7 se enumeran las principales características funcionales de los productos génicos de PON1, PON2 y PON3, así como los tejidos donde se ha probado tener expresión.

**Tabla 7.** Principales características funcionales de PON1, PON2 y PON3

	PON 1	PON 2	PON 3
<b>Actividad (paraxonasa/ arilesterasa)</b>	Si	No observado	Débil
<b>Actividad tiolactonasa</b>	Si	No observado	Si
<b>Asociación a HDL</b>	Si	No	Si
<b>Protección a LDL (oxidación)</b>	Si	Si	Si
<b>Expresión (órgano)</b>	Hígado	Hígado, riñón, cerebro	Hígado, riñón, placenta, testículo

Fuente. Ferre *et al*, 2004.

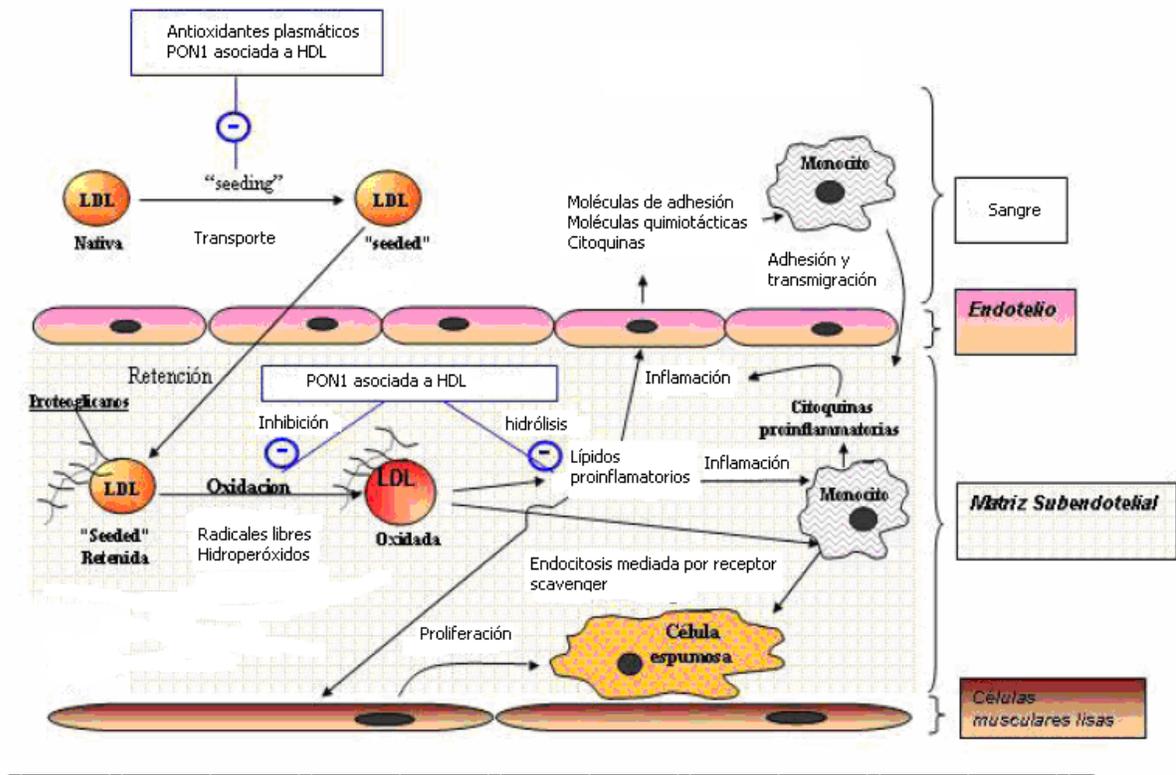
### **1.3.2 Propiedades y características de la PON1**

La PON sérica humana (arildialkilfosfatasa; EC 3.1.8.1) es una esterasa dependiente de calcio, está asociada fuertemente con lipoproteínas de alta densidad (HDL) en el plasma (Mackness, *et al*, 2002, Canales y Sánchez-Muñiz, 2003). La PON1 se sintetiza en el hígado de los mamíferos, circula por la sangre unida a las apo AI y apo J de las HDL. En 1996 se describió por primera vez que PON1 pertenecía a una familia multigénica que constaba al menos de tres miembros: PON1, PON2 y PON3. PON1 y PON3 se expresan principalmente en hígado mientras que PON2 se encuentra en una amplia variedad de tejidos entre los que se incluyen cerebro, hígado, riñón y testículos (Primo-Parmo *et al.*, 1996).

La PON1 retiene terminaciones hidrofóbicas N, las cuales parecen una señal péptidica para anclarse la PON1 a HDL. La terminación N es desordenada e invisible en la estructura cristalina, si esta parte hidrofílica se extiende más allá de esta señal peptídica adopta una estructura helicoidal.

### **1.3.3 Actividad destoxicante y antioxidante de la PON1**

Las LDL oxidadas en el espacio subendotelial intervienen en la formación de la placa ateromatosa por sus cualidades proinflamatorias. En este contexto, el papel antiaterogénico de las HDL se debe a la capacidad antioxidante que poseen. Varios de sus elementos participan en esta propiedad, entre ellos la PON1, asociada a las HDL plasmáticas (figura 3). La PON1 se encuentra unida a la membrana del hepatocito. Esta enzima posee la capacidad de eliminar lipoperóxidos que participan en la formación de la placa. La PON1 de la membrana del hepatocito depende del contenido de colesterol libre presente en la lipoproteína, indicando que la tensión de superficie y la fluidez de la capa de fosfolípidos de las HDL es fundamental para su asociación con la enzima (Pérez-Mendez, 2004).



**Figura 3.** Modelo de oxidación de las LDL por las células de la pared aórtica. La PON1 es liberada a la membrana plasmática de los hepatocitos posiblemente a la interacción de las lipoproteínas y el receptor SR-B1. Gracias a las HDL; la PON1 puede ser transportada a las zonas de la pared endotelial sobre la cual existe daño vascular, de tal manera que puede ejercer su efecto antioxidante sobre las LDL oxidadas. (Ribas, V. 2005).

La PON1 se identificó inicialmente en el campo de la toxicología por su capacidad de hidrolizar a compuestos organofosforados (p. ej., paraoxón) (Davies et al., 1996). El paraoxón es un metabolito tóxico producido en el hígado a partir del paratión, que es un compuesto relativamente inocuo (La Du, 1996). Por otra parte, a pesar de la fuerte vinculación de la enzima con las HDL, no siempre se observa que la concentración de HDL y la actividad paraoxonasa se correlacionen entre sí (Rantala et al., 2002). Por otra parte, la PON1 confiere las propiedades antioxidantes de las HDL y es quizá el mecanismo principal de inhibición de la oxidación de las LDL y de las propias HDL, procesos directamente involucrados en las fases iniciales de la aterosclerosis. In Vitro, la PON1 neutraliza el peróxido de hidrógeno y lípidos peroxidados libres o presentes en lesiones ateroscleróticas o en LDL parcialmente

oxidadas (Aviram *et al.*, 1998; Aviram *et al.*, 2004; Watson *et al.*, 1999; Watson *et al.*, 1995).

Las evidencias experimentales de la función antioxidante de la PON1 se apoyan fuertemente en estudios realizados en ratones doble *knock-out* para PON1/apoE demostrando que la PON1 *in vivo* es eficaz para inhibir la oxidación de las LDL y lipoproteínas de densidad intermedia (Shih *et al.*, 2000).

En estudios humanos, una relación inversa entre la actividad PON1 y patologías severas asociadas con enfermedades ateroscleróticas así como hipercolesterolemia familiar (Mackness *et al.*, 1991; Tomás *et al.*, 2000) o diabetes mellitus tipo 1 (Mackness *et al.*, 2002).

La actividad de la PON1 se ha identificado en diferentes tejidos, así como el hígado (incluyendo microsomas), cerebro y pulmón. Y ha sido estudiado extensivamente en relación a enfermedades cardiovasculares mientras que hay escasos datos disponibles sobre la enzima hepática. Algunas de estas enzimas son relacionadas dentro de la circulación y algunas porciones son almacenadas en el hígado. La paraoxonasa sérica (PON1), la cual es llevada en la circulación sanguínea a partículas HDL, protegiendo a LDL de peroxidación. La función principal de la PON1 en el hígado es proveer protección hepática contra estrés oxidativo. (Suleyman *et al.*, 2005).

Existe disminución en la actividad PON1 particularmente en diabetes tipo 2, incrementando el riesgo de aterosclerosis a través del daño oxidativo de LDL (Lipoproteínas de baja densidad) (Sampson, 2005).

En hombres con DT2, hay una inesperada relación independiente entre LDL oxidadas y actividad paraoxonasa (con fenil acetato como sustrato) posiblemente ambos basados por consumo dietario de grasas y una asociación entre el polimorfismo PON-1 55 L en pacientes diabéticos masculinos. (Sampson, 2005).

