

TRABAJO FIN DE MÁSTER

MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

CURSO 2019-20

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

---

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PARAOXONASA 1  
EN SUERO DE PACIENTES EN TRATAMIENTO CON  
PSICOFÁRMACOS DEL COMPLEJO SOCIO  
ASISTENCIAL DR. ESQUERDO

---

Autora: Sara Fandos Planelles

Tutor: Prof. Dr Javier Esteban Mozo

**D. JAVIER ESTEBAN MOZO**, Doctor y Profesor Contratado Doctor del área de Toxicología del Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

CERTIFICA

Que el presente trabajo titulado:

“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PARAOXONASA 1 EN SUERO DE PACIENTES EN TRATAMIENTO CON PSICOFÁRMACOS DEL COMPLEJO SOCIO ASISTENCIAL DR. ESQUERDO”

y que constituye la Memoria del Trabajo Fin de Máster en Biotecnología y Bioingeniería, que presenta:

**Sara Fandos Planelles**

ha sido realizado bajo su supervisión en el Instituto de Bioingeniería, cumpliendo todos los requisitos necesarios.

Y para que así conste, se expide y firma el presente certificado en Elche a 10 de julio de 2020

Fdo.: Prof. Javier Esteban Mozo

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco la gran enseñanza y ayuda durante mi tiempo en el laboratorio a Maria Cruz Pellin, José Ramón Barril, Suylen Galbán y Roger Ortiz, que me han aportado mucho apoyo y ánimo en el proyecto.

También agradezco a mi tutor Javier Esteban, la paciencia, serenidad y empeño que me ha transmitido, la flexibilidad y la comprensión que he necesitado, además de la continua disponibilidad que me ha brindado para todas las dudas y cuestiones.



## **RESUMEN**

Las personas en tratamiento por trastorno mental grave poseen una mortalidad aumentada principalmente debido a enfermedades cardiovasculares. La paraoxonasa 1 (PON1) sérica humana es una enzima ligada a lipoproteínas de alta densidad (HDL) capaz de prevenir la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y la consecuente aterosclerosis gracias a su actividad antioxidativa y antiinflamatoria. Los objetivos del presente trabajo son 1) determinar la actividad PON1, 2) inferir su genotipo Q/R en la posición 192 y 3) conocer los tratamientos administrados y las condiciones médicas de los pacientes del Centro Socio Asistencial Dr Esquerdo. Se determinó la actividad sérica PON1 y se infirió el genotipo de 29 pacientes. Los tratamientos más frecuentes fueron tratamientos antipsicóticos con clozapina y haloperidol, estabilizadores del ánimo con ácido valproico, así como antidepresivos con sertralina y fluoxetina. Dichos tratamientos alteraron la actividad PON1 y elementos del síndrome metabólico, conforme a la literatura consultada.

### **Palabras clave**

Paraoxonasa 1, ácido valproico, antipsicóticos, antidepresivos.

## **ABSTRACT**

People in treatment for severe mental disorder have a higher mortality mainly due to cardiovascular disease. Human serum paraoxonase 1 (PON1) is an enzyme linked to high density lipoproteins (HDL) capable to prevent the oxidation of low density lipoproteins (LDL) and the consequent atherosclerosis because of its antioxidative and anti-inflammatory activity. The objectives of this paper are 1) to determine the PON1 activity, 2) to infer its genotype Q/R in 192 position and 3) to know the treatments administered and medical conditions of the patients from the Dr Esquerdo Socio Care Center. PON1 serum activity was determined and the genotype of 29 patients was inferred. The most frequent treatments were antipsychotic treatments with clozapine and haloperidol, mood stabilizers with valproic acid, as well as antidepressants with sertraline and fluoxetine. These treatments altered PON1 activity and elements of metabolic syndrome, according to the literature consulted.

### **Key words**

Paraoxonase 1, valproic acid, antipsychotics, antidepressants.

