

ACTIVIDAD Y FENOTIPOS DE PARAOXONASA-I EN UNA POBLACIÓN DE ESTUDIANTES UNIVERSITARIOS DE LIMA-PERÚ.

HÉCTOR CIRO CATAÑO MIRAVAL ^{1,2}, ANTHONY MAX CÁRDENAS FERNÁNDEZ ²,
JAYME LUIS CUEVA ESTELA¹, AMPARO I. ZAVALA¹, VÍCTOR IZAGUIRRE ¹,
ELIZABETH CARRANZA ALVA ².

RESUMEN

En el presente estudio se determinó la actividad y fenotipos de Paraoxonasa-1 (PON1) en 89 estudiantes universitarios de Lima-Perú, debido a que estudios previos reportan que el polimorfismo 192 Q/R de PON1, afecta el metabolismo de diversos insecticidas organofosforados (OPs) y de ciertas drogas; así como, su rol protector contra el desarrollo de la aterosclerosis. Se encontró que la actividad media de PON1 en la población estudiada fue 167.01 ± 60.84 U/L. Los fenotipos AA, AB y BB de la actividad PON1 presentaron las frecuencias de 0.236, 0.573 y 0.191 respectivamente. La actividad de PON1 en la población estudiada sigue una distribución unimodal y existe un predominio de los heterocigotos AB sobre los homocigotos AA y BB. El conocimiento de la actividad y los fenotipos de PON1 en esta población ayudaría a identificar individuos susceptibles a la toxicidad por organofosforados y/o con mayor riesgo a desarrollar aterosclerosis y predecir que individuos no responderán favorablemente a una terapia farmacológica que involucre la participación de PON1 en su biotransformación

Palabras clave: PON1, organofosforados, aterosclerosis, farmacogenética, polimorfismo 192 Q/R.

SUMMARY

In the present study, it was measured the Paraoxonase-1 (PON1) activity and phenotypes in 89 universities students from Lima-Peru, because previous studies have reported that the PON1 192 Q/R polymorphism could affect the organophosphorus and drug metabolism as well as its protective effect against to development of atherosclerosis. It has found that the mean PON1 activity in the studied population was 167.01 ± 60.84 U/L. The AA, AB y BB phenotypes from PON1 activity shown frequencies of 0.236, 0.573 and 0.191 respectively. In the studied population PON1 activity has a unimodal distribution and there are more heterozygous individuals AB than homozygous AA or BB. The knowledge of PON1 activity and phenotypes in various populations could be useful for identifying individuals who are more prone to the organophosphorus toxicity or who have a high risk to developed atherosclerosis, and to predict who individuals will not respond to a drug that involve the PON1 participation in its biotransformation.

Keywords: PON1, organophosphorus, atherosclerosis, pharmacogenetics, 192 Q/R polymorphism.

INTRODUCCIÓN

Las paraoxonasas forman una familia de tres enzimas: PON1, PON2 y PON3; la más estudiada es la Paraoxonasa-1 (PON1), esterasa/lactonasa asociada a la lipoproteína de alta densidad (HDL) ⁽¹⁾. Inicialmente, PON1 fue investigada por su capacidad de hidrolizar *in vitro* diversos organofosforados (OPs). Debido a esto, Aldridge (1953) la clasificó como una esterasa «A» para diferenciarla de las esterases «B», representadas por las carboxilesterasas y colinesterasas, que son

inhibidas por OPs ⁽²⁾. Evidencias iniciales que apoyaron la hipótesis de que PON1 tiene un rol importante en la detoxificación de OPs *in vivo* provinieron de comparar entre especies de animales. Así, las aves, que tienen escasa actividad de PON1, fueron más sensibles que las ratas a la toxicidad de varios OPs. En cambio, las ratas fueron más sensibles a la toxicidad de los OPs que los conejos, los cuales tienen siete veces más la actividad de PON1 que las ratas ⁽³⁻⁵⁾. Costa *et al.* ⁽⁶⁾ en estudios posteriores informaron que la administración de PON1 purificada de conejo protegió a las ratas, particularmente, contra la toxicidad de clorpirifosoxon y en menor grado contra paraoxon, metabolitos activos de los insecticidas OPs clorpirifos y paratión respectivamente. Shih *et al.* ⁽⁷⁾ estudiaron la toxicidad de varios OPs en rato-

¹ Laboratorio de Biología Molecular. Instituto de Química Biológica, Microbiología y Biotecnología. Facultad de Farmacia y Bioquímica e

² Instituto de Biología Andina. Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

¹ hectorcm4@yahoo.com

nes manipulados genéticamente, deficientes de PON1 y encontraron una sensibilidad incrementada hacia la toxicidad de estos compuestos.

