

Análisis de la actividad paraoxonasa (PON1) y de los polimorfismos *PON1* 192 y *PON1* 55 en la población prepuberal del Estudio Cuatro Provincias*

Carmen Garcés, Laura López-Simón, Rafael Rubio, Mercedes Benavente, Beatriz Cano, Enrique Viturro y Manuel de Oya, en nombre de los investigadores del Estudio Cuatro Provincias

Unidad de Lípidos. Fundación Jiménez Díaz. Universidad Autónoma. Madrid. España.

Introducción. La paraoxonasa 1 (PON1) es una éster hidrolasa presente en las lipoproteínas de alta densidad (HDL), relacionada con la eliminación de componentes oxidados de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y por ello con el riesgo cardiovascular. Nuestro estudio analiza la actividad PON1 y los polimorfismos 192 y 55 del gen *PON1* en los niños de edad prepuberal integrantes del Estudio Cuatro Provincias.

Métodos. La población de estudio la constituyen 1.275 niños de 6 a 8 años. La actividad PON1 en suero se determinó mediante la hidrólisis de paraoxon. Los polimorfismos genéticos *PON1* 192Q/R y *PON1* 55M/L se analizaron mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y posterior análisis de restricción.

Resultados. En nuestra población la frecuencia de los alelos *PON1* 192R y *PON1* 55M es del 30 y el 38%, respectivamente, sin diferencias

significativas entre provincias. La actividad PON1 es más elevada en Orense y más baja en Murcia, tanto en la población total como para cada uno de los genotipos. En la provincia de Orense se observaron correlaciones significativas entre la actividad PON1 y los valores plasmáticos de colesterol total (CT), colesterol unido a HDL (cHDL) y apolipoproteína AI (apo AI). El análisis de regresión muestra que el polimorfismo *PON1* 192Q/R es el principal determinante de la actividad PON1 en nuestra población.

Conclusiones. La frecuencia de los polimorfismos *PON1* 192 y *PON1* 55 no difiere significativamente entre provincias. Sin embargo, a pesar de que el polimorfismo *PON1* 192 es el principal determinante de la actividad PON1, Orense presenta la actividad PON1 más alta y Murcia la más baja, lo que sugiere que ya a esta edad existen factores que regulan esa actividad dentro de cada genotipo.

Palabras clave:

Población infantil. Actividad paraoxonasa. Polimorfismos genéticos.

*Al final del artículo se relacionan los investigadores del Estudio Cuatro Provincias.

Este trabajo ha sido parcialmente subvencionado por la beca concedida por la FEA/SEA para la Investigación Clínico-Epidemiológica en el año 2003, en el XVI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Arteriosclerosis, celebrado en Marbella.

Correspondencia: Dra. C. Garcés.
Unidad de Lípidos. Fundación Jiménez Díaz.
Avda. Reyes Católicos 2, 28040 Madrid. España.
Correo electrónico: cgarcés@fjd.es

Recibido el 1 de agosto de 2007 y aceptado el 7 de septiembre de 2007.

SERUM PARAOXONASE ACTIVITY AND *PON1* 192 AND *PON1* 55 POLYMORPHISMS IN PREPUBERAL CHILDREN. THE FOUR PROVINCES STUDY

Background. Paraoxonase (PON1) is an ester hydrolase related to the elimination of oxidized compounds of low-density lipoprotein (LDL)

particles and therefore to cardiovascular risk. The aim of the present study was to analyze the relationship between serum PON1 activity and *PON1 192* and *55* polymorphisms in the prepuberal children included in the Four Provinces Study.

Methods. The study population included 1,275 children aged 6 to 8 years old. Serum PON1 activity was measured by paraoxon hydrolysis. *PON1 192Q/R* and *PON1 55M/L* polymorphisms were analyzed by polymerase chain reaction and restriction analysis.

Results. In the population as a whole, the prevalence of the less common *PON192R* allele was 30% and that of the *PON55M* allele was 38%, without significant differences in the frequencies between provinces. PON1 activity was highest in Orense and lowest in Murcia, both in the group as a whole and within each genotype. In Orense, significant correlations between PON1 activity and plasma total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein AI levels were found. Regression analysis showed that the *PON1 192Q/R* polymorphism is the main determinant of PON1 activity in our population.