## LISTA DE ABREVIATURAS

PON1: Paraoxonasa 1	$\cdot\text{O}_2^-$ : Radical anión superóxido
HDL: Lipoproteínas de alta densidad	$\text{H}_2\text{O}_2$ : Peróxido de hidrógeno
LDL: Lipoproteínas de baja densidad	$\text{ONOO}^-$ : Peroxinitrito
PA: Acetato de fenilo	LOX-1: Receptor 1 de lipoproteína de baja densidad oxidada
CPMA: Acetato de 4-clorometil fenil	SNC: Sistema Nervioso Central
ApoA-I y apoA-II: apolipoproteínas A-I y A-II.	VPA: Ácido valproico
VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad	H1: Receptor de histamina 1
PAF-AH: Factor activador de plaquetas	5-HT <sub>2A</sub> , 5-HT <sub>2C</sub> : Receptores de serotonina
Gpx: Glutación peroxidasa	PKB: Protein kinasa
LCAT: Lecitina:colesterol acil transferasa	ADN: Ácido desoxirribonucleico
CETP: proteína de transferencia de éster de colesterol	AMPK: Proteína quinasa activada por AMP
LDL <sub>ox</sub> : Lipoproteínas de baja densidad oxidadas	TRIS: Tris(hidroximetil) aminometano
ROS: Especies reactivas de oxígeno	$\text{Ca Cl}_2$ : Cloruro de Calcio
RONS: Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno	NaCl: Cloruro de Sodio
NADPH: Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido-Fosfato	Et: Etanol
S1P: Esfingosina-1-fosfato	NaCl: Cloruro de sodio
NO: Óxido nítrico	HCl: Ácido clorhídrico
Arg: Arginina	DM2: Diabetes Mellitus II
Gln: Glutamina	HTA: Hipertensión arterial
Leu: Leucina	SD: Desviación estándar
Met: Metionina	CV: Coeficiente de variación
Nox: NADPH oxidasa	
SOD: Superóxido dismutasa	

## ÍNDICE DE CONTENIDO

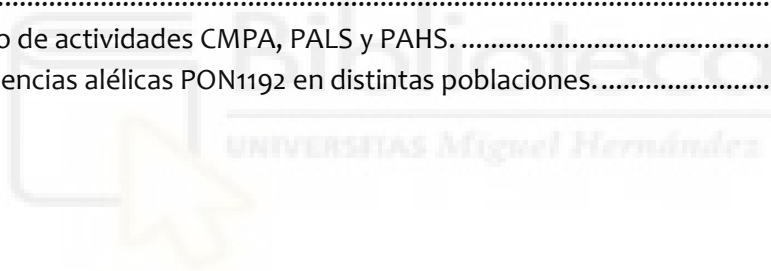
1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES .....	6
1.1. Paraoxonasa 1 (PON1) .....	6
1.2. Papel antioxidante y antiaterogénico de las HDL y PON1.....	6
1.3. Factores genéticos de la PON1 y enfermedad cardiovascular.....	7
1.4. La aterosclerosis .....	9
1.4.1. Epidemiología y mecanismos.....	9
1.4.2. Respuesta oxidativa-inmune en la formación de la placa de ateroma. ....	9
1.4.3. Influencia del síndrome metabólico en la aterosclerosis. ....	<b>Error! Marcador no definido.</b>
1.5. Psicofármacos y enfermedad cardiovascular.....	10
1.5.1. Trastornos mentales y descripción de psicofármacos .....	10
1.5.2. Psicofármacos y efectos en el metabolismo .....	11
2. OBJETIVOS .....	13
3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	14
3.1. Preparación de tampones .....	14
3.2. Preparación de sustratos .....	15
3.3. Ensayos previos de estabilidad y precisión .....	15
3.3.1. Precisión intra-día.....	15
3.3.2. Estabilidad 24h a temperatura 4-8°C. ....	15
3.3.3. Hidrólisis química de las disoluciones de trabajo de los sustratos. ....	15
3.4. Ensayo de medición de la actividad PON1 en muestras de suero humano.....	16
3.4.1. Descripción muestral. ....	16
3.4.2. Preparación de muestras. ....	16
3.4.3. Medición de actividad PON1 en el espectrofotómetro. ....	16
3.4.4. Cálculo de la actividad enzimática PON1.....	18
3.5. Genotipado inferido .....	18
3.6. Validación del blanco y el control de hidrólisis química. ....	19
3.7. Análisis estadístico .....	19
4. RESULTADOS.....	20
4.1. Ensayo de precisión intradía .....	20
4.2. Ensayo de estabilidad a las 24h almacenado entre 4-8°C.....	20
4.3. Ensayo de estabilidad de sustratos .....	21