Por mucho tiempo, se aceptó la existencia de una relación inversa entre las HDL y el riesgo a desarrollar aterosclerosis por un mecanismo incierto⁽⁸⁾. En las dos últimas décadas, se ha demostrado *in vitro* e *in vivo* que PON1 es capaz de hidrolizar derivados específicos de colesterol y/o fosfolípidos oxidados en lipoproteínas de baja densidad (LDL) oxidadas y en lesiones ateroscleróticas⁽⁹⁻¹¹⁾, siendo la principal responsable del rol protector de las HDL contra la aterosclerosis y por ende de las enfermedades cardiovasculares.

El gen *PON1* que codifica para paraoxonasa-1, está localizado en el cromosoma 7q21.3⁽¹²⁾ y es conocido por ser polimórfico. Humbert *et al.*⁽¹³⁾ demostraron que el polimorfismo en la posición 192 de *PON1* origina un cambio del aminoácido Glutamina (Q) por Arginina (R) dando lugar a isoenzimas de baja y alta actividad respectivamente, cuando se utilizó paraoxon como sustrato. Estudios posteriores ampliaron este hallazgo y reportaron que el polimorfismo 192 Q/R afecta la actividad catalítica de *PON1* hacia los OPs, siendo el factor determinante principal de la sensibilidad o resistencia de un individuo a la toxicidad por OPs⁽¹⁴⁻¹⁶⁾. Sin embargo, esto depende del OP al que se esté expuesto, así, *in vitro*, se demostró que la isoenzima *PON1* 192R tiene una mayor actividad hacia paraoxon que la isoenzima *PON1* 192Q, mientras que lo contrario ocurre frente a diazoxon (metabolito activo del OP diazinon) y los agentes de guerra neurológicos soman y sarin⁽¹⁷⁾. Por ello, los individuos que poseen el alelo Q pueden ser más susceptibles que los que tienen R, frente a la exposición de paratión, metilparatión, clortión y armin; todo lo contrario puede suceder frente a diazinon, soman y sarin⁽¹⁸⁾.

Jarvick *et al.*⁽¹⁹⁾, en un estudio realizado en 212 hombres caucásicos, encontraron una baja actividad de *PON1* en sujetos con enfermedad de la arteria carótida severa comparada con los controles sugiriendo que el nivel de la actividad de *PON1* puede ser un predictor más de enfermedades cardiovasculares. Otros estudios también han encontrado la asociación entre baja actividad de *PON1* y enfermedades coronarias y de la arteria carótida. James *et al.*⁽²⁰⁾ encontraron que la actividad de *PON1* en pacientes diabéticos tipo 2 fue menor en aquellos con enfermedades coronarias que aquellos sin enfermedades coronarias. Mackness *et al.*⁽²¹⁾ reportaron una baja actividad

de *PON1* en pacientes con enfermedades coronarias utilizando 417 casos y 282 controles.

Estudios recientes describen que *PON1* está involucrada en el metabolismo de algunos fármacos y, que la variación genética interindividual de *PON1* puede ser relevante en la efectividad y/o efectos indeseados de una droga. Billecke *et al.*⁽²²⁾, encontraron que el diurético espironolactona y las drogas hipocolesterolémicas mevastatina, lovastatina y simvastatina son hidrolizadas por *PON1* y que los alelos Q y R las hidrolizan con similar eficiencia. Además, algunas prodrogas pueden ser bioactivadas o inactivadas *in vivo* por *PON1*. Por ejemplo, los glucocorticoides g-lactonas son inactivados⁽²³⁾, mientras que el antibacteriano prulifloxacina es bioactivado⁽²⁴⁾. La activación de la prulifloxacina ocurre a través de una hidrólisis, que es mayor por la isoenzima *PON1* 192Q. Estas evidencias sugieren que debe tomarse en cuenta la variación genética interindividual de *PON1* en el diseño de fármacos nuevos para reducir el fracaso terapéutico y/o efectos indeseados.