El enfermo diabético desarrolla aterosclerosis en forma acelerada comparado con el no diabético. Esto se debe a un trastorno metabólico generalizado que incluye hiperglucemia, resistencia a la insulina, dislipidemia, pérdida de la función reguladora endotelial, tendencia a la vasoconstricción y un estado protrombótico. Las principales complicaciones son enfermedad arterial coronaria, enfermedad vascular periférica y enfermedad vascular cerebral (Quíroz, 2003).

#### **1.3.4 Actividad sérica de la PON1 en daño hepático crónico**

Las HDL originadas de la síntesis y secreción hepática y el catabolismo de VLDL, sugieren que la cantidad PON1 depende del número de partículas HDL transportadas. La disponibilidad de subfracciones específicas de HDL (VHDL) secretadas por el hígado quizá module el transporte de la PON1 en el torrente sanguíneo. (Kudchodkar *et al*, 2000).

Existe una escasez de datos sobre la enzima hepática. En hígado de ratas y humanos son esencialmente enzimas microsomales asociadas con vesículas derivadas del retículo endoplásmico. Un papel hepatoprotector antioxidante quizá sea fácilmente una hipótesis para la PON1 hepática porque los microsomas de hígado son el mayor sitio para el catabolismo de compuestos xenobioticos, reacción en la cual aumentan los radicales libres. Se ha propuesto que el estrés oxidativo juega un rol importante en las enfermedades hepáticas. (Ferre *et al*, 2001 y Camps *et al* 2009).

El hígado juega un papel en la síntesis de PON1 sérica. Se ha mostrado que los niveles de PON1 disminuyen en presencia de hígado graso. La patogénesis de hígado graso es poco entendido, se conoce que hay incremento de oxidación mitocondrial de ácidos grasos, incremento de peroxidación hepática de lípidos e insulino resistencia (Calderín *et al*, 2009).

En enfermedades crónicas hepáticas, la influencia de estrés oxidativo en cambios fisiopatológicos conduce a cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular. Puesto que la PON1 ejerce un efecto protector contra el estrés oxidativo es lógico encontrar una asociación entre esta enzima y daño hepático (Sentí *et al*, 2003; Suleyman, 2005).

Si la PON1 se encuentra unida a HDL, y está es una enzima antioxidante, quizá no parezca ilógico inferir que lleve a cabo esta función dentro de las células. Ciertamente los microsomas hepáticos son el mayor sitio para el catabolismo de componentes xenobióticos, en el curso de este proceso existe un incremento en la producción de radicales libres (Ferre *et al*, 2009).

La disminución de la PON1 se ha asociado al proceso de estrés oxidativo así como dislipidemia, DM, edad adulta y tabaquismo. Ciertamente el estrés oxidativo está relacionado en cierto grado a la insulino resistencia; un componente clave del Síndrome Metabólico (Sentí *et al*, 2003). Los daños crónicos hepáticos están asociados a una disminución de la actividad PON1. La actividad sérica PON1 disminuida ha sido reportada en pacientes con hígado graso (Baskol *et al*, 2005). Las dietas altas en grasa incrementan el peso corporal, se acumula grasa en el organismo e incrementa la insulino resistencia en modelos roedores. Además, pueden incrementar los niveles de lípidos en hígado rápidamente y esta acumulación esta asociada a insulino resistencia. (Ricci, M, 2009). La PON1 puede ser considerada uno de los sistemas antioxidantes que el organismo posee para protegerse del daño oxidativo. La actividad de la PON1 ha mostrado ser sensible a variaciones fisiológicas o patológicas, así como a factores dietarios, entre estos últimos la suplementación con antioxidantes ha mostrado incrementar la actividad PON1 mientras que una dieta aterógena reduce esta actividad. Se ha descrito que en ratas jóvenes la restricción calórica presenta beneficios sobre la salud del animal, por ejemplo, reduce el estrés oxidativo y aumenta la longevidad. También existe una disminución de la actividad PON1, lo cual sugiere que podría ser parte de una estrategia para conservar la energía (Thomás-Moya *et al* 2006).

Se ha reportado que la disminución de peso reduce la prevalencia de síndrome metabólico, esteatosis hepática, inflamación y fibrosis. Sin embargo, este hallazgo no es universal ya que se ha sugerido que la pérdida de peso acelerada en realidad incrementa la esteatosis hepática por el incremento de concentración de ácidos grasos libres de la lipólisis. (Scott *et al.*, 2008). El exceso de lípidos y ácidos grasos saturados en alimentos han sido relacionadas a algunas enfermedades crónicas, así como a obesidad y enfermedades cardiovasculares. (Nus *et al.*, 2006).

### **1.3.5 Alimentación y su relación con actividad enzimática de la PON1**

Usualmente las dietas consumidas en países industrializados son ricas en grasas animales y han estado asociadas con un incremento en la incidencia de enfermedades cardiovasculares que además parecen estar influenciadas por el género del individuo. Dado a los efectos pro-aterogénicos descritos para los ácidos grasos saturados opuestos a los beneficios conferidos por los ácidos grasos monoinsaturados, que en conjunto con el rol protector de la PON1 contra el desarrollo de aterosclerosis y la modulación por factores dietario (Thoma's-Moya *et al.*, 2006). Las dietas altas en grasa incrementan adiposidad, insulino resistencia y daño en el metabolismo de glucosa en ratas. Las dietas altas en grasa incrementan la cantidad de sustratos disponibles para la oxidación y el flujo de electrones a través de la cadena respiratoria por la producción de radicales libres. Las especies reactivas de oxígeno causan daño oxidativo en los componentes mitocondriales en forma de peroxidación de lípidos, modificación de proteínas; guiando a la disfunción mitocondrial misma que contribuye a desarrollar patologías tales como EVC y DM. (Ricci, M, 2009). Kudchodkar, *et al*, 2000 han señalado que la actividad PON1 en ratas es más elevada en animales que consumen aceite de oliva que en los que reciben grasas saturadas o aceites de pescado. Dado que el aceite de oliva incrementa la concentración de HDL podría postularse que el aumento de la PON1 promovido por el consumo de aceite de oliva sería dependiente *per se* de las concentraciones de HDL más que de la peroxidación (Bhalchandra, *et al*, 2000).

La dieta modula también la actividad y concentración de la enzima PON1. Hasta el momento los datos de que disponemos son escasos para poder generalizar. Así podría pensarse que el consumo de antioxidantes mejora el estado PON1. La ingesta de vitaminas C y E parece incrementar la actividad PON1 (Canales, *et al*, 2003). En humanos se ha encontrado que el consumo de alcohol, independientemente del tipo de bebida alcohólica, aumenta los valores de PON1. Por otro lado, en humanos también se ha visto un descenso de actividad de la enzima PON1 de un alrededor de un 16% cuando se ingieren dietas que contienen aceite reutilizado.

La restricción calórica (CR) es una intervención dietética que ha sido descrita para retrasar el comienzo o disminuir la progresión de la mayoría de envejecimiento relacionada a enfermedades y a extender la máxima duración en roedores y primates no humanos, guiando a la juventud fisiológica al avanzar la edad. La cantidad de estos efectos benéficos, CR mejora los factores de riesgo ateroscleróticos en humanos y roedores (Thoma's-Moya *et al.*, 2006). El consumo de más proteínas en cambio de carbohidratos estuvo asociada con una disminución de obesidad abdominal independientemente de la edad, género, peso, tabaquismo, actividad física, consumo de alcohol, energía total y etnicidad. La relación persiste después de ajustar fibra, energía total, grasas totales, saturadas, trans y otras grasas.

Durante un tiempo prolongado de ingesta excesiva de energía a partir de carbohidratos simples y deficiente en proteínas, se puede reducir la respuesta hipometabólica de adaptación, y si el aumento de cortisol plasmático es inadecuado, se produce una movilización de proteínas y disminuyen la albúmina plasmática y los aminoácidos. Además, la hormona de crecimiento conduce aminoácidos al tejido muscular magro, lo que provoca que no exista síntesis de proteínas viscerales, y el hígado no sintetiza suficientes lipoproteínas, con lo cual la grasa queda atrapada (hepatomegalía) (Casanueva *et al*, 2001).

Dado que los lípidos que se oxidan provienen fundamentalmente de las LDL, es lógico pensar que la grasa de la dieta condicione tanto la concentración como la susceptibilidad de las LDL a la oxidación. Los ácidos grasos poli saturados (AGP), son los ácidos grasos más fácilmente oxidables, mientras que los saturados podemos decir que no se oxidan. No obstante, aunque los AGP disminuyen la concentración de LDL, la ingesta elevada de estos compuestos acompañada de consumo deficiente de antioxidantes puede afectar negativamente al estado oxidativo de estas partículas e incrementar su riesgo peroxidativo. (Tomás, *et al*, 2004).