4.4. Validación del blanco y el control de hidrólisis química en la medición de PON1.....	22
4.5. Ensayo de actividad PON1 y genotipo inferido.....	24
4.6. Análisis descriptivo de variables farmacológicas y médicas.....	29
4.6.1. Variables farmacológicas: .....	29
4.6.2. Variables médicas.....	33
5. DISCUSIÓN.....	34
5.1. Determinación de la actividad PON1.....	34
5.2. Ensayo de actividad PON1 y genotipo inferido en muestras humanas. ....	34
5.2.1. Niveles de actividad de PON1. ....	34
5.2.2. Genotipo inferido.....	34
5.2.3. Efecto del tratamiento psiquiátrico en la actividad PON1.....	35
5.2.4. Asociaciones entre condiciones médicas y actividad PON1.....	37
5.2.5. El tratamiento psiquiátrico se ha relacionado con alteración endocrina .....	36
6. CONCLUSIONES .....	39
7. PROYECCION FUTURA .....	39
8. BIBLIOGRAFÍA .....	40



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resumen de las condiciones de ensayo de la actividad PON1 en muestras de suero humano.....	14
Tabla 2. Factores de cálculo de actividad PON1.....	18
Tabla 3. Coeficientes de variación de las actividades CMPA, PALS y PAHS de las muestras control del ensayo intradía. ....	20
Tabla 4. Comparativa de actividad y coeficientes de variación en muestras control determinadas a cero horas tras la descongelación y a las 24 horas mantenidas entre 4-8°C. 21	
Tabla 5. Actividades de los controles de CH y blanco con respecto al suero control.....	23
Tabla 6. Frecuencias genotípicas de PON1192QQ, PON1192QR y PON1192RR. ....	25
Tabla 7. Porcentaje de actividades respecto al Suero Control. ....	25
Tabla 8. Actividades de CMPA con desviación estándar (SD) según el genotipo inferido. ...	26
Tabla 9. Actividades de PALS con desviación estándar (SD) según el genotipo inferido. ....	26
Tabla 10. Actividades de PALS con desviación estándar (SD) según el genotipo inferido.....	27
Tabla 11. Razón de actividades PAHS/CMPA con desviación estándar (SD) según el genotipo inferido.....	28
Tabla 12. Razón de actividades PAHS/CMPA con desviación estándar (SD) según el genotipo inferido.....	28
Tabla 13. Rango de actividades CMPA, PALS y PAHS. ....	34
Tabla 14. Frecuencias alélicas PON1192 en distintas poblaciones.....	35





## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de anclaje de PON1 a superficie de las HDL.....	6
Figura 2. Papel antioxidante de la paraoxonasa 1 en el proceso de formación de la placa arteriosclerótica .....	7
Figura 3. Polimorfismos génicos Q192R y L55M en la región codificante de PON1. ....	8
Figura 4. Actividad paraoxonasa 1 sérica a través de fenil(4-clorometil) acetato (CMPA) y fenilacetato (PA). ....	8
Figura 5. Resumen de fármacos psicotrópicos asociados a efectos iatrogénicos cardiometabólicos.....	12
Figura 6. Representación de una microplaca de 96 pocillos según la distribución de controles y muestras por triplicado para el análisis en espectrofotómetro.....	17
Figura 7. Expresión de cálculo de actividad enzimática de la PON1 ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$ ). ....	18
Figura 8. Expresiones de cálculo de frecuencias alélicas $f(Q)$ y $f(R)$ según el número de individuos y los genotipos inferidos $\text{PON1Q}/\text{Q192}/ \text{PON1Q}/\text{R192}/ \text{PON1R}/\text{R192}$ .....	18
Figura 9. Análisis de precisión de las actividades CMPA, PALS, PAHS en el suero control. ...	20
Figura 10. Ensayo de estabilidad de las actividades PON1 tras mantener el suero control durante 24 horas entre 4-8 °C.....	21
Figura 11. Espectro de absorbancias de los sustratos acetato de 4-(clorometil) fenilo (CMPA) y acetato de fenilo (PA) a 270 y 280 nm respectivamente. ....	22
Figura 12. Representación de absorbancias frente al tiempo de los controles de blanco, hidrólisis química (CH) y suero control para las tres actividades CMPA (A), PALS (B) y PAHS (C).....	23
Figura 13. Media de actividades PON1 (CMPA, PALS Y PAHS) que resume las 29 muestras. ...	24
Figura 14. Determinación de la actividad hidrolítica de PON1192 para cada fenotipo/genotipo utilizando los sustratos CMPA y PA.....	24
Figura 15. Representación de actividades CMPA frente al genotipo inferido, QQ, QR y RR..	25
Figura 16. Representación de actividades PALS frente al genotipo inferido, QQ, QR y RR. ...	26
Figura 17. Representación de actividades PAHS frente al genotipo inferido, QQ, QR y RR...	27
Figura 18. Razón de actividades PA HS/CMPA para cada uno de los genotipos inferidos QQ, QR y RR. ....	27
Figura 19. Razón de actividades PALS/PAHS para cada uno de los genotipos inferidos QQ, QR y RR. ....	28
Figura 20. Toma diaria de fármacos neurolépticos más ingeridos frente al número de individuos.....	29
Figura 21. Toma de los distintos neurolépticos de mayor (19) a menor (1) proporción de individuos.....	30
Figura 22. Toma diaria de fármacos anticonvulsionantes más ingeridos frente al número de individuos.....	30
Figura 23. Toma de los distintos anticonvulsionantes de mayor (29) a menor (1) proporción de individuos. ....	31
Figura 24. Toma diaria de fármacos antidepresivos más ingeridos frente al número de individuos.....	31