En el Perú, la mayoría de la población rural se dedica a actividades agrícolas en las que se utiliza un gran número de plaguicidas, entre ellos los organofosforados. Además, según el Ministerio de Salud (MINSA) para el año 2000, una de las principales causas de muerte fueron las enfermedades cardiovasculares (18.2%). Debido a lo mencionado anteriormente y a que *PON1* esta involucrada en la susceptibilidad hacia la toxicidad de Ops, el desarrollo de aterosclerosis y el metabolismo de ciertos fármacos, el objetivo de este estudio fue determinar el perfil de distribución de la actividad y los fenotipos de *PON1* en una población de estudiantes universitarios de Lima-Perú. Alternativamente, el polimorfismo 192 Q/R puede identificarse mediante análisis de ADN (genotipificación molecular de *PON1*) o análisis bioquímico (fenotipado de *PON1*), correspondiéndose los genotipos con los fenotipos (QQ = AA, QR = AB y RR = BB)⁽²⁵⁾.

MATERIAL Y MÉTODOS

Población estudiada y recolección de muestras

Participaron voluntariamente 89 estudiantes nacidos en Lima (55 hombres y 49 mujeres) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, cuyas edades comprendían entre 18 y 31 años. Fueron seleccionados aleatoriamente, sin ningún vínculo de

consanguinidad entre ellos. Todos los participantes firmaron una carta de consentimiento informado. De cada persona se extrajo 4 mL de sangre en tubos vacutainer con anticoagulante heparina, las muestras se almacenaron en congelación hasta su procesamiento.

Determinación Cuantitativa de la Actividad Paraoxonasa-1. La actividad de PON1 fue ensayada con y sin la presencia de NaCl 1M para determinar la actividad con estimulación salina (PON1cs) y la actividad basal (PON1). Se utilizó el buffer Glicina-NaOH (50 mM, pH = 10.0), conteniendo de cloruro de calcio 1 mM y de paraoxon 1 mM (sustrato), según lo descrito por Reiner y Radic⁽²⁶⁾. La formación del *p*-nitrofenol fue leída a 405 nm y a 25°C en un espectrofotómetro Hewlett Packard 8452A.

Determinación Cuantitativa de la Actividad Arilesterasa. La actividad arilesterasa (ArE) fue determinada utilizando el buffer TRIS-HCl (100 mM, pH = 8.0), conteniendo cloruro de calcio 1 mM y de fenilacetato 1 mM (sustrato), según lo descrito por Junge y Klees⁽²⁷⁾. La formación de fenol fue leída a 270 nm y a 25°C en un espectrofotómetro Hewlett Packard 8452A.

Determinación de los Fenotipos de PON1. El cociente PON1cs/ArE fue utilizado para determinar

los fenotipos como ha sido descrito por Eckerson *et al.*⁽²⁸⁾.

Análisis estadístico. En el procesamiento de los datos, se utilizó el paquete estadístico SPSS (versión 11.0). Las frecuencias alélicas fueron calculadas por el método denominado Gene-counting. Se utilizó la prueba del Chi-cuadrado (X^2) para estimar si las frecuencias alélicas estuvieron desviadas del equilibrio de Hardy-Weinberg. Las actividades enzimáticas, cociente PON1cs/ArE y la edad fueron analizadas visualmente mediante la inspección de sus histogramas de frecuencias de distribución, y se evaluó si tenían una distribución normal usando la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Las diferencias de medias entre ambos sexos fueron analizadas mediante la aplicación de *t*-Student y *U*-Mann Whitney (prueba no-paramétrica).

RESULTADOS

El perfil de distribución de las enzimas estudiadas y la edad es mostrado en la Tabla 1. La actividad PON1, PON1cs y ArE estuvieron normalmente distribuidas (Fig. 1A), pero el cociente PON1cs/ArE mostró una distribución trimodal (Fig.1B), identificándose por inspección visual la existencia de tres poblaciones (grupos de alta, intermedia y baja actividad). La edad no presentó una distribución normal.