Conclusions. No significant differences between provinces in the frequencies of the *PON192* and *PON55* polymorphisms were found. However, although the *PON192* polymorphism is the main determinant of PON1 activity, Orense showed the highest activity and Murcia the lowest for all the genotypes, suggesting that already at this age some factors are regulating PON1 activity for each genotype.

Key words:

Children. Paraoxonase 1 activity. Genetic polymorphisms.

Introducción

La enfermedad cardiovascular es la manifestación clínica de un proceso que se inicia en las primeras décadas de la vida, la aterosclerosis¹, y que evoluciona de forma asintomática y, en general, sin expresión clínica hasta la edad adulta. La presencia de factores de riesgo en la edad infantil se ha relacionado con la incidencia de cardiopatía isquémica (CI) en el adulto². En el Estudio Cuatro Provincias hemos analizado diversos factores de riesgo cardiovascular en niños de 6 a 8 años de 4 zonas españolas que presentan diferencias importantes en las tasas de mortalidad por CI en la edad adulta: Madrid, Orense, Cádiz y Murcia³. Uno de los datos

interesantes de nuestro estudio es el referente a los elevados valores plasmáticos de colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (cHDL) en nuestros niños⁴, que han permanecido altos y estables en los últimos años⁵. Estos elevados valores de cHDL en niños pueden estar contribuyendo a explicar la baja mortalidad cardiovascular existente en España a pesar de la elevada presencia de factores de riesgo⁶.

Al efecto protector asociado a las HDL por su participación en el transporte inverso del colesterol, se añade el efecto antioxidante que las HDL ejercen sobre las lipoproteínas de baja densidad (LDL)^{7,8}. Estas propiedades antioxidantes están vinculadas a la presencia de enzimas antioxidantes en la partícula HDL, tales como la paraoxonasa, capaces de frenar el proceso oxidativo de las LDL, retrasando o previniendo el desarrollo del proceso aterosclerótico⁹. La paraoxonasa 1 (PON1) es una éster hidrolasa que destruye los fosfolípidos e hidroperóxidos oxidados presentes en la LDL¹⁰⁻¹², destruyendo de esta forma su actividad biológica y restaurando una LDL normal para acoplarse a su receptor. La región codificante del gen de la PON1 presenta 2 polimorfismos mayoritarios: uno de ellos originado por una sustitución arginina por glutamina en el codón 192 (*192 Q/R*)¹³, considerado como el determinante mayor de la actividad sérica de la paraoxonasa¹⁴, y el otro originado por una sustitución metionina/leucina en la posición 55 (*55 M/L*)¹⁵.

La actividad PON1 del suero se ha encontrado disminuida en sujetos con infartos de miocardio^{16,17} y con hipercolesterolemia familiar¹⁸, y se ha asociado a riesgo cardiovascular aumentado¹⁹. Sin embargo, la asociación de los polimorfismos con la enfermedad no es tan consistente; así, hemos encontrado un grupo de población en Canadá donde la mortalidad por CI es baja y el alelo *PON-192 R* está aumentado²⁰, y sin embargo, no se observa esta asociación en poblaciones estudiadas en Italia²¹ o Francia²². La discrepancia en los resultados hace necesario estudiar los distintos aspectos relacionados con la paraoxonasa en cada población para evaluar su relación con el riesgo cardiovascular, así como analizar los factores que puedan estar relacionados con su actividad.

Por todo ello, en el presente trabajo nos propusimos analizar los valores de actividad PON1 y los polimorfismos *PON1 192Q/R* y *PON1 55M/L* en los niños de edad prepuberal que integran el Estudio Cuatro Provincias y evaluar la relación de estos aspectos con las variables antropométricas y bioquímicas en nuestra población.

Material y métodos

Diseño y sujetos de estudio

El estudio se llevó a cabo en muestras de suero y ADN de 1.275 niños de 6 a 8 años (media 6,7 años) integrantes del Estudio Cuatro Provincias, estudio transversal, destinado a analizar factores de riesgo cardiovascular en población infantil de 4 provincias españolas con distintas tasas de mortalidad por CI³. La selección de los niños del Estudio Cuatro Provincias se realizó mediante muestreo aleatorio, por conglomerados de los centros escolares, estratificados por sexo y nivel socioeconómico. El protocolo del estudio cumple con las normas de Helsinki y la legislación española sobre investigación clínica en humanos, y ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de la Fundación Jiménez Díaz de Madrid. Se remitió una carta a los padres de los niños con información sobre los objetivos y procedimientos del estudio y se obtuvo la autorización escrita de los padres. Se excluyó a los niños que, según comunicado de los padres, padecían alteraciones metabólicas, endocrinas, hepáticas o renales.