Figura 25. Toma diaria de fármacos ansiolíticos más ingeridos frente al número de individuos.....	32
Figura 26. Toma de los distintos anticonvulsionantes de mayor (29) a menor (1) proporción de individuos. ....	32
Figura 27. Toma diaria de fármacos contra el Parkinson ingeridos frente al número de individuos.....	33
Figura 28. Grupos terapéuticos frente al número de individuos.....	33

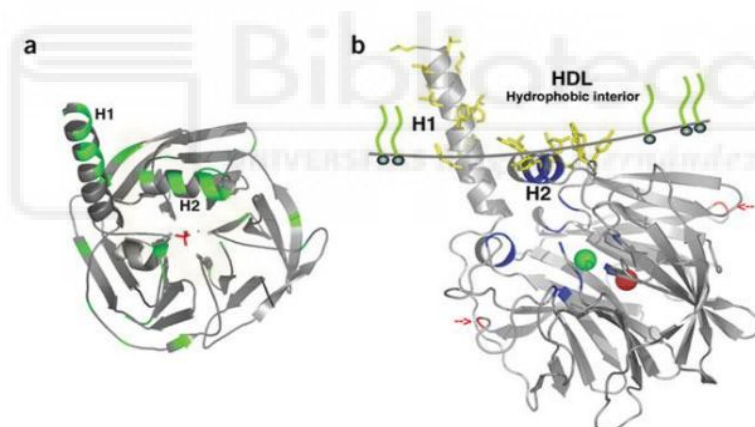


## 1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

### 1.1. Paraoxonasa 1 (PON1)

La paraoxonasa humana PON1 es una glucoproteína que se sintetiza en el hígado y se encuentra anclada a las lipoproteínas de alta densidad (HDL). (Figura 1). PON1 participa en diversas actividades catalíticas como son la actividad arilesterasa al hidrolizar ésteres de arilo como el acetato de fenilo (PA), lactonasa al hidrolizar lactonas y paraoxonasa o fosfotriesterasa al hidrolizar paraoxon y acetato de 4-clorometil fenil (CMPA) (Shunmoogam, Naidoo and Chilton 2018); (Moreira et al. 2019). Se ha relacionado la actividad lactonasa con su actividad degradadora de lípidos oxidados. (Camps et al. 2009). Esto le brinda propiedades antiinflamatorias y antiaterogénicas, evitando la inflamación vascular y previniendo del daño aterosclerótico.

Las paraoxonasas cuentan con 3 isoformas (PON1, PON2 y PON3). Cada una posee un gen distinto en el cromosoma 7 humano (Costa, Cole and Furlong 2015). Solamente PON1 tiene actividad arilesterasa y paraoxonasa, mientras que las 3 isoformas poseen actividad lactonasa. PON3, también anclada a las HDL, presenta mayor hidrólisis de lactonas. PON2 ayuda a evitar la acumulación de triglicéridos protegiendo contra el estrés oxidativo en tejidos y mitocondrias (Furlong et al. 2016).