TABLA 1. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DE PON1 EN LA POBLACIÓN PARTICIPANTE

Enzima	Media \pm S.D.	Rango	Kurtosis	Skewness	Normal ^a
PON1 (U/L)	167.01 \pm 60.84	1.53-344.35	0.359	0.004	p = 0.200
PON1cs (U/L)	482.21 \pm 258.15	58.56-1242.61	0.077	0.379	p = 0.200
ArE (KU/L)	64.08 \pm 20.97	20.65-113.08	-0.449	0.043	p = 0.200
PON1cs/ArE	7.50 \pm 3.36	1.70-14.85	-0.570	0.017	p = 0.049
Edad	21.85 \pm 2.10	18.00-31.00	4.212	1.415	p = 0.000

^a Distribución Normal, Prueba de Kolmogorov-Smirnov. p = significancia.

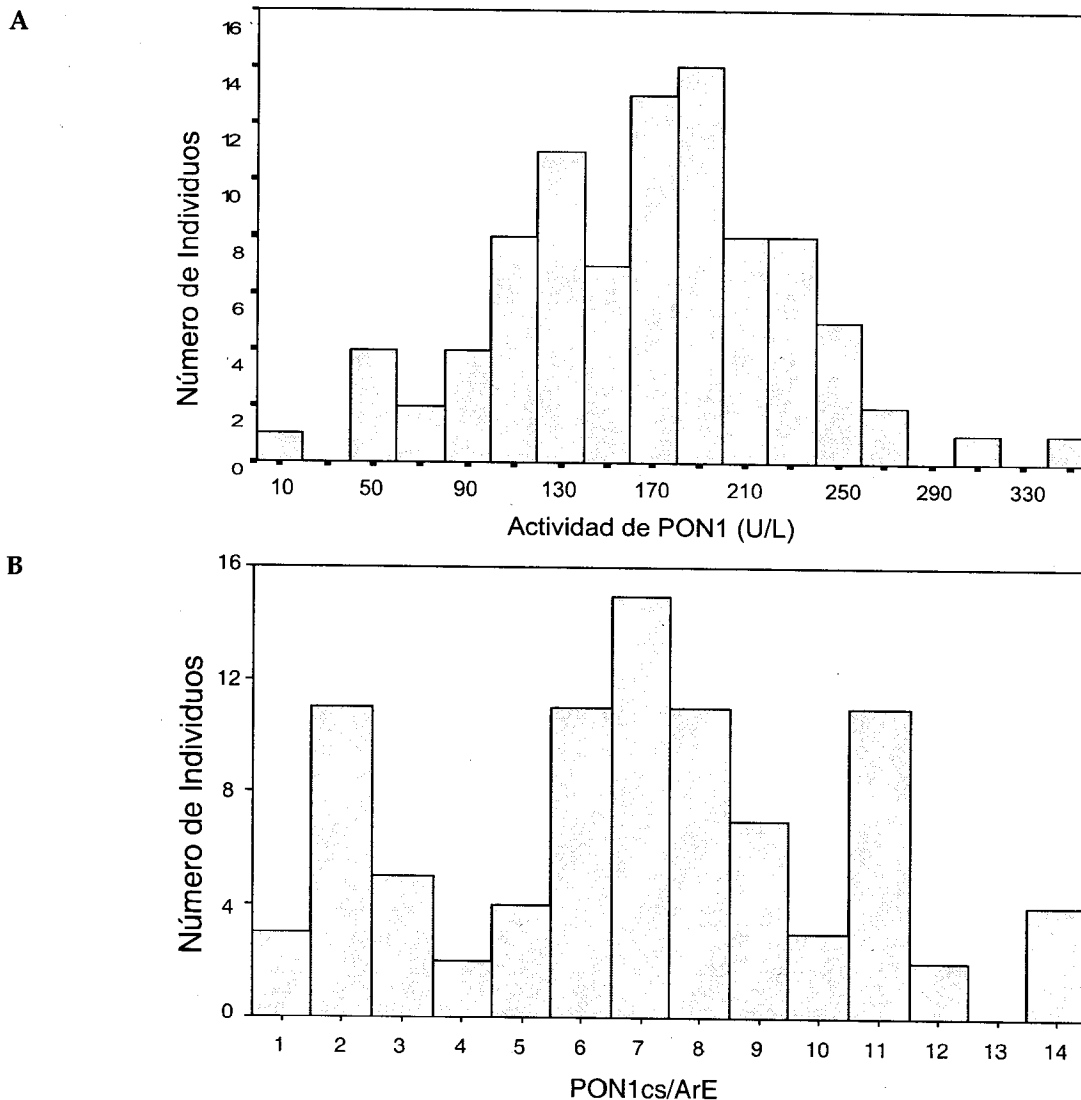


Figura 1. Histogramas de frecuencias de distribución: A, actividad enzimática de PON1. B, cociente de la actividad enzimática de PON1 con estimulación salina (PON1cs) dividido por la actividad Arilesterasa (ArE).