Determinación de la actividad paraoxonasa

La actividad paraoxonasa en suero se determinó mediante espectrofotometría, según el método descrito por Mackness et al¹⁸ con mínimas modificaciones. La mezcla de reacción consta de 500 μ l de una solución con una concentración de sustrato paraoxón de 2,22 mmol/l en buffer 0,1 mol/l Tris-HCl a pH 8,0 que contenía 2 mmol/l de CaCl₂ y 50 μ l de suero. La generación de p-nitrofenol se mide según su absorbancia a una longitud de onda de 405 nm a 37 °C, de forma continua en un espectrofotómetro. La actividad PON1 se expresó en U/l.

Determinación de los genotipos de paraoxonasa

Polimorfismo 192. Se determinó según la técnica descrita por Humbert et al²³ en 1993. Como producto de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se obtiene un fragmento de 99 pares de bases que es digerido con la enzima de restricción Alw I. Los productos de esta digestión se separan por medio de electroforesis en gel de acrilamida al 12%. En la posición 192 la sustitución puntual de arginina por glutamina crea un único sitio de corte para la enzima Alw I; el alelo Q (glutamina) corresponde a un fragmento sin digerir de 99 pares de bases, mientras que el alelo R (arginina) origina 2 fragmentos, uno de 65 pb y otro de 34 pb.

Polimorfismo 55. Se determinó, al igual que el polimorfismo 192, por la técnica descrita por Humbert et al²³; como producto de PCR se obtiene un fragmento de 170 pares de bases que será digerido con la enzima Hsp 92 II; los productos de la digestión serán separados por electroforesis en gel de acrilamida al 8%. En la posición 55 puede aparecer una metionina o una leucina, el alelo M (metionina) corresponde a un fragmento no digerido de 170 pares de bases, y el alelo L (leucina) da lugar a 2 fragmentos, uno de 126 y otro de 44 pares de bases¹⁵.

Método estadístico

La comparación de las frecuencias de genotipos y alelos entre provincias se realizó mediante la prueba de la χ^2 . Las diferencias entre provincias se evaluaron mediante el análisis ANOVA. Dado que las distribuciones de los valores de actividad PON1 en suero no siguieron una distribución normal, los análisis estadísticos se llevaron a cabo después de su transformación logarítmica. Las correlaciones entre actividad paraoxonasa y las variables bioquímicas se estimaron mediante coe-

ficientes de correlación de Spearman después de ajustar por peso. El análisis de cómo las distintas variables o su interacción afectan a los valores de actividad paraoxonasa se realizó mediante modelos de regresión lineal. Los análisis se realizaron con el programa SPSS versión 9.0.

Resultados

Las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos *PON1* 192Q/R y *PON1* 55 M/L en los niños del estudio se muestran en la tabla 1. No existen diferencias significativas en la distribución de ninguno de los genotipos o alelos en las 4 provincias. La frecuencia media del alelo Q fue del 70% y la del alelo R, del 30%. Las frecuencias medias de los alelos L y M fueron del 62 y el 38%, respectivamente.

Los valores de actividad paraoxonasa de nuestra población fueron de $280,5 \pm 168,6$ U/l, con valores comprendidos entre 48,1 y 871,9 U/l. No hemos observado diferencias significativas entre sexos, con valores medios de actividad de $288,5 \pm 173,9$ U/l en niños y de $272,5 \pm 162,8$ U/l en niñas. Hemos observado que la actividad paraoxonasa era significativamente más elevada en niños obesos ($310,7 \pm 161,4$ U/l) que en niños con peso normal ($275,2 \pm 169,1$ U/l).