**Figura 1. Modelo de anclaje de PON1 a superficie de las HDL.**

a (molécula PON1); b (molécula PON1 anclada a HDL) (Harel et al. 2004).

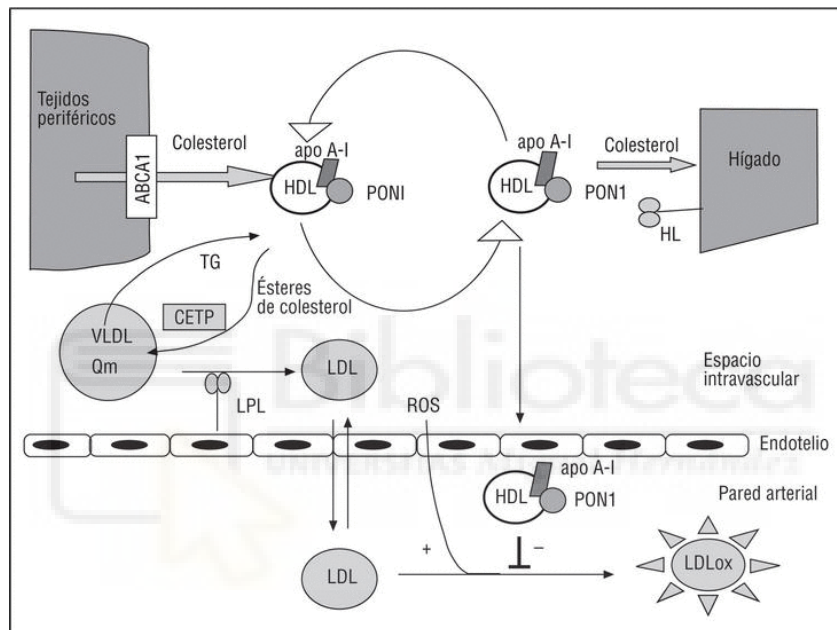
### 1.2. Papel antioxidante y antiaterogénico de las HDL y PON1

Las lipoproteínas de alta densidad (HDL) son uno de los principales medios de transporte de colesterol en sangre. Su apolipoproteína A-I (apoA-I) promueve el descenso del colesterol desde los tejidos periféricos al hígado, donde se recicla como lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) o se elimina. (Podrez 2010)

Las HDL están compuestas por proteínas y lípidos. Entre las proteínas se encuentran la apoA-I (70%) y apoA-II (15-20%), otras apolipoproteínas, enzimas PON1 y acetilhidrolasa del factor activador de plaquetas (PAF-AH), glutatión peroxidasa (Gpx), lecitina:colesterol acil transferasa (LCAT) y proteína de transferencia de éster de colesterol (CETP). En cuanto a los lípidos, se compone principalmente de colesterol libre y esterificado, además de

fosfatidilcolina, plasmalógeno, ácidos grasos libres, mono-, di- y triacilglicérolos (Woudberg et al. 2017).

La función antioxidante de las HDL incluye la destoxificación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) oxidadas, que causa una disminución de la unión y migración de monocitos proinflamatorios. La enzima PON1 junto con la apoA-I, tiene capacidad de destruir moléculas proinflamatorias, hidrolizar LDLox y fosfolípidos (Figura 2). Otros mecanismos que median esta función antioxidante consisten en la conversión de LDLox a moléculas de HDL por la CETP o a su forma inactiva gracias a residuos de metionina y de apoA-I. Se ha mostrado que la lipoproteína HDL en ausencia de PON1 es proinflamatoria, debido a que la actividad individual de PAF-AH no es capaz de conservar la capacidad antioxidante de las HDL (Podrez 2010).



**Figura 2. Papel antioxidante de la paraoxonasa 1 en el proceso de formación de la placa arteriosclerótica**

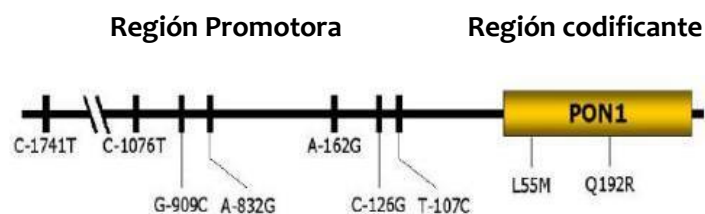
ABCA1: ATP-binding cassette A1; apo A-I: apolipoproteína A-I; CETP: proteína transferidora de ésteres de colesterol; HDL: lipoproteína de alta densidad; LDLox: LDL oxidada; HL: lipasa hepática; LDL: lipoproteína de baja densidad; LPL: lipoproteinlipasa; PON1: paraoxonasa 1; Qm: quilomicrón; ROS: especies reactivas de oxígeno; TG: triglicéridos; VLDL: lipoproteína de muy baja densidad. (Tomás et al. 2004).