Cuando las medias de las actividades PON1, PON1cs, ArE y el cociente PON1cs/ArE fueron estratificados según sexo (Tabla 2), no se observó

diferencia significativa de medias en ambos sexos (PON1: $p = 0.548$, PON1cs: $p = 0.782$, ArE: $p = 0.789$ y PON1cs/ArE: $p = 0.770$).

TABLA 2. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DE PON1 ESTRATIFICADAS POR SEXO

Enzima	Masculino (n = 42)	Femenino (n = 47)	<i>p</i>
PON1 (U/L)	171.14 ± 63.05	163.31 ± 59.22	0.548 ^a
PON1cs (U/L)	490.28 ± 263.66	474.99 ± 255.77	0.782 ^a
ArE (KU/L)	63.44 ± 21.59	64.64 ± 20.60	0.789 ^a
PON1cs/ArE*	7.65	7.61	0.770 ^b

^a P prueba *t*. * Mediana.

^b Prueba U-Mann Whitney. *p* = significancia.

Los fenotipos de PON1 se determinaron de acuerdo al método descrito por Eckerson *et al.* (28), tomando arbitrariamente los siguientes puntos antimodales

para los fenotipos: AA de 1.70 a 4.5, AB de 4.6 a 11.00 y BB de 11.1 a 14.9. En la Tabla 3 se muestra las frecuencias fenotípicas y alélicas de PON1.

TABLA 3. FRECUENCIAS FENOTÍPICAS Y ALELICAS DE LAS ISOENZIMAS A Y B DE PON1.

Fenotipos	n	Frecuencia Fenotípica	X ² H.W. (p)	Alelos	Frecuencia Alélica
AA	21	0.236	1.920 (0.383)	A	0.522
AB	51	0.573			
BB	17	0.191			

H.W., Hardy-Weinberg; X², Chi-cuadrado; p, significancia.

DISCUSIÓN

Diversos estudios describen una gran variación en la distribución mundial de las frecuencias alélicas del polimorfismo 192 Q/R de PON1 (Tabla 4). En la población estudiada la frecuencia del alelo A (equivalente a PON1 192Q) fue mayor que la de B (equivalente a PON1 192R), como se observa en la Tabla 3. Es difícil afirmar con exactitud el

mecanismo de como se generó esta distribución, es probable que sea el resultado de la contribución de los genes de diversos grupos étnicos compuestos principalmente por elementos presentes en españoles (alelo PON1 192Q), trazas provenientes de los antepasados indígenas de la población peruana actual (alelo desconocido) y además de una menor pero significativa contribución africana (alelo PON1 192R) y oriental (alelo PON1 192R).

TABLA 4. FRECUENCIAS GENOTÍPICAS Y ALÉLICAS DEL POLIMORFISMO PON1 192Q/R EN VARIAS POBLACIONES DEL MUNDO

Continente	Población	n	Frecuencia genotípica de PON1			Frecuencia alélica de PON1	
			QQ	QR	RR	Q	R
ÁFRICA	Etiopianos (30)	169	0.367	0.450	0.183	0.592	0.408
	Beninianos (30)	98	0.184	0.408	0.408	0.388	0.612
ASIA	Japoneses (31)	431	0.137	0.422	0.441	0.348	0.652
	Chinos (32)	218	0.138	0.440	0.422	0.358	0.642
	Hindus (33)	190	0.479	0.400	0.121	0.679	0.321
EUROPA	Alemanes (34)	2784	0.510	0.415	0.075	0.718	0.282
	Holandeses (35)	614	0.477	0.438	0.085	0.704	0.296
	Finlandeses (36)	169	0.515	0.444	0.041	0.737	0.263
	Italianos (Región Norte) (30)	179	0.497	0.380	0.123	0.687	0.313
	Italianos (Sardinia) (30)	161	0.571	0.360	0.068	0.752	0.248
	Espanoles (Granada) (37)	195	0.496	0.416	0.088	0.704	0.296
AMÉRICA	Turcos (38)	381	0.491	0.401	0.108	0.692	0.308
	Euro Brasileños (39)	101	0.485	0.416	0.099	0.693	0.307
	Afro Brasileños (39)	70	0.214	0.514	0.272	0.471	0.529
	Indios Cayapa (Ecuador) (30)	83	0.060	0.301	0.639	0.211	0.789
	Estados Unidos (Norte) (29)	376	0.519	0.420	0.061	0.728	0.272
	Peruanos (Lima)*	89	0.236	0.573	0.191	0.522	0.478