La actividad paraoxonasa presentó una distribución bimodal en las 4 provincias del estudio. Tal como era de esperar, la actividad paraoxonasa, tanto en el grupo total como en cada una de las provincias por separado, fue significativamente superior ($p < 0,001$) en los portadores del genotipo RR que en los portadores del genotipo QR y, en ambos casos, significativamente superior a los portadores del genotipo QQ. De igual modo, los portadores del alelo L presentaban valores de actividad paraoxonasa significativamente más elevados que los por-

Tabla 1. Frecuencias genotípicas y alélicas (% [n]) de los polimorfismos de PON1 en las cuatro provincias del estudio

	Madrid	Orense	Cádiz	Murcia
<i>PON 192Q/R</i>				
QQ	49,4 (173)	50,6 (161)	47,6 (141)	48,9 (152)
QR	41,1 (144)	41,8 (133)	43,9 (130)	39,5 (123)
RR	9,4 (33)	7,5 (24)	8,4 (25)	11,6 (36)
Q	70 (490)	71,5 (455)	69,6 (412)	68,6 (427)
R	30 (210)	28,5 (181)	30,4 (180)	31,4 (195)
<i>PON 55M/L</i>				
LL	38,1 (133)	38,5 (122)	38,6 (114)	37,3 (115)
LM	49,0 (171)	48,6 (154)	46,1 (136)	45,5 (140)
MM	12,9 (45)	12,9 (41)	15,3 (45)	17,2 (53)
L	62,6 (437)	62,8 (398)	61,7 (364)	60,1 (370)
M	37,4 (261)	37,2 (236)	38,3 (226)	39,9 (246)

Tabla 2. Actividad enzimática (U/l) asociada a los distintos genotipos de PON1 en las cuatro provincias del estudio

	Madrid	Orense	Cádiz	Murcia	p
Total	277,1 ± 166,8	320,4 ± 192,4	297,8 ± 186,9	245,5 ± 154,4	1-2 ^a 2-4 ^b 3-4 ^b
<i>PON1 192 Q/R</i>					
<i>QQ</i>	135,7 ± 45,7	172,8 ± 78,9	159,5 ± 88,8	117,8 ± 49,4	1-2 ^b 1-4 ^b 2-3 ^b 2-4 ^b 3-4 ^b
<i>QR</i>	363,2 ± 79,0	428,6 ± 113,8	370,7 ± 103,0	309,9 ± 71,1	1-2 ^b 1-4 ^b 2-3 ^b 2-4 ^b 3-4 ^b
<i>RR</i>	564,9 ± 48,9	692,9 ± 191,2	656,3 ± 199,6	537,9 ± 94,5	2-4 ^b 3-4 ^b
<i>PON1 55 M/L</i>					
<i>LL</i>	370,2 ± 148,1	445,2 ± 204,5	394,3 ± 205,8	352,3 ± 167,2	2-3 ^a 2-4 ^b
<i>ML</i>	237,9 ± 138,4	274,4 ± 137,9	278,2 ± 144,6	211,4 ± 100,7	1-2 ^a 1-3 ^a 2-4 ^b 3-4 ^b
<i>MM</i>	128,0 ± 70,7	120,0 ± 37,2	126,5 ± 76,6	110,6 ± 72,6	

p: comparación de los valores de actividad paraoxonasa entre provincias mediante ANOVA.

^ap < 0,05. ^bp < 0,01.

tadores del alelo *M* (tabla 2). Al comparar los valores de actividad paraoxonasa en función de la provincia, observamos diferencias importantes en esas actividades, tanto al comparar los valores totales como los de cada uno de los genotipos en cada una de las provincias (tabla 2). Los valores de actividad paraoxonasa en Orense fueron significativamente más elevados que en el resto de las provincias, tanto en el conjunto de niños como al comparar los portadores de los genotipos *QQ*, *QR*, *RR* y *LL* por separado. Por el contrario, Murcia presenta los valores de actividad paraoxonasa más bajos tanto en el total de la población como al comparar los valores de cada genotipo.

Mediante el análisis de correlación de Spearman, observamos que en la provincia de Orense existen correlaciones significativas (p < 0,05) entre la actividad PON1 en suero y las concentraciones de CT, cHDL y apo-AI después de ajustar por peso (tabla 3).

El análisis de regresión ha mostrado que los polimorfismos *PON 192Q/R* y *PON 55 M/L* son los principales determinantes de la actividad paraoxonasa en nuestra población infantil en las cuatro provincias del estudio. De modo que los polimorfismos *PON 192Q/R* y *PON 55 M/L* aparecen como

Tabla 3. Coeficientes de correlación de Spearman para la actividad PON1 y las variables bioquímicas por provincias

	Madrid	Orense	Cádiz	Murcia
Glucosa	0,076	-0,073	-0,124	-0,026
Colesterol total	0,111	0,152*	0,061	-0,074
Triglicéridos	-0,273	0,069	-0,067	-0,020
cHDL	0,269	0,126*	0,087	0,030
Apo AI	0,263	0,147*	0,059	0,001
cLDL	0,021	0,083	0,034	-0,083
Apo B	-0,025	0,080	0,041	-0,081

cHDL: colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad; cLDL: colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad.