## **2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN**

La población con malnutrición durante la infancia y con desarrollo posterior de obesidad en la edad adulta, poseen un mayor riesgo de desarrollar DM, hipertensión, enfermedades cardiovasculares a una temprana edad (FMD, 2009). La DM es una de las enfermedades de mayor impacto por su frecuencia y sus complicaciones crónicas, tal es el caso de la aterosclerosis; ya que alrededor del 80% de pacientes con DT2 son obesos, y la obesidad se considera un factor de riesgo cardiovascular., especialmente si se asocia a una distribución de la grasa corporal de tipo central o abdominal y a RI (Eckel y Krauss 1998).

La PON1 es una enzima asociada a las lipoproteínas de alta densidad (HDL) que se secreta principalmente en hígado y ha adquirido reciente importancia en la salud debido a sus propiedades protectoras en la prevención en la oxidación de las HDL y de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Por lo que la PON1 parece jugar un papel importante en la prevención de la aterosclerosis. Se sabe que la concentración de la PON1 disminuye en pacientes con diabetes (Sampson, *et al*, 2005) y que determinados ácidos grasos, componentes de las dietas modulan la expresión del gen de la PON1 (Bhalchandra, *et al*, 2000). Sin embargo, no se conoce como la actividad de la PON1 en hígado se ve afectada por dietas insaludables para el humano. Por lo que, en este trabajo, se emplearon animales alimentados con

diferentes dietas en combinación con un estado diabético a fin de saber cual dieta afecta más la actividad de la PON1.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

El saber como influyen diferentes dietas sobre la actividad de la PON1 en hígado de rata diabetizada, se podrá valorar si la capacidad antioxidante de esta enzima pueda verse modificada o si éstas modulan su actividad. Como se señaló en la parte introductoria, la PON1 se sintetiza en hígado y entre otras propiedades, tiene capacidad de proteger a las partículas HDL de la oxidación y con ello tener un papel protector en el inicio y progreso de la aterosclerosis (Mackness *et al*, 2002; Sentí *et al*, 2003). Poco se conoce sobre el efecto de la restricción proteica sobre los componentes de las enzimas que se encuentran en la membrana del plasmática del hepatocito (Scott, *et al*, 2008). La membrana plasmática del hepatocito es un organelo complejo que juega un papel importante en el metabolismo. Asimismo, se sabe que la diabetes disminuye la actividad de la PON1 en sangre (Pérez, 2004) y con ello favorecer el riesgo de desarrollar aterosclerosis. Por lo que al encontrarse que ciertos tipos de dietas modulen la actividad PON1, se podrá evaluar el papel que juegan las dietas en el desarrollo acelerado de la aterosclerosis. También es de interés de este trabajo saber si la actividad de la PON1 se modifica en el hígado o si esto ocurre una vez que la PON1 es secretada del hígado.

#### **4. OBJETIVO GENERAL**

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

##### **4.1 Objetivos Específicos**

Determinar como afecta una dieta aterógena la actividad enzimática de la PON1.

Determinar como afecta una dieta baja en proteínas (6%) actividad enzimática de la PON1.

Comparar la relación que existe entre actividad enzimática de PON1 en hígados de ratas Wistar y el peso del hígado.

#### **5. HIPÓTESIS**

La actividad de la PON1 de hígados de rata Wistar disminuye por una dieta obesigénica y una dieta baja en proteínas.

## 6. MATERIALES Y METODOS.

En la Figura 4 se muestra el diseño experimental de este trabajo.

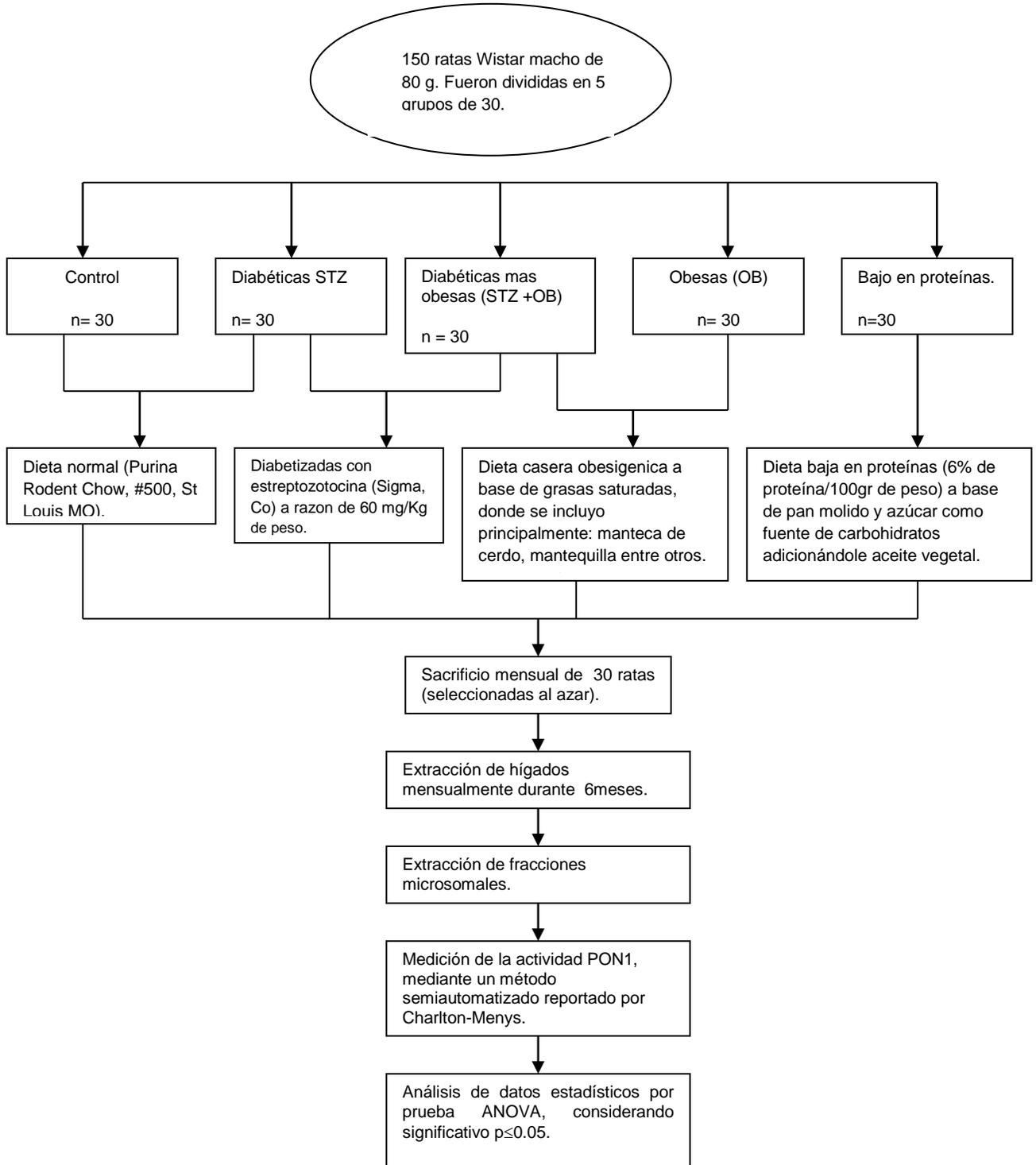


Figura 4. Diagrama experimental.

## **6.1 Animales y dietas**

Se mantuvieron las ratas en jaulas a temperatura y ciclo de luz controlados, agua *ad libitum*.

El grupo Diabético + obeso y el grupo Obeso fueron alimentados con una dieta elaborada a base de grasas saturadas donde se incluyeron 300g de manteca de cerdo/1Kg de alimento Nucleous.

El grupo bajo en proteínas se elaboró una dieta (6% proteína/100 g peso) a base de pan molido y azúcar, como fuente de carbohidratos y aceite vegetal.

## **6.2 Inducción de Diabetes Mellitus utilizando Estreptozotocina**

La diabetes se indujo por inyección intraperitoneal de estreptozotocina (60 mg/kg).

Preparación de Estreptozotocina en un buffer de citrato.

Buffer de Citratos pH 4.5 al 0.1M.

Ácido Cítrico 2.1014 g en 100 ml de solución Salina ó agua estéril.

Citrato de sodio 2.9411 g en 100 ml de solución Salina.

Estreptozotocina (STZ).

## **6.3 Sacrificio mensual de ratas Wistar utilizando una guillotina**

Se selecciono al azar a 5 ratas de cada grupo: grupo control, grupo Diabéticas, Obesas, Diabético+ obesas y Bajo en proteínas.

## **6.4 Extracción de fracciones microsomales de hígado de ratas sometidas a diferentes tratamientos**

Se utilizó un equipo de disección para la extracción cuidadosa del hígado de las ratas Wistar. Se pesaron los hígados y se registro el peso de los mismos.