*Los genotipos QQ, QR y RR procedente de esta investigación, son equivalentes a los fenotipos AA, AB y BB respectivamente.

En la población estudiada también se puede observar un predominio de los heterocigotos AB (equivalente a QR) sobre los homocigotos AA (equivalente a QQ) y BB (equivalente a RR), registrando la frecuencia más alta de heterocigotos que las descritas previamente (Tabla 2). No hay reportes que asocien la presencia de heterocigotos del polimorfismo PON1 192Q/R con algún factor que les proporcione una ventaja sobre los homocigotos, sugiriendo que el predominio de heterocigotos AB en la población estudiada sería el resultado, del mestizaje y/o producido al azar.

Estudios previos han reportado una distribución bimodal y polimodal para la actividad de PON1^(35,38). Sin embargo, la actividad de PON1 en la población estudiada presentó una distribución unimodal (Figura 1A), esto se debe a la alta frecuencia de individuos con actividad intermedia presente en la población estudiada. El cociente PON1cs/ArE tuvo una distribución trimodal (Figura 1B) como se esperaba⁽²⁸⁾, indicando la existencia de 2 poblaciones de alta (rango de 11.1-14.9) y baja actividad (rango de 1.70-4.5) pero con evidencia de una tercera población con actividad intermedia (rango de 4.6-11.0). Como se describen en otros estudios^(37,41), los parámetros enzimáticos determinados en la población estudiada no estuvieron influidos por el sexo (Tabla 2). En la población estudiada, la actividad de PON1 sigue una distribución unimodal y existe un predominio de los heterocigotos AB sobre los homocigotos AA y BB.

Conocer la actividad y los fenotipos de PON1 en diversas poblaciones es de gran utilidad para estimar la susceptibilidad que cada individuo tiene a la toxicidad por OPs, el riesgo individual hacia enfermedades cardiovasculares, así como, para predecir que individuos no responderán de manera esperada a una terapia farmacológica que involucre la participación de PON1 en su biotransformación, por lo cual, es importante continuar con este tipo de investigaciones.

AGRADECIMIENTOS: A la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por financiar parcialmente este trabajo de tesis de H.C.M. para optar al título de Químico-Farmacéutico, mediante RD N°. 031-D-FFB-2004.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Draganov DI, La Du BN. Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2004; 369: 78-88.
2. Aldridge WN. Serum esterases I: Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate and method for their determination. *Biochem.* 1953a; J53: 110-117.
3. Aldridge WN. Serum esterases II: An enzyme hydrolysing diethyl-p-nitrophenyl phosphate (E-600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera. *Biochem.* 1953b; J 53: 117-124.
4. Brealey CB, Walker CH, Baldwin BC. A-esterase activities in relation to the differential toxicity of pirimiphos-methyl to birds and mammals. *Pestic Sci.* 1980; 11: 546-554.
5. Costa LG, Ritcher RJ, Murphy SD, Omenn GS, Motulsky AG, Furlong CE. Species differences in serum paraoxonase correlate with sensitivity to paraoxon toxicity. In: Costa LG, Galli CL, Murphy SD, eds. *Toxicology of pesticides: Experimental, Clinical and Regulatory Perspectives.* Heidelberg: Springer-Verlag, 1987: 262-266.
6. Costa LG, McDonal BE, Murphy SD, Ritcher RJ, Motulsky AG, Furlong CE. Serum paraoxonase and its influence on paraoxon and chlorpirifos oxon toxicity in rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1990; 103: 66-76.
7. Shih DM, Gu L, Xia YR, Navab M, Li WF, Hama S, Castellani LW, Furlong CE, Costa LG, Fogelman Am, Lulis AJ. Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature* 1998; 394: 284-287.
8. Guyton AC, Hall JE. Atherosclerosis en *Tratado de Fisiología Médica.* 1998; p. 948-949. McGraw-Hill interamericana.
9. Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. Paraoxonase and Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21: 473-480
10. Tward A, Xia YR, Wang XP, Shi YS, Park C, Castellani LW, Lulis AJ, Shih DM. Decreased atherosclerotic lesion formation in human serum paraoxonase transgenic mice. *Circulation.* 2002; 106: 484.
11. Aviram M, Hardak E, Vaya J, Mahmood S, Milo S, Hoffman A, Billecke S, Draganov D, Rosenblat M. Human serum paraoxonases (PON1) Q y R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerosis lesions: Pon1 esterase and peroxidase-like activities. *Circulation.* 2000; 101:2510-2517.