*p < 0,05; correlaciones ajustadas por peso.

predictores significativos en Orense (en modelos con R² de 0,814 incluyendo solamente el polimorfismo *PON 192Q/R* y con R² de 0,832 al incorporar el polimorfismo *PON 55 M/L*) y en Murcia (en un modelo con R² de 0,830 con *PON 192Q/R* como único predictor y de 0,841 incluyendo *PON 192Q/R* y *PON 55 M/L*). En Madrid y Cádiz el polimorfismo *PON 192Q/R* aparece como predictor único en modelos con R² de 0,862 y 0,802, respectivamente.

Discusión

En nuestro estudio de factores de riesgo cardiovascular en la edad infantil (Estudio Cuatro Provincias)³, y ante los elevados valores de cHDL observados en nuestros niños prepuberles^{4,5}, decidimos analizar las implicaciones de este hallazgo no solamente en cuanto a la concentración de cHDL en sí, sino en cuanto a las características antioxidantes de la partícula, estudiando los valores de actividad paraoxonasa 1 (PON1) y los polimorfismos de PON1 en nuestra población prepuberal.

El valor medio de actividad paraoxonasa de nuestra población es de 280,5 U/l, similar en ambos sexos. Se trata de valores inferiores a los observados en adultos españoles, para los que se han descrito valores medios de actividad paraoxonasa de 410,9 U/l²⁴, pero más elevados que los descritos en otras poblaciones tanto de adultos como de niños. Por ejemplo, se han descrito valores medios de 219,6 U/l en adultos sanos del Reino Unido²⁵, de 162 U/l en la población control japonesa²⁶ y de 79,5 U/l en la adultos de China²⁷ o valores medios de 124,8 U/l en niños griegos de 4 a 6 años²⁸ y de 97,5 U/l en niños de 11-12 años en Eslovaquia²⁹. En nuestro estudio hemos observado que la actividad paraoxonasa presenta una distribución bimodal, idéntica a la descrita para otras poblaciones¹⁶. El polimorfismo *PON1 192Q/R* se considera el determinante mayor de la actividad sérica de la paraoxonasa³⁰ y, por tanto, sería la causa de la determinación genética de esta distribución bimodal³¹.

Al analizar la prevalencia del alelo menos común para este polimorfismo *PON192R*, hemos encontrado una frecuencia del 30%. Se trata de una frecuencia idéntica a la descrita en nuestro país en estudios en adultos³² y similar a las observadas en otros países europeos³³ pero muy diferente de las descritas en poblaciones asiáticas como la japonesa (64%) o la china (63%)³³. Sin embargo, no hemos encontrado diferencias en la frecuencia de este polimorfismo, ni del polimorfismo *PON1 55M/L* entre las provincias de nuestro estudio. Como se ha comentado previamente los estudios que analizan la relación de este polimorfismo con la enfermedad cardiovascular son discordantes incluso dentro de una misma población^{34,35}. En la actualidad se piensa que la actividad paraoxonasa se relaciona de forma más evidente con la enfermedad que los polimorfismos genéticos³⁶.

Al comparar los grados de actividad paraoxonasa en las provincias de nuestro estudio, hemos observado que Orense presenta los valores más elevados y Murcia los más bajos. Curiosamente Orense

es la provincia donde los valores de actividad PON1 correlacionan con los valores plasmáticos de colesterol total, cHDL y apo AI. La asociación entre la actividad PON1 y los valores plasmáticos de cHDL y apo AI se ha descrito en estudios en adultos²⁷, y, sin embargo, no se ha encontrado en estudios en niños²⁹. Además, se ha descrito que la correlación entre la actividad PON1 y la concentración de cHDL es más débil en población con enfermedad coronaria que en población control³⁷, sugiriendo que existen factores que modulan la relación entre la enzima y la HDL en distintas situaciones o que la asociación puede depender de los valores de actividad PON1.

Análisis de regresión han confirmado que los niveles de actividad PON1 en nuestra población están determinados genéticamente, de modo que los polimorfismos, especialmente el polimorfismo *PON1 192Q/R*, explican un alto porcentaje (alrededor del 80%) de la variabilidad en la actividad PON1. A pesar de que puedan existir factores ambientales que influyan sobre la actividad PON1³⁸, nuestros datos están de acuerdo con datos muy recientes de la literatura científica que atribuyen a los determinantes genéticos un impacto mucho mayor sobre PON1 que el de los determinantes ambientales³⁹, con estudios en adultos que atribuyen al genotipo el 76% de la variación de actividad PON1³⁰.