1. Se efectuó un lavado de 0.5 g de hígado con Tris-HLC- pH 7.4 adicionándole 0.25 $\mu$ l de sacarosa y 1.3ml de regulador. Posteriormente se homogeneizo en tubos de 15 ml a una temperatura de 4 °C y se centrifugo a 1000 rpm.
2. Entonces el sobrenadante se ocupo y se sometió a centrifugación a 16000 rpm por 60 min, a una temperatura de 4°C. En este proceso el sobrenadante se desecha.
3. A el pellet se le adiciono 1 ml de regulador sin sacarosa + 7.5  $\mu$ l de Triton X-100 a una temperatura de 4°C y a continuación se sometio a agitación durante 30 minutos.
4. Y finalmente se centrifugó a 16000 rpm por 60 minutos, a una temperatura de 4°C.
5. El sobrenadante se guardó a -80°C.

#### **6.5 Medición de la Actividad Enzimática de la PON1 en hígado de ratas Wistar.**

La medición de la actividad de la PON se realizó mediante un método semiautomatizado recientemente reportado, el cual emplea un sistema de medición en microplaca de 96 pozos y un lector de micro-placas (Bio-Tek Junior) (Charlton, 1996). La programación de los parámetros dentro del lector fueron los siguientes: Modo cinético, filtro de 405 nm, tiempo lag 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.

En la medición de la actividad paraoxonasa PON1 en hígados de ratas Wistar se empleo, paraoxón (Sigma, USA). Después se adicionará (3.3 mM/L del substrato) para analizar la mezcla que contendrá 10 $\mu$ L de concentrado hepático y 1 mmol/L CaCl<sub>2</sub> (Sigma, USA) en 20 mmol/L de regulador Tris pH=8. La formación de *p*-nitrophenol será monitoriada espectrofotométricamente a 412 nm por 3 minutos. La actividad paraoxonasa del concentrado hepático será determinada por triplicado. (Sumegová et al, 2006).

## 6.6 Análisis estadísticos.

Se realizaron análisis estadísticos mediante un paquete de software estadístico (SPSS 15.0 para Windows, Inc., EE.UU). Las diferencias estadísticas entre los grupos experimentales fueron analizadas mediante análisis de varianzas (ANOVA). Prueba t de Student, como post-hot de comparación. Un valor de  $p < 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo. Se realizó una prueba de Pearson para correlacionar la actividad PON1 y el Peso hepático de ratas sometidas a diferentes tratamientos.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA PON1 EN HÍGADO DE RATAS WISTAR EN LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS

En la figura 5 se puede apreciar que la actividad del grupo STZ es significativamente menor comparado con el grupo control al grupo control ( $p=0.048$ ).

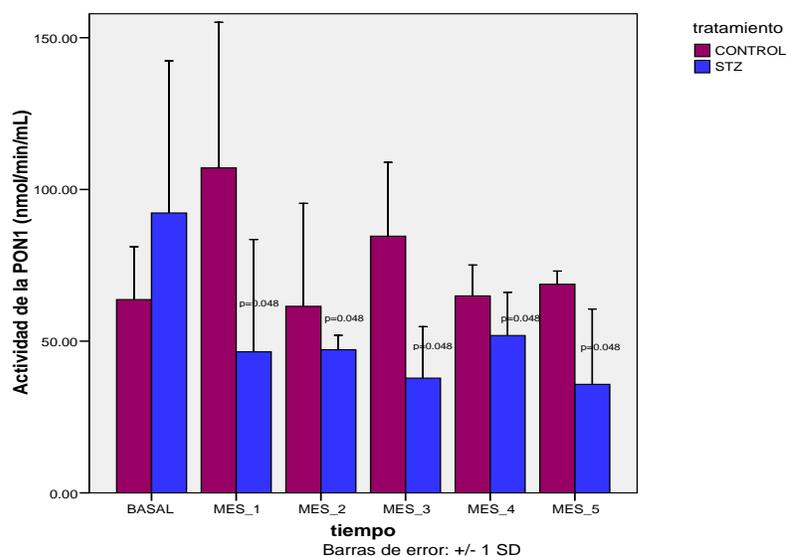


Figura 5. **Comparación de la actividad PON1 en hígado de ratas Wistar entre el grupo control y el grupo diabético en el transcurso del tratamiento.** La actividad del grupo control alimentado con una dieta normal es superior a la actividad del grupo STZ, siendo significativo  $p=0.048$ .

A lo largo del tratamiento la actividad de la enzima PON1 mostró ser menor tal y como se esperaba.

Para el caso del grupo STZ-OB (Figura 6) las actividades fueron variables a lo largo de los meses de tratamiento. Como se observa, en los meses 1,3 y 5 la actividad PON1 fue menor en el grupo STZ-OB comparado con el grupo control. No obstante, en los meses 2 y 4 sucedió lo contrario, las actividades fueron mayores en el grupo STZ-OB. Sin embargo, en ninguna de ellas la diferencia fue significativa.

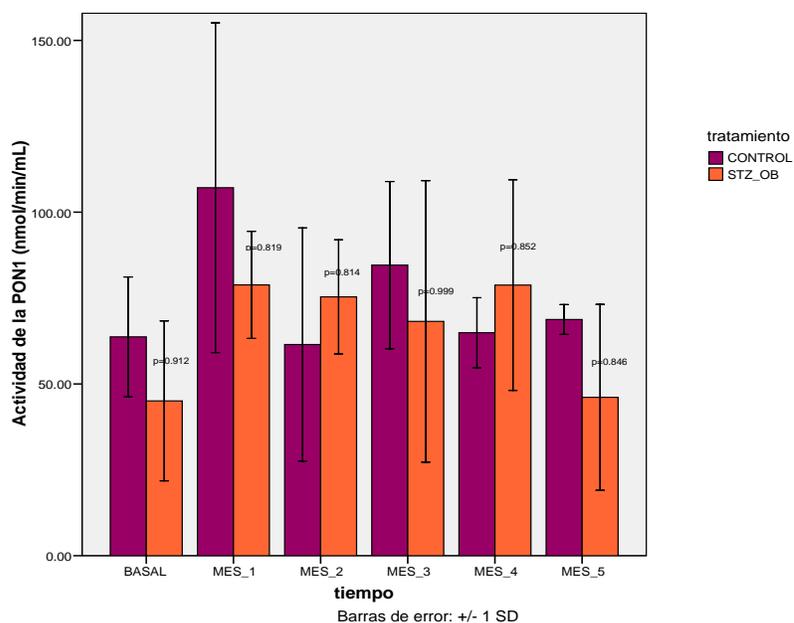
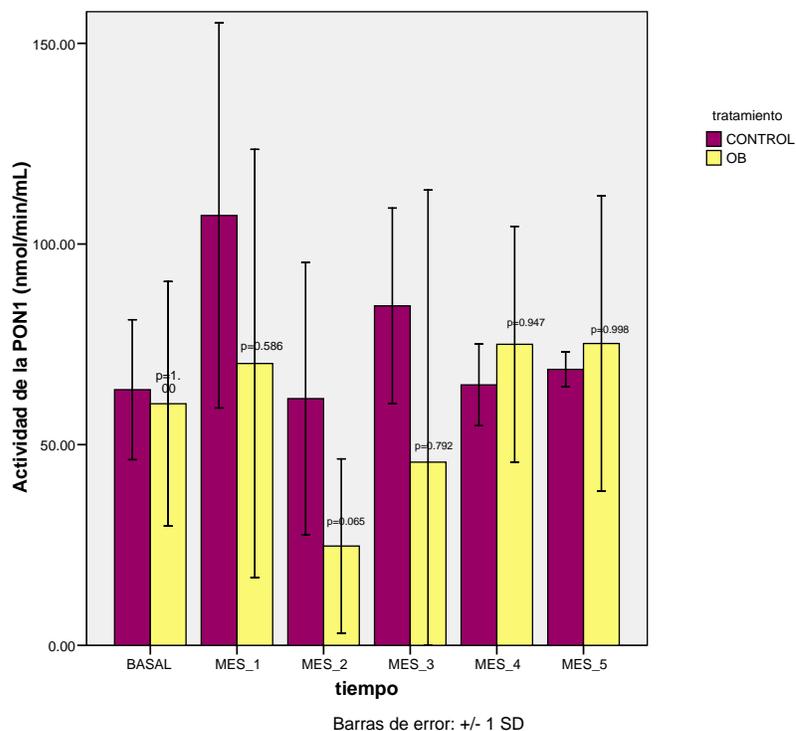


Figura 6. **Actividad PON1 del grupo control comparada con la actividad del grupo diabético+ Obeso alimentadas con una dieta aterógena.** En la gráfica se puede apreciar que la actividad del grupo STZ-OB mostró disminución e incremento en la actividad PON1, aunque no resultó ser significativamente diferente a lo largo de todo el tratamiento ( $p>0.05$ ).