### 1.3. Factores genéticos de la PON1

Algunos estudios han mostrado que la baja actividad de PON1 es un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedad cardiovascular, y que puede darse independientemente de la concentración de HDL (Mackness and Mackness 2015).

La actividad sérica de PON1 está sujeta a factores genéticos y ambientales, existiendo una varianza muy amplia entre distintos individuos, edades y poblaciones. El gen humano PON1 se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 7. Los determinantes principales del nivel de actividad son sus polimorfismos génicos. Dos de ellos se han detectado en la

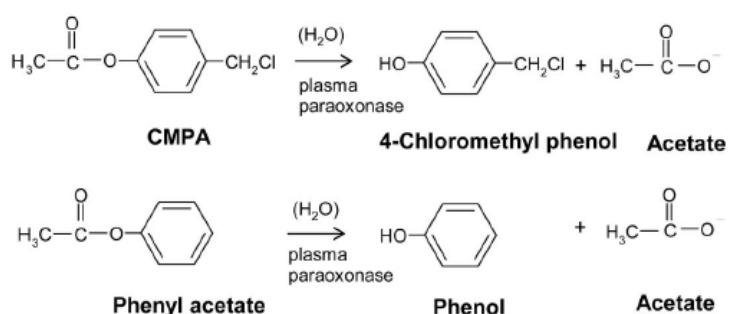
región codificadora del gen (Figura 3). La sustitución Gln/Arg en la posición 192 (PON<sub>192</sub>) determina los alelos Q y R respectivamente, asociados a una mayor o menor actividad paraoxonasa según el sustrato, pero no afecta a su concentración sérica; y la sustitución Leu/Met en la posición 55 (PON<sub>155</sub>) determina los alelos L y M asociados a cambios de concentración en sangre, pero no de los cambios en la actividad catalítica (Camps, Marsillach and Joven 2009).



**Figura 3. Polimorfismos génicos Q192R y L55M en la región codificante de PON1.** (Sánchez y Soto, 2017).

Según la isoforma génica de PON<sub>192</sub>, es más eficiente en unas actividades catalíticas u otras. Se ha visto que la isoforma RR (PON<sub>192R/R</sub>) hidroliza el paraoxón o clorpirifos oxon de forma más eficiente que la isoforma QQ (PON<sub>192Q/Q</sub>). Las lactonas y el diazoxon son hidrolizados por ambas isoformas con la misma eficiencia, siendo que PON<sub>R192</sub> hidroliza mejor la homocisteina tiolactona, y PON<sub>Q192</sub> hidroliza más rápido la  $\delta$ -valerolactona y la 2-cumaranona. (Costa, Giordano and Furlong 2011).

Muchos estudios epidemiológicos han examinado únicamente genotipos PON1 considerando el ADN solamente, sin tener en cuenta la gran variabilidad entre individuos de los niveles de actividad sérica PON1. Por ello se procedió a determinar el 'status' de la PON1 incluyendo tanto el nivel de actividad como el genotipado inferido de PON<sub>192</sub> a través de dos compuestos no organofosforados, el fenil(4-clorometil) acetato (CMPA) y el fenilacetato (PA) (Figura 4). Este ensayo proporcionaba una separación clara de los distintos niveles de actividad PON1 con respecto a tres genotipos inferidos de PON<sub>192</sub> (PON<sub>192Q/Q</sub>, PON<sub>192Q/R</sub> y PON<sub>192R/R</sub>) (Richter, Jarvik and Furlong 2008, Gallego 2019).



**Figura 4. Actividad paraoxonasa 1 sérica a través de fenil(4-clorometil) acetato (CMPA) y fenilacetato (PA).** (Richter et al. 2008).