En resumen, aunque existe una importante determinación genética, la diferente actividad PON1 observada en niños de las provincias de Orense y Murcia, para todos los genotipos en el rango determinado por el propio genotipo, sugiere la existencia de factores que modulan la actividad paraoxonasa en de cada genotipo que deben ser investigados.

Investigadores del Estudio Cuatro Provincias:

J.L. del Barrio, I. de Oya (Fundación Jiménez Díaz, Universidad Autónoma de Madrid); M.A. Lasunción, H. Ortega (Hospital Ramón y Cajal); J.M. Martín Moreno, L. Gorgojo (Universidad de Valencia); M.A. Royo (Instituto de Salud Carlos III); A. Gil (Universidad Rey Juan Carlos); F. Rodríguez Artalejo (Universidad Autónoma de Madrid); O. Fernández (Hospital Cristal Piñol, Orense); A. Mangas y A. Macías (Universidad de Cádiz) y J. Fernández Pardo (Hospital de la Cruz Roja de Murcia).

Bibliografía

1. Tuzcu EM, Kapadia SR, Tutar E, et al. High prevalence of coronary atherosclerosis in asymptomatic teenagers and young adults. Evidence from intravascular ultrasound. *Circulation*. 2001;103:2705-10.

2. Berenson GS, Srinivasan SR, Hunter SMACD, et al. Risk factors in early life as predictors of adult heart disease: The Bogalusa Heart Study. *Am J Med Sci*. 1989;298:141-51.
3. Garcés C, De Oya M. Factores de riesgo cardiovascular en la edad infantil. Resultados globales del Estudio Cuatro Provincias. *Rev Esp Cardiol*. 2007;60:517-24.
4. Garcés C, Lasunción MA, Ortega H, et al. Factores metabólicos en población escolar asociados a la mortalidad cardiovascular en los adultos. Estudio Cuatro Provincias. *Med Clín*. 2002;118:767-70.
5. Garcés C, Gil A, Benavente M, Vitorro E, Cano B, De Oya M. Consistently high plasma HDL-C levels in children in Spain, a country with low cardiovascular mortality. *Metabolism*. 2004;53:1045-7.
6. De Oya M. Colesterol-HDL y mortalidad cardiovascular en España. *Rev Esp Cardiol*. 1998;51:988-90.
7. Parthasarathy S, Barnett J, Fong L. High density lipoprotein inhibits the oxidative modification of low density lipoprotein. *Biochem Biophys Acta*. 1990;1044:275-83.
8. Mackness MI, Abbott CA, Arrol S, Durrington PN. The role of high density lipoprotein and lipid soluble anti-oxidant vitamins in inhibiting low density lipoprotein oxidation. *Biochem J*. 1993;294:829-34.
9. Navab M, Hama-Levy S, Van Lenten BJ, et al. Mildly oxidized LDL induces an increased apolipoprotein J/paraoxonase ratio. *J Clin Invest*. 1997;99:2005-19.
10. Mackness MI, Arrol S, Abbott C, Durrington PN. Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase. *Atherosclerosis*. 1993;104:129-35.
11. Navab M, Berliner JA, Watson AD, et al. The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. *Arterioscler Thromb*. 1996;16:831-3.
12. Aviram M, Hardak E, Vaya J, et al. Human serum paraoxonases (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions. *Circulation*. 2000;101:2510-7.
13. 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 alleles. *Am J Hum Genet*. 1993;52:598-608.
14. Mackness B, Durrington PN, Mackness MI. Polymorphisms of paraoxonase genes and low-density lipoprotein lipid peroxidation. *Lancet*. 1999;353:468-9.
15. Blatter Garin MC, James RW, Dussoix P, et al. Paraoxonase polymorphism Met-Leu54 is associated with modified serum concentrations of the enzyme. *J Clin Invest*. 1997;99:62-6.
16. McElveen J, Mackness MI, Colley CM, Peard T, Warner S, Walker CH. Distribution of paraoxon hydrolytic activity in the serum of patients after myocardial infarction. *Clin Chem*. 1986;32:671-3.
17. Ayub A, Mackness MI, Arrol S, Mackness MI, Patel J, Durrington PN. Serum Paraoxonase after myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:330-5.
18. Mackness MI, Hart D, Bhatnagar D, et al. Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolaemia and insulin-dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis*. 1991;86:193-9.