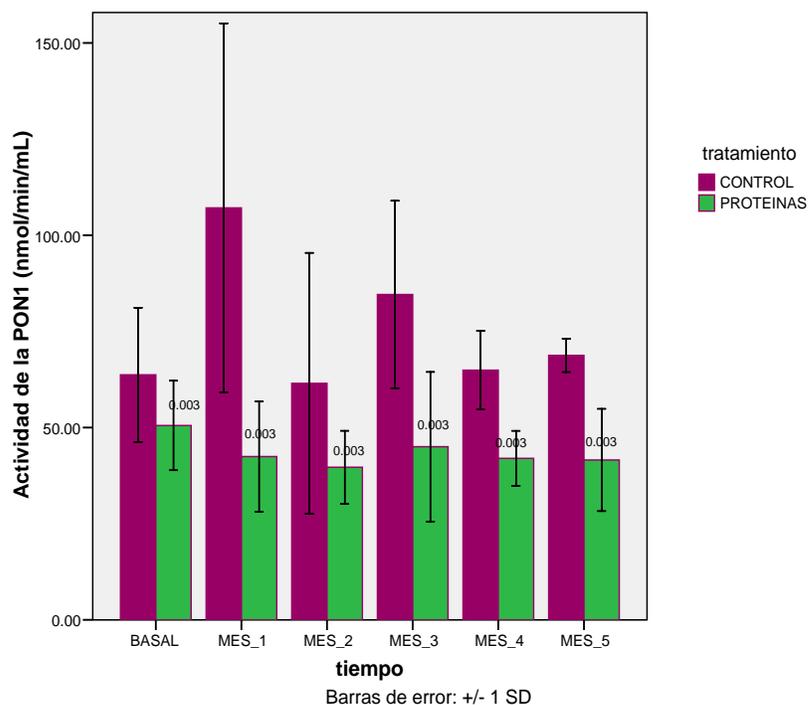
A su vez, para el grupo OB, los 3 primeros meses hubo una disminución de la actividad comparado con el grupo control. Interesantemente, en los dos últimos

meses (4 y 5) las actividades fueron mayores. No obstante, de forma similar al grupo STZ-OB, no se encontraron diferencias significativas en los resultados (Figura 7).



**Figura 7. Actividad PON1 en hígados de ratas alimentadas con una dieta obesigénica comparadas con el grupo control.** Se aprecia que no existieron diferencias significativas del grupo OB con respecto al grupo control ( $p > 0.05$ )

Como se aprecia en la figura 8, el grupo de ratas alimentado con una dieta bajo contenido proteico, fue el grupo que arrojó los valores más significativos, en este grupo, siempre la actividad de la PON1 fue menor en todos los meses con un valor de  $p = 0.003$ .



**Figura 8. Actividad de la Enzima PON1 en ratas alimentadas con una dieta baja en proteínas (6%).** Se observó una disminución de manera significativa de la actividad PON1 de ratas Wistar alimentadas con una dieta baja en proteínas ( $p=0.003$ ).

## 7.2 PESO DEL HÍGADO DE RATAS EN LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS.

En los grupos STZ, OB y STZ+OB no hubo diferencias significativas en el peso de los hígados de ratas wistar ( $p>0.05$ ), ver figura (9). Mientras que el grupo bajo en proteínas en el transcurso de todo el tratamiento el peso de hígado resultó ser menor comparado que el grupo control ( $p=0.003$ ). Es relevante que la disminución del grupo bajo en proteínas resultó drástico en este grupo, ver figura (10).

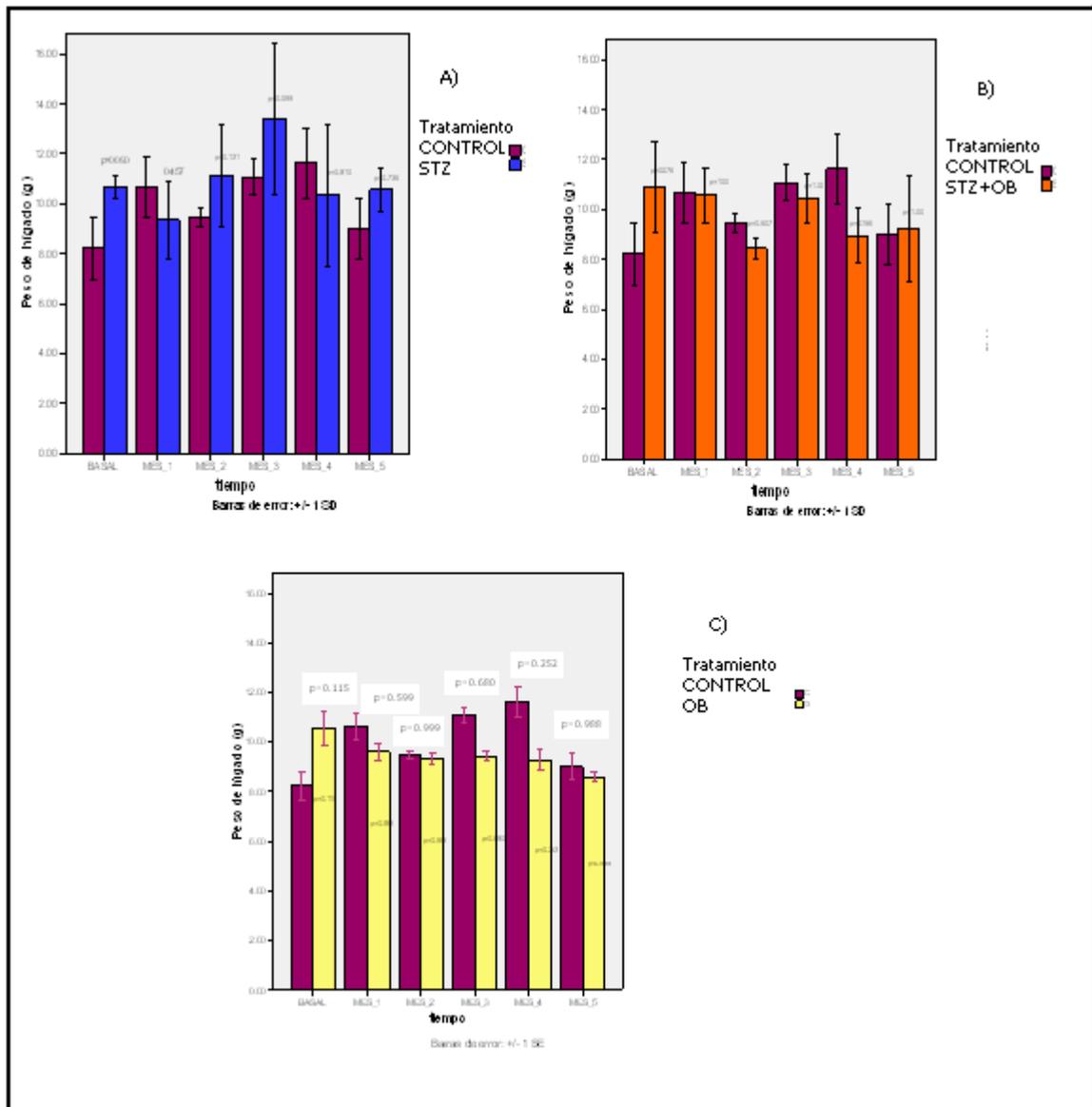
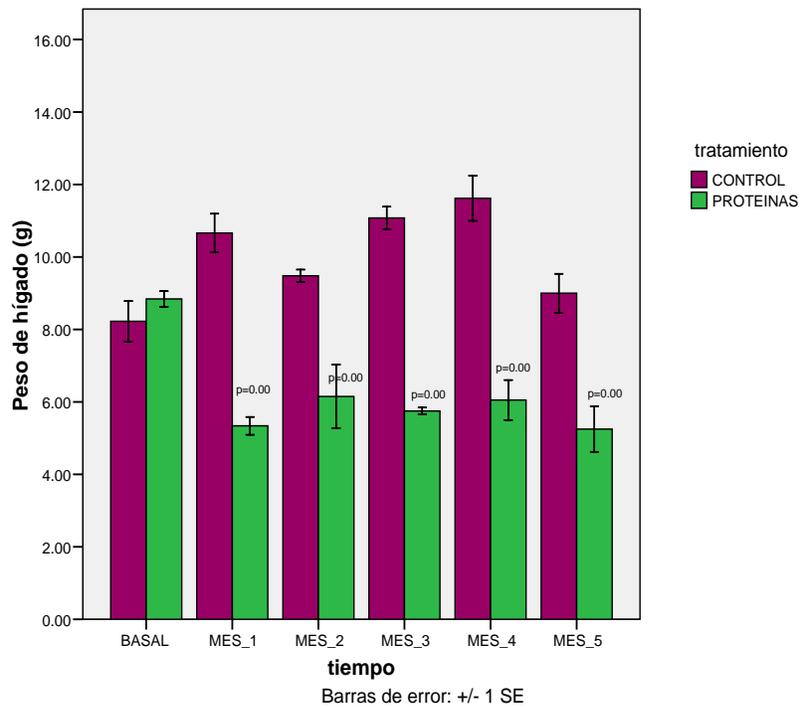
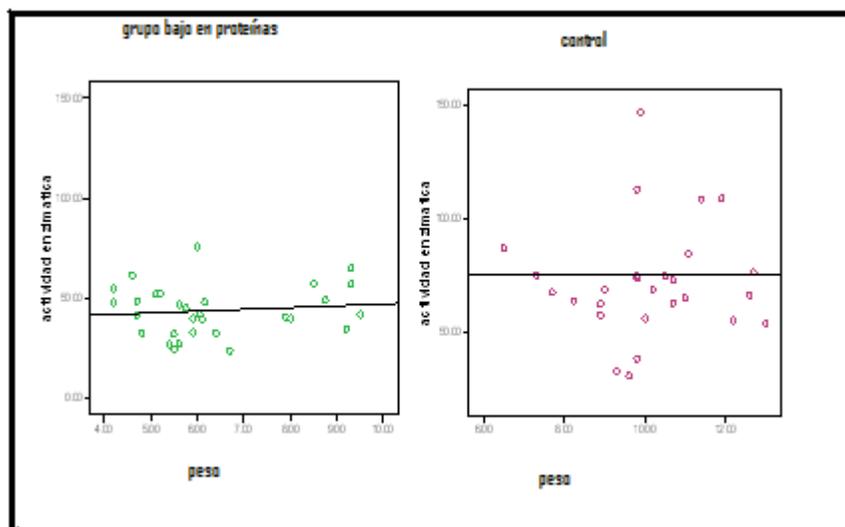