#### 1.4. La aterosclerosis

La PON1 podría ser un elemento intermedio entre el efecto iniciador de los psicofármacos y el desarrollo de la enfermedad metabólica. Es decir, dentro de la cascada de acontecimientos en la que los psicofármacos serían los iniciadores de las alteraciones metabólicas, la aterosclerosis constituiría el evento final que implica un riesgo muy alto de enfermedad coronaria. La respuesta antioxidante de PON1 es esencial en la disminución de LDLox, y en consecuencia, en la prevención de la aterosclerosis.

##### 1.4.1. Epidemiología y mecanismos.

La aterosclerosis es una de las principales causas de enfermedades cardiovasculares y de muerte en occidente. Esta afección sistémica se origina por una permeabilidad aumentada del endotelio vascular, en la que participa el estrés oxidativo, la desregulación inmunológica y la inflamación. Estas alteraciones conducen a la acumulación y absorción continua de lípidos oxidados (LDLox), monocitos y linfocitos, iniciando la formación de la placa de ateroma (Marchio et al. 2019).

A medida que aumenta el tamaño de esta placa, se va estrechando la luz vascular, provocando debilitamiento del flujo sanguíneo y por tanto dificultad en la oxigenación de órganos importantes. A ello se adiciona una probabilidad aumentada de que se formen coágulos que puedan bloquear la circulación de sangre, de manera parcial o completa. Las arterias que suelen verse afectadas y provocar enfermedades derivadas son las arterias coronarias, carótidas (accidente cerebrovascular) y periféricas (miembros inferiores) (Portilla et al. 2014).

La oxidación de la LDL juega un papel clave en el progreso de la aterosclerosis, y se ha visto que bajos niveles de la misma reducen el riesgo de enfermedades derivadas. El equilibrio entre factores oxidantes y antioxidantes es muy importante para mejorar o empeorar el proceso (Herrington et al. 2016).

Entre los factores de riesgo que favorecen el inicio y el desarrollo de la aterosclerosis se encuentran concentraciones inadecuadas de componentes del síndrome metabólico, tabaco, alcohol, estrés y vejez. El síndrome metabólico se trata de un conjunto de factores de riesgo que predisponen a la diabetes y enfermedades cardiovasculares. Estas alteraciones incluyen hipertensión, obesidad, dislipidemia (hipertrigliceridemia y HDL bajo) e intolerancia a la glucosa. (Abosi et al. 2018).

##### 1.4.2. Origen y respuesta oxidativa-inmune en la formación de la placa de ateroma.

En primer lugar, el estrés oxidativo producido en la pared vascular es uno de los causantes tempranos de la aterosclerosis. Se produce cuando hay desequilibrio entre los factores oxidantes como la xantina oxidasa, lipoxigenasas, NADPH oxidasa (Nox) y los factores antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa y paraoxonasas (PON1, 2 y 3). Este desequilibrio conlleva una mayor cantidad de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (RONS), entre las que se encuentran el anión superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ), peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), óxido nítrico (NO) y peroxinitrito (ONOO $\cdot$ ). Todos ellos inducen efectos proinflamatorios desencadenando respuestas inmunes que tratan de reparar los daños causados por los RONS.

En segundo lugar, la oxidación del LDL constituye otro causante temprano en el inicio de la disfunción endotelial, ya que la activación de su receptor (LOX-1) desencadena una acumulación descontrolada de LDLox y ésteres de colesterol en macrófagos proinflamatorios originando células espumosas.

La placa de ateroma se compone por tanto, de un núcleo necrótico de lípidos con restos de células espumosas, endoteliales, inflamatorias, inmunes y proteolíticas, con una capa de fibra alrededor. A medida que agrava el estado necrótico, esta placa se va tornando inestable y se puede romper provocando trombosis. (Marchio et al. 2019).

## **1.5. Psicofármacos y enfermedad cardiovascular.**

Existe una clara relación entre el consumo de psicofármacos y el desarrollo de enfermedad cardiovascular. Los pacientes psiquiátricos crónicos constituyen un grupo de riesgo con una mortalidad muy aumentada (Ozenoglu et al. 2008, Abosi et al. 2018).

### **1.5.1. Trastornos mentales y psicofármacos**

El abuso de drogas, una excesiva cantidad de horas dedicadas al trabajo, problemas familiares y económicos, la falta de tiempo para atender al cuerpo y a las emociones, tienen una gran influencia en nuestra salud, tanto física como mental.