19. Mackness B, Durrington P, McElduff P, et al. Low paraoxonase activity predicts coronary events in the Caerphilly Prospective Study. *Circulation*. 2003;107:2775-9.
20. Hegele RA, Young TK, Connelly PW. Are Canadian Inuit at increased genetic risk for coronary heart disease? *J Mol Med*. 1997;75:364-70.
21. Ombres D, Pannitteri G, Montali A, et al. The gln-Arg192 polymorphism of human paraoxonase gene is not associated with coronary artery disease in Italian patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18:1611-6.
22. Herrmann SM, Blanc H, Poirier O, et al. The Gln/Arg polymorphism of human paraoxonase (PON 192) is not related to myocardial infarction in the ECTIM Study. *Atherosclerosis*. 1996;126:299-303.
23. Humbert R, Alder DA, Disteché CM, Hassett C, Omiecinski CJ, Furlong CE. The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nat Genet*. 1993;3:73-6.
24. Ferré N, Camps J, Fernández-Ballart J, et al. Regulation of serum paraoxonase activity by genetic, nutritional, and lifestyle factors in the general population. *Clin Chem*. 2003;49:1491-7.
25. 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;21:1451-7.
26. Ikeda Y, Suehiro T, Inoue M, et al. Serum Paraoxonase activity and its relationship to diabetic complications in patients with non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus. *Metabolism*. 1998;47:598-602.
27. Saha N, Roy AC, Teo S, Ratnam SS. Influence of serum paraoxonase polymorphism on serum lipids and apolipoproteins. *Clin Genet*. 1991;40:277-82.
28. Karikas GA, Kriebardis A, Samara I, Schulpis K, Papachristodoulou M, Fytou-Pallikari A. Serum homocysteine levels and paraoxonase 1 activity in preschool aged children in Greece. *Clin Chem Lab Med*. 2006;44:623-7.
29. Sumegová K, Nagyová Z, Waczulíková I, Ľitnanová I, Duracková Z. Activity of paraoxonase 1 and lipid profile in healthy children. *Physiol Res*. 2006 Jun 22. Epub ahead of print.
30. Nevin DN, Zambon A, Furlong CE, et al. Paraoxonase genotypes, lipoprotein lipase activity, and HDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16:1243-9.
31. Eiberg H, Mohr J. Genetics of paraoxonase. *Ann Hum Genet*. 1981;45:323-30.
32. Sentí M, Tomás M, Elosua R, Sala J, Masia R, Marrugat J. The paraoxonase-1 codon 192 polymorphism is associated with fasting total cholesterol and LDL-cholesterol concentrations only in postmenopausal women. The REGICOR study. *Clin Chem Lab Med*. 2002;40:677-83.
33. Scacchi R, Gambina G, Martini MC, Broggio E, Vilardo T, Corbo RM. Different pattern of association of paraoxonase Gln192>Arg polymorphism with sporadic late-onset Alzheimer's disease and coronary artery disease. *Neurosci Lett*. 2003;339:17-20.
34. Suehiro T, Nakauchi Y, Yamamoto M, et al. Paraoxonase gene polymorphism in Japanese subjects with coronary heart disease. *Int J Cardiol*. 1996;57:69-73.
35. Zama T, Murata M, Matsubara Y, et al. A 192Arg variant of the human paraoxonase (HUM-PONA) gene polymorphism is associated with an increased risk for coronary artery disease in the Japanese. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:3565-9.
36. Mackness M, Mackness B. Paraoxonase 1 and atherosclerosis: is the gene or the protein more important? *Free Rad Biol Med*. 2004;37:1317-23.
37. Blatter Garin MC, Moren X, James RW. Paraoxonase-1 and serum concentrations of HDL-cholesterol and apoA-I. *J Lipid Res*. 2006;47:515-20.
38. Deakin SP, James RW. Genetic and environmental factors modulating the serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase-1. *Clin Sci*. 2004;107:435-47.
39. Roest M, Van Himbergen TM, Barendrecht AD, Peeters PH, van der Schouw YT. Genetic and environmental determinants of the PON-1 phenotype. *Eur J Clin Invest*. 2007;37:187-96.