12. Mochizuki H, Scherer SW, Xi T, Nickle DC, Majer M, Huizenga JJ, Tsui LC, Prochazka M. Hum PON2 gene at 7q21.3: cloning, multiple mRNA forms, and missense polymorphisms in the coding sequence. *Gene*. 1998; 213: 149-157.
13. Humbert R, Adler DA, Disteché CM, Hassett C, Omiecinski CJ, Furlong CE. The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nature Genet*. 1993; 3: 73-76
14. Cherry N, Mackness MI, Durrington P, Povey A, Dippnal M, Smith T, Mackness B. Paraoxonase polymorphisms in farmers attributing ill health to sheep dip. *Lancet*. 2002; 359: 763-764.
15. Sözmen EY, Mackness B, Sözmen B, Durrington P, Girgin FK, Aslan L, Mackness M. Effect of organophosphate intoxication on human serum paraoxonase. *Human Experimental Toxicology*. 2002; 21: 247-252.
16. Akgür SA, Öztürk P, Solak I, Moral AR, Ege B. Human serum paraoxonase (PON1) activity in acute organophosphorus insecticide poisoning. 2003; 133: 136-140.
17. 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: 334-336.
18. Mackness B, Durrington PN, Mackness MI. Human serum paraoxonase. *Gen. Pharmacol*. 1998; 31: 329-336.
19. Jarvick Gp, Rosek LS, Brophy VH, Hatsukami TS, Ritcher RJ, Schellenberg GD, Furlong CE. Paraoxonase (PON1) phenotype is a better predictor of vascular disease than is PON1_{192Q} y PON1₅₅ genotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 2441-2447.
20. James RW, Leviev I, Ruiz J, *et al*. Promoter polymorphism T(-107)C of the paraoxonase PON1 gene is a risk factor for coronary heart disease in type 2 diabetic patients. *Diabetes*. 2000; 49: 1390-93.
21. Mackness B, Davies GK, Turkie W, *et al*. Paraoxonase status in coronary heart disease: Are activity and concentration more important than genotype?. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001; 21: 1451-57.
22. Billecke S, Draganov D, Counsell R, Stetson P, Watson C, Hsu C, La Du BN. Human serum paraoxonase (PON1) isozymes Q and R hydrolyze lactona and cyclic carbonate esters. *Drug Meta Dispos*. 2000; 28: 1335-1342.
23. Biggadike K, Angell RM, Burgess CM, Farrell RM, Hancock AP, Harker AJ, Irving WR, Ioannou C, Procopiou PA, Shaw RE, Solanke YE, Singh OM, Snowden MA, Stubbs RJ, Walton S, Weston HE. Selective plasma hydrolysis of glucocorticoid gamma-lactones and cyclic carbonates by the enzyme paraoxonase: an ideal plasma inactivation mechanism. *J Med Chem*. 2000; 43 (1):19-21.
24. Tougou K, Nakamura A, Watanabe S, Okuyama Y, Morino A. Paraoxonase has a major role in the hydrolysis of prulifloxacin (NM441), a prodrug of a new antibacterial agent. *Drug Metab Dispos*. 1998; 26: 355-359.
25. Adkins S, Gan KN, Mody M, La Du BN. Molecular basis for the polymorphic forms of human serum paraoxonase/arylesterase: glutamine or arginine at position 191, for the respective A or B allozymes. *Am. J. Hum. Genet*. 1993 ; 52:598-608.
26. Reiner E and Radic Z. Method for measuring human plasma paraoxonase activity. Course on analytical procedures for assessment of exposure to organophosphorus pesticides. In *Manual of analytical methods*. 1985, p. 62-70. Cremona, Italy.
27. Junge W and Kless H. Arylesterase. In *Methods of enzymatic analysis*, eds. Bergmeyer HU, Bergmeyer J and Grabi M. 1984; Vol. IV, p. 8-14. Weinheim: Verlag Chemie.
28. Eckerson HW, WYTE CM, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. *Am. J. Hum. Genet*. 1983; 35:1126-1138.
29. Brophy AH, Jampsa RL, Clendenning JB, McKinstry, Jarvik GP, Furlong CE. Effects of 5' regulatory-Region polymorphisms on paraoxonase-gene(PON1) expression. *Am J Hum Genet*. 2001; 68: 1428-1436
30. Scacchi R, Corbo RM, Rickards O and De Estefano G.F. New data on the world distribution of paraoxonase (PON1 Gln192àArg) gene frequencies. *Human Biology*. 2003; 75: 365-373.
31. Imai Y, Morita H, Kurihara H, Sugiyama T, Kato N, Ebihara A, Hamada C, Kurihara Y, Shindo T, Oh-Hashi Y and Yasaki Y. Evidence for association between paraoxonase gene polymorphism and atherosclerotic diseases. *Atherosclerosis*. 2000; 149: 435-442.
32. Ko YL, Ko YS, Wang SM, Hsu LA, Chang CJ, Chu PH, Cheng NJ, Chen WJ, Chiang CW, Lee YS. The Gln-Arg191 polymorphism of the human paraoxonase gene is not associated