Figura 9. Peso de ratas wistar sometidas a diferentes dietas. Se mostró que el peso del hígado de los diferentes grupos mantienen un peso de hígado similar al grupo control en el transcurso de todo el tratamiento ya que no existieron diferencias significativas en los grupos STZ (A), STZ+OB (B) y OB (C); siendo ( $p > 0.05$ )



**Figura 10. Comparación de peso hepático del grupo alimentado con una dieta baja en proteínas (6%), a base de pan molido como fuente de Carbohidratos y aceite vegetal. Si existió una diferencia significativa p (0.000). Este peso de hígado de las ratas Wistar con dieta pobre en proteína fue el menor peso de todos los grupos.**

En la figura 11 se muestra la correlación entre actividad PON1 en hígados de rata sometidas a diferentes tratamientos. El grupo que resultó una disminución de peso y actividad PON1 fue el grupo alimentado con una dieta baja en proteínas ( $p=0.01$ ), siendo el más significativo. Para lo cuál se realizó una prueba de Pearson.



**Figura 11. Correlación entre actividad PON1 y peso hepático del los grupo sometido a una dieta baja en proteínas.** En la gráfica se muestra que existió una relación positiva entre la actividad PON1 de hígados y peso hepático de ratas con una dieta baja en proteínas ( $p=0.001$ ). En el resto de los grupos no existió correlación positiva entre actividad PON1 y peso hepático ( $p>0.05$ ).

## 8. DISCUSIÓN

El presente trabajo, tuvo como finalidad saber como influyen diferentes tipos de dietas incorrectas para el ser humano, así como un estado diabético sobre la actividad PON1 y el peso en hígado. Para ello se emplearon ratas wistar macho como modelo de experimentación.

Los resultados, en conjunto demuestran que una alimentación baja en proteínas tuvo los valores significativamente más bajos, incluso por debajo de los animales que fueron diabetizados. Estudios en humanos, señalan que la actividad de la PON1 en suero sanguíneo está disminuida en pacientes con diabetes tipo 2 (Mackness et al., 2002). Dentro de los mecanismos que ocurren en la DT2 se encuentra la glicosilación y lipoperoxidación, ambos provocan modificación en todas las moléculas ya sea por una alteración directa, modificando la estructura y por consiguiente la función biológica, esto a su vez provoca la aceleración proteolítica endógena selectiva o la inhibición enzimática (Zorrilla, 2002; Allevato y Gaviria, 2008). Sin

embargo, hasta ahora no se conoce la influencia que puede tener el tipo de alimentación en la actividad de la PON1 en hígado. Como se muestra en las figuras 8 y 10, los animales que fueron alimentados con bajo contenido proteico mostraron la más baja actividad PON1 y los más bajos pesos de hígado en todo el experimento. Se sabe que las proteínas son un componente mayoritario en los sistemas biológicos y juegan un papel clave en diversos procesos celulares, un aumento con la edad en los valores de oxidación proteínica y la restricción de proteínas provocan un mal funcionamiento hepático (Ayala, *et al*, 2006). Por lo que la actividad baja se justifica, ya que la PON1 se sintetiza en el hígado (Scott, *et al*, 2008).

En el presente estudio se hicieron análisis de correlación de actividad PON1 de hígado contra peso de hígado, de los diferentes grupos de estudio con el propósito de conocer una asociación-función. Sólo se encontró que el grupo de animales con bajo contenido proteico (6%) tuvo una asociación positiva con el peso de hígado ( $p=0.001$ ); es decir entre mayor peso de hígado mayor actividad PON1 y visceversa.

Thomás-Moyá *et al* 2008 realizaron un estudio con 24 ratas wistar (12 machos y 12 hembras) las cuales fueron alimentadas que fueron inducidas con una dieta con alto contenido en lípidos a base de galletas adicionadas con paté de hígado de cerdo, chocolate y tocino fresco para evaluar la influencia antioxidante de la PON1 en función del género, para ello se midieron los niveles de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico en hígado y en suero, los grupos carbonilos de la proteína del hígado, las actividades antioxidantes del hígado, y las actividades de PON1; dando como resultado una disminución significativa de la actividad PON1 en ratas wistar hembras. En nuestro estudio, la actividad de la PON1 y peso hepático en la misma cepa de ratas que fueron diabetizadas y/o alimentadas a base de lípidos principalmente saturados (grupo OB y STZ+OB) empleando manteca de cerdo y mantequilla no mostro diferencias significativas. Aunque se ha demostrado que ácidos grasos específicos pueden modular la actividad de la PON1, tales como el ácido palmítico y el aceite de pescado purificado. (Bhalchandra, *et al.*, 2000). En nuestro trabajo no se observó este efecto, ya que en nuestro trabajo no se usaron

lípidos puros o específicos para la alimentación, por lo contrario, se emplearon alimentos ricos en grasas con mezclas complejas de lípidos. Asimismo, en nuestro trabajo, no es posible determinar si el género influye en la actividad de la PON1, debido a que se trabajó con ratas macho. No se incluyeron ratas hembra, porque se sabe que el cambio hormonal por el ciclo menstrual en las ratas hembra modifica la actividad de la PON1. Numerosos estudios clínicos señalan que los hombres son más susceptibles a ECV que las mujeres de la misma edad. La protección en las mujeres está estrechamente relacionada con los niveles de estrógenos en sangre, ya que cuando la producción de estas hormonas cesa, aumenta el riesgo de EVC de manera semejante al de los hombres (Franco, *et al*, 2003)

En nuestro estudio la actividad y peso hepático de ratas wistar macho OB y STZ+OB alimentadas a base de lípidos saturados como manteca de cerdo y mantequilla no mostró diferencias estadísticas significativas. Probablemente la actividad PON1 en las fracciones microsomales con el menor estado de obesidad se debe a que en nuestro estudio se incluyeron únicamente ratas wistar macho con lo cuál el género es otro factor que modula la actividad PON1 en hígado (Thoma's-Moya, *et al*, 2006).

En estudios en modelo animal llevado a cabo por Hussein, *et al*, 2007. En el describen una población de 32 ratas Sprague-Dawley (un grupo control y 4 grupos diversos sometidos a una dieta deficiente en metionina y colina adicionada con diversas fuentes de lípidos). Para evaluar los efectos de diferentes tipos de lípidos dietarios sobre el contenido de lípidos hepáticos y los parámetros de estrés oxidativo en ratas experimentales con esteatosis o hígado graso no alcohólico (EHNA) y se obtuvo que la actividad PON1 disminuyó de manera significativa. Las ratas wistar de una línea diabética, presentan al año lesiones hepáticas propias EHNA. La resistencia a la insulina como fenómeno inicial y su combinación con el estrés oxidativo debido a la persistencia de glucemias elevadas, serían factores determinantes de su patogénesis (Martínez, *et al*, 1993). Así mismo el mecanismo de binucleación hepatocelular es un factor de regeneración, parecerían coexistir en forma simultánea lesiones celulares e intentos compensatorios que se oponen a el

daño celular (Wigg, *et al*, 2001; Medina, *et al*, 2004). Posiblemente por esta razón en nuestro estudio no se encontraron diferencias significativas en la actividad PON1 de fracciones microsomales de ratas wistar OB y OB-STZ ya que los resultados obtenidos se realizaron en un tiempo de 6 meses por lo cuál el daño hepático en su fase inicial comienza con daños en el metabolismo de lípidos incrementándose los valores plasmáticos de triglicéridos (Scott, *et al*, 2008).

En un futuro se pueden realizar estudios de la actividad PON1 en modelos OB y OB-STZ en donde se prolongue el tiempo de estudio para evaluar el daño de la actividad de PON1 en fracciones microsomales; asimismo emplear ácidos grasos específicos tales como ácido palmítico y aceite de pescado purificado para medir el efecto sobre la actividad PON1.

## **9. CONCLUSIONES**

Existe una correlación entre la actividad enzimática PON1 de ratas Wistar alimentadas con una dieta baja en proteínas y el peso hepático de tal grupo es el que mostró un peso menor.

Las diferentes dietas influyeron en la actividad enzimática de la PON1, siendo la bajo en proteínas la que ocasionó la más baja actividad de la PON1 a lo largo del todo tratamiento. Los resultados sugieren que los nutrimentos pueden modular la actividad de la PON1.

Los animales diabetizados con estreptozotocina tuvieron una baja actividad de la PON1 a lo largo del experimento.

## 10. BIBLIOGRAFÍA.

Alberti, K. y Zimmet, P. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med.* 1998; 15:539-53.

Allevato, M y Gaviria, J. Envejecimiento. *Act Terap Dermatol.* 2008; 31:154-160.  
American Diabetes Association Standards of medical care in diabetes. *Diabetes care.* 2007;30(Suppl 1):S4-S41.

American Diabetes Association. Executive Summary: Standards of Medical care in diabetes. *Diabetes care.* 2010;33(Suppl 1):S4-S10.

Araya, V. Síndrome metabólico en la enfermedad del hígado graso. *Gastr. Latinoamericana.* 2006;17(2):291-292.

Artola, S., Serrano, R., Barutell, L e Iglesias, R. Recomendaciones de la ADA en la práctica clínica para el manejo de la diabetes mellitus. *Diabetología al día.* 2006. 4:(Suppl 3):25-36.

Asociación Americana de Diabetes (ADA). Todo sobre la diabetes. Dirección: <http://www.diabetes.org>. Acceso: 21/12/09. Actualización: 2009.

Aviram, M., Rosenblat, M., Bisgaier, C., Newton, R., Primo-Parmo, S y La Du, B. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J. Clin Invest.* 1998;101:1581-1590.

Aviram, M., Rosenblat, M., Gaitini, D., *et al.* 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.* 2004; 23:423–33.

Ayala, A., Vasileva, E., Fernández, A, Modol, M., Bellmunt, M., Prat, J., Requena, J., Portero, M y Pamplona, R. Lesión oxidativa de proteínas de hígado y corazón de rata durante el proceso de envejecimiento. *Revista española de geriatría y gerontología.* 2006: 41(1);48-54.

Balkau, B., Charles, M., Drivsholm, T y Borch, K. Frequency of the WHO metabolic syndrome in European cohorts, and an alternative definition of an insulin resistance syndrome. *Diabetes Metab.* 2002;28:364-76.

Baskol, G., Karakucuc, S., y Oner, A. Serum paraoxonase 1 activity in decreed in the active stage in Behcet disease. *J ophthalmol.* 2005;88:1256-8.

Bergua, C., Pascual, I., Casasnovas, J y Laclaustra, M. Síndrome metabólico. Concepto y fisiopatología. *Revista Española de Cardiología.* 2005;5(Supl D):3-10.

Berneis, K y Krauss, R. Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity. *Journal Lipid Res.* 2002;43:363-79.

Bhalchandra, K., Andras, L., Ladislav, D., y Thomas, V. Dietary Fat modulates serum paraoxonasa 1 activity in rats. *Journal of nutrition.* 2000; 130:2427-2433.

Borsheim, E., Tipton, K y Woit, S. Essential amino acid and muscle protein recovery from resistance exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002;283:E648-E657.

Bray, GA., Bouchard, C. y James, WPT. Definitions and proposed current classification of obesity. En: Bray GA., Bouchard, C., James, WPT, editors. *Handbook of obesity.* New York: Marcel Dekker Inc; 1997. p.p. 31-40.

Buchanan, T., Xiang, A y Peters, r. Preservation of pancreatic beta-cell function and prevention of type 2 diabetes by pharmacological treatment of insulin resistance in high-risk hispanic women. *Diabetes.* 2003; 25(Suppl B):B32-46.

Calderín, R., Domínguez, C., Velbes, P., Pérez, L., Cabrera, E y Orlandí, N. Insulinorresistencia e hígado graso no alcohólico, ¿existe relación causa-efecto entre ambas condiciones?. *Rev Cubana Endocrinol.* 2009. 20(Suppl 1):S1561-S2953.

Camps, J., Marsillach, J y Joven, J. Measurement of serum paraoxonase-1 activity in the evaluation of liver function. *World Journal of Gastroenterology.* 2009;15(16):1929-1933.

Canales, A., Sánchez-Muñiz, FJ. Paraoxonasa, ¿algo más que una enzima? *Medicina Clínica.* 2003;121(14):537-548.

Casanueva E., Kaufer HM, Pérez LA, y Arroyo P, 2001. Diabetes mellitus y nutrición. En: *Nutriología Médica.* 2 ed. Editorial Médica Panamericana, S.A. México, D.F. p.p.371.

Charlton, M. Protein metabolism and liver diseases. *Baillière's clinical endocrinology and Metabolism.* 1996;10(4):617-635.

Davies, HG., Richter, RJ., Keifer, M., Broomfield, CA., Sowalla, J., Furlong, CE. The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin. *Nat Genet.* 1996;14:334-6.

De la Calle, H. Los factores ambientales en el desarrollo de la Diabetes tipo 2. *Monográficos de la revista española:* 7(2);59-63

Devendra, D., Lui, E y Eisenbarth, G. Type 1 diabetes: recent developments. *BMJ.* 2004;328:750-4.

Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. American Diabetes Association. Position Statement. *Diabetes Care*. 2001;24:(Suppl-1): S5–S20

Eckel, R. y Krauss, R. American Heart Association call to action: obesity as a major risk factor for coronary heart disease. *AHA Nutrition*. 1998; 97(21):2099-2100.

Eckel, R., Grundy, S y Zimmet, P. The metabolic syndrome. *Lancet*. 2005;365:1115-28.

Federación Mexicana de Diabetes A.C. (FMD) Estadísticas de salud Dirección: [http://www.fmdiabetes.org/v2/paginas/d\\_numeros.php](http://www.fmdiabetes.org/v2/paginas/d_numeros.php). Acceso: 07/05/09.

Ferré, N., Camps, J. y Joven, J. Paraoxonasas, acción antioxidante de las HDL y respuesta inflamatoria. *Cardiovascular risk factor*. 2004; 12(3): 106-107.

Forcato, O. Participación del receptor de VLDL en la producción de apolipoproteínas en hepatocitos humanos. *Reunión científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica Mar del Plata. Medicina ISSN. 0025. 7680*.

Franco, Y., Mendoza, V y Lemini, C. Mecanismos de acción de los efectos protectores de los estrógenos sobre el sistema cardiovascular. *Rev Fac Med UNAM*. 2003; 46(3):101-106.

García, C. Diabetes mellitus gestacional. *Medicina interna de México*. 2008. 24:(Suppl 2):148-56.

García, S. Principales diferencias entre la glucemia basal alterada e intolerancia a la glucosa. *Avances en diabetología*. 2009;25:105-9.

Genuth, S., Alberti, KG., Bennett, P., Buse, J., Defronzo y Kahn, R. Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2003;26:3160-7.

Gerich, JE. The genetic basis of type 2 diabetes mellitus: impaired insulin secretion versus impaired insulin sensitivity. *Endocrinology rev*. 1998; 19: 491-503.

Grundy, S., Cleeman, J., Daniels, S., Donato, K., Eckel, R y Franklin, B. Diagnosis and Management of the metabolic syndrome. *An American Heart Association/National Heart, Lung and Blood Institute scientific statement. Circulation*. 2005;112:2735-52.

Hernández, A., Pasquetti, C., Zúñiga, R y Meléndez, G. Recambio proteico interórgano. *Revista de Endocrinología y Nutrición*. 2003; 11(3):129-135.

Inzucchi, S y Sherwin, R. The prevention of type 2 diabetes mellitus. *Endocrinology Metab Clin*. 2005;34:199-219.

King, H., Aubert, R y Hernán, W. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes care*. 1998;21:1114-31.

Komshian, Y., Abbasi, F., Carantoni, M y Reaven, G. Relationship between several surrogate estimates of insulin resistance and quantification of insulin mediated glucose disposal in 490 healthy nondiabetic volunteers. *Diabetes Care*. 2000;23:171-175.

Kotronen, A y Yki-Järvinen, H. A Novel Component of the Metabolic Syndrome. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2008;28:27-38.

Kudchodkar, B., Lacko, A., Dory, L y Fungwe, T. Dietary Fat Modulates Serum Paraoxonase 1 Activity in Rats. *The Journal of Nutrition*. 2000; 130: 2427–2433.

La Du BN. Structural and functional diversity of paraoxonases. *Nat Med*. 1996; 2:1186 –1187.

Laakso, M. How good a marker is insulin level for insulin resistance?. *Am J Epidemiol*. 1993;137:959-965.

Langer, L., Conway, D., Berkus, M., Xenakis, E y González, O. A comparación of glyburide and insulin in women with gestational diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 2000;343:1134-1138.