- with the risk of coronary artery disease among Chinese in Taiwan. *Atherosclerosis*. 1998; 141: 259-264.
33. Sanghera DK, Aston CE, Saha N, Kamboh MI. DNA polymorphisms in two paraoxonase genes (PON1 and PON2) are associated with the risk of coronary heart disease. *Am J Hum Genet*. 1998; 62: 36-44.
 34. Gardemann A, Philipp M, Hess K, Kats N, Tillmanns H and Haberbosch. The paraoxonase Leu-Met54 and Gln-Arg191 gene polymorphism and ethnic distribution differences of human serum paraoxonase. *Am J Phys Anthropol*. 2000; 62: 235-241.
 35. Heijmans BT, Westendorp RGJ, Lagaay AM, Knook DL, Kluft C, Slagboom PE. Common paraoxonase gene variants, mortality risk and fatal cardiovascular events in elderly subjects. *Atherosclerosis*. 2000; 149: 91-97.
 36. Antikainen M, Murtomaki S, Syvanne M, Pahlman R, Tahvanainen E, Jauhiainen M, Frick MH, Ehnholm C. The Gln-Arg 191 polymorphism of the human paraoxonase gene (HUM-PONA) is not associated with risk of coronary artery disease in Finns. *J Clin Invest*. 1996; 98: 883-885.
 37. Hernandez AF, Gonzalvo MC, Gil F, Rodrigo L, Villanueva E, Pla A. Distribution profiles of paraoxonase and cholinesterase phenotypes in a Spanish population. *Chem-Biol Interact*. 1999; 119-120: 201-209.
 38. Aynacioglu AS, Cascorbi I, Mrozikiewicz PM, Nacak M, Tapanyigit E and Roots L. Paraoxonase 1 mutations in a Turkish population. *Toxicol Appl. Pharmacol*. 1999; 157: 174-177.
 39. Allebrandt KV, Souza RL, Chautard-Freire-Maia. Variability of the paraoxonase gene (PON1) in Euro- and Afro-Brazilians. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2002; 180: 151-156.
 40. Playfer JR, Eze LC, Bullen MF, Evans DA. Genetic polymorphism and interethnic variability of paraoxonase activity. *J Med Genet*. 1976; 13: 337-342.
 41. Carrera V, Llopis I, Sastre J, Sogorb MA, Vilanova E. Distribution of serum paraoxon hydrolyzing activity in a large Spanish population using a routine automatized method in clinical laboratory. *J Anal Toxicol*. 2003; 27(5): 290-293.