Leiter, L., Genest, J., Harris, S., Lewis, G., McPherson, R., Steiner., Woo y Lank, C. Dyslipidemia in Adults With Diabetes. *Canadian Journal of Diabetes*. 2006;30(3):230-240.

López, J y Almudena, S. Diabetes tipo 1. *An Pediatr Contin*. 2003;1(1):15-20.

Lu, J., Li, Q., Xie, H., Chen, Z., Borovitskaya, A. y Maclaren. Identification of a second transmembrane protein tyrosine phosphatase, IA-2 $\beta$ , as an antigen in insulin-dependent diabetes mellitus: precursor of the 37-kDa tryptic fragment. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:2307-11.

Mackness B, Durrington PN, Boulton AJM, Hine D, Mackness MI Serum paraoxonase activity in patients with type I diabetes compared to healthy controls. *Eur J Clin Invest*. 2002; 32: 259-264.

Mackness, M., Arrol, S y Durrington, P. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett*. 1991;286:152-154.

Mackness, MI., Mackness, B., Durrington, PN., Conelly, PW. y Hegele, RA. Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. *Curr Opin Lipidol*. 1996; 7:69-76.

Martínez, S., Tárres, M., Picena, J., Montenegro, S. Gagliardino, J., Gómez, C., D'Octavio, A., Naves, A y Rabasa, S. eSS rat, an animal model for the study of spontaneous non-insulin-dependent diabetes. *Acta diabetol lat.* 1993; 27:329-36.

Mataix, J., Rodríguez, J., Quiles, J., Ochoa, J., Battino, M y López, M. Aceite de oliva y estado oxidativo celular. En: Mataix, J, editor. Aceite de oliva virgen: nuestro patrimonio alimentario (vol. 2). Granada: Universidad de Granada y Puleva Food, 2001; p. 37-38.

Mathews, C., Van Holde, K y Ahern, K, 2002. Metabolismo de los compuestos nitrogenados en : Bioquímica: 3ª ed. Editorial Addison Wesley. p.p.793-804.

Mauricio, D y Mandrup, T. Apoptosis and the pathogeneis of IDDM: a question of life and death. *Diabetes.* 1998;47:1537-43.

Medina, J., Fernández, L y Moreno, R. Approach to the pathogenesis and treatment of non alcoholic steatohepatitis. *Diabetes care.* 2004;27:2057-66.

Nicholson, W., Bolen, S., Witkop, C., Neale, D., Wilson, L y Bass, E. Benefits and risks of oral diabetes agents compared with insulin in women with gestacional diabetes: a systematic review. *Obstet Gynecol.* 2009;113:193-205.

Nielsen, S., Guo, Z., Johnson, CM., et al. Splachnic lipolysis in human obesity. *J Clin Invest.* 2004; 113(11):1582-8.

Nus, M., Sánchez-Muñiz, F y Sánchez-Montero, J. Methodological Aspects and Relevance of the Study of Vegetable Oil, Fat and Lipoprotein Oxidation Using. *Anales de la real academia de farmacia.* 2006;41:5-28

Organización Mundial de la salud. Dirección: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2005/pr44/es/index.html>.

Organización panamericana de la salud. Guías ALAD de diagnóstico, control y tratamiento de la DT2. Dirección: <http://www.paho.org/Spanish/AD/DPC/NC/dia-guia-alad.htm>. Acceso:05/04/10.

Oria, E., Lafita, J., Petrina, E y Argüelles, I. Composición corporal y obesidad. *Anales Navarra.* 2002; (Suppl 1).

Pérez-Méndez, O. Lipoproteínas de alta densidad (HDL). ¿Un objetivo terapéutico en la prevención de aterosclerosis?. *Archivos de cardiología de México.* 2004;74(1); 53-68.

Pozzilli, P y Di, M. Autoimmune diabetes not requiring insulin at diagnosis (latent autoimmune diabetes of the adult): definition, caracterización and potential prevention. *Diabetes Care.* 2001;24:1460-7.

Primo-Parmo, SL., Sorenson, RC., Teiber, J. y La Du, BN. The human paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics*. 1996; 33: 498-507.

Quíroz, A. Control de atherosclerosis en diabetes mellitus. *Archivos de cardiología de México*. 2003: 73(suppl 1);S125-S127.

Rantala, M., Leena, M., Touminen, a., Kaikkonen, J., Jukka, T., Alfthan, G., Aro, A y Antero, K. Dietary Modifications and Gene Polymorphisms Alter Serum Paraoxonase Activity in Healthy Women. *The journal of nutrition*. 2002;132:3012-3017.

Ribas, V. Estudio de las propiedades antiaterogénicas de las HDL de ratones transgénicos de apo A-II humana. *J Biol Chem*. 2005. 45-153.

Ricci, M. NAFLD (Non- Alcoholic Fatty Liver Diseases. *Research Diets*. 2009:2(9):3000

Ruotolo, G y Howard, B. Dislipidemia of the metabolic síndrome. *Curr Cardiol Rep*. 2002;4:494-500.

Sampson, M., Braschi, S., Willis, G y Astley, S. Paraoxonase-1 (PON-1) genotype and activity and *in vivo* oxidized plasma low-densitylipoprotein in Type II diabetes. *Clinical Science* (2005) 109, 189–197.

Scornik, O., Scott, K, Howell y Botbol, V. Protein depletion and replenishment in mice: different roles of muscle and liver. *AJP-Endocrinology and Metabolism*. 1997;273(6):E1158-E1167.

Scott, R., Thyfault, J., Wei, Y y Ibkah, J. Non-alcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome: An update. *Word Journal of gastroenterology*. 2008;14(2):185-192.

Sentí, M., Tomás, M., Fitó, M., Weinbrenner, T., Covas, M., Sala, J., Masiá, R y Marrugat, J. Antioxidant Paraoxonase 1 Activity in the Metabolic Syndrome. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2003;88(11):5422-5426.

Shih, D., Gu, L., Hama, S., Xia, Y., Navab, M., Fogelman, A y Lysis, A. Genetic Dietary Regulation of Serum Paraoxonase Expression and Its Role in Atherogenesis in a Mouse Model. *J. Clin. Invest*. 1996, 1630–1639.

Shih, D., Xia, Y., Wang, X., Miller, E., Castellani, L y Subbanagounder, G. Combined serum paraoxonase knockout/apolipoprotein E knockout mice exhibit increase lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *J Biol Chem*. 2000; 275:17527-17535.

Shiota, G., Umeki, K., Okano, J y Kawasaky, H. Hepatocyte growth factor and acute phase proteins in patients with chronic liver diseases. *J Med*:26:295-3008

Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (SEEDO). Consenso SEEDO 2000 para la evaluación del sobrepeso y la obesidad y el establecimiento de criterios de intervención terapéutica. *Med. Clin. Barc.* 2000. 115: 587-97.

Suleyman, S., Suleyman, A., Kilic, N., Fazilet, E., Suna, A y İlhami, C. Serum arylesterase and paraoxonase activity in patients with chronic hepatitis. *J. Gastroenterology.* 2005;11(46):7351-7354.

The expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus: Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2003;26:3160-3167.

Thoma´s-Moya, E., Gianotti, M., Proenza, A y Lladó, I. The age-related paraoxonase 1 response is altered by long-term caloric restriction in male and female rats. *Journal of Lipid Research.* 2006;47: 2042–2048.

Tomás, M., Latorre, G., Sentí, M.y Marrugat, J.. Función antioxidante de las lipoproteínas de alta densidad: Un nuevo paradigma en la arteriosclerosis. *Rev Esp Cardiol.* 2004; 57:557-69.

Tomás, M., Sentí, M., García-Faria, F., Vila, J., Torrents, A y Covas, M. Effect of simvastatin therapy on paraoxonase activity and related lipoproteins in familial hypercholesterolemic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:2113-2119.

Tomiya, T., Nagoshi, S y Fujiwara, K. Significance of serum human hepatocyte growth factor levels in patients with hepatic failure. *Journal of Hepatology:* 15;1-4.

Watson, A., Berliner, J., Hama, S., La Du, B., Faull, K y Fogelman, A. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest.* 1995;96:2882-91.

Watson, A., Subbanagounder, G., Welsbie, D., Faull, K., Navab, M y Jung, M. Structural identification of a novel pro-inflammatory epoxyisoprostane phospholipid in mildly oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem.* 1999;274:24787-98.

Wigg, A., Thomsom, R., Dymock, R., McCarthy, P., Grose, R y Cummins, A. The role of intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxemia, and tumor necrosis factor alfa in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Gut.* 2001;48:206-211.

World Health Organization. Obesity. Preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation on Obesity. Geneva, Switzerland. *WHO.* Geneva, Switzerland: June 1998.

Zick, Y. Insulin resistance: a phosphorylation based uncoupling of insulin signaling. *Trends cell Biol.* 2001;11:347-41.

Zorrilla, A. El envejecimiento y el estrés oxidativo. *Rev. Cubana Invest Bioméd.* 2002;21(3).