Entre las condiciones a nivel psiquiátrico se incluyen el trastorno depresivo mayor, trastorno bipolar, esquizofrenia, trastorno de ansiedad, trastorno de déficit de atención o hiperactividad y trastorno de estrés postraumático.

Todas estas alteraciones responden ante la medicación terapéutica, que ejerce un efecto en el Sistema Nervioso Central (SNC) y se administran para tratar la sintomatología de tales trastornos. Los psicofármacos se dividen en grupos de antipsicóticos, antidepresivos, ansiolíticos, anticonvulsivos o estabilizadores del ánimo, etc. (Cussotto et al. 2019).

Aproximadamente un 10-15% de la población mundial ha padecido en algún momento de su vida depresión o trastornos por ansiedad. Ambas alteraciones se manifiestan provocando cambios del estado anímico y de la conducta, y pueden afectar a la función fisiológica, somática y cognitiva. (Donnell 2012).

Otras alteraciones, como son los trastornos psicóticos, se caracterizan por una percepción desproporcionada de la realidad, y pueden tener lugar como alteraciones del estado anímico con características psicóticas (depresión mayor o manía y trastorno bipolar), delirios, trastornos psicóticos breves, y esquizofrenia.

La esquizofrenia constituye un patrón comparativo para entender lo que ocurre en la psicosis, los mecanismos de acción y los efectos de su tratamiento. Cabe señalar que los síntomas que presenta difieren bastante del resto de trastornos mentales, ya que la persona que lo padece puede sufrir alucinaciones, delirios, descoordinación en el lenguaje y el comportamiento, apatía y pérdida de interés, incluso disfunción de la cognición perceptiva y social (memoria, percepción del lenguaje y resolución de problemas,...) (M. Meyer 2012). Es una enfermedad crónica difícil de tratar, por lo que las personas que la padecen son especialmente vulnerables, ya que en ocasiones las dosis consideradas

seguras de medicamento ejercen una efectividad parcial en la sintomatología. (Ijaz et al. 2018).

### 1.5.2. Psicofármacos y efectos en el metabolismo

Por todo lo mencionado, el tratamiento con antipsicóticos a largo plazo da lugar a un riesgo alto de alteraciones metabólicas como diabetes, hipertensión e hiperlipidemia (Rojo et al. 2015), constituyendo un factor de riesgo de enfermedad cardiovascular (Figura 4).

El mecanismo mediante el cual se relacionan los antipsicóticos con el síndrome metabólico involucra diversos factores como son la interacción de neurotransmisores y hormonas, como dopamina, histamina, leptina, neuropéptidos orexigénicos (estimulantes del apetito), receptores adrenérgicos (vasoconstricción y vasodilatación) y homeostasis dañada de glucosa, entre otros (Riordan et al. 2011).

#### **Ganancia de peso:**

La afinidad y el grado de antagonismo de los psicofármacos frente a los receptores de histamina H<sub>1</sub>, de serotonina (5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2C</sub>) y adrenérgicos α<sub>1</sub>, están relacionados directamente con el aumento de peso. Así, el antagonismo o bloqueo hacia estos receptores provoca un aumento del apetito central y por tanto una ingesta de alimentos mayor (Abosi et al. 2018).

Los psicofármacos pueden inducir el aumento de grelina, una hormona gástrica reguladora del apetito y moduladora de la secreción de insulina (Siafis et al. 2018). También interfieren en la regulación de la leptina. Esta hormona es sintetizada por adipocitos, y es la responsable de transmitir las señales de saciedad al hipotálamo a través de la fosforilación de la proteína quinasa (PKB), regulando así el apetito. Si se produce un aumento excesivo en su producción, se genera resistencia hacia ella misma y se daña la transducción de la señal de saciedad al cerebro (Ijaz et al. 2018).

Los niveles de adiponectina también se han visto afectados por psicofármacos como el ácido valproico, un estabilizador del ánimo ampliamente utilizado a nivel psiquiátrico. Éste actúa inhibiendo una enzima esencial en la transcripción del ADN, la histona desacetilasa, lo cual provoca una reducción en la expresión de adiponectinas y se favorece la ganancia de peso y la obesidad (Abosi et al. 2018).

#### **Dislipidemia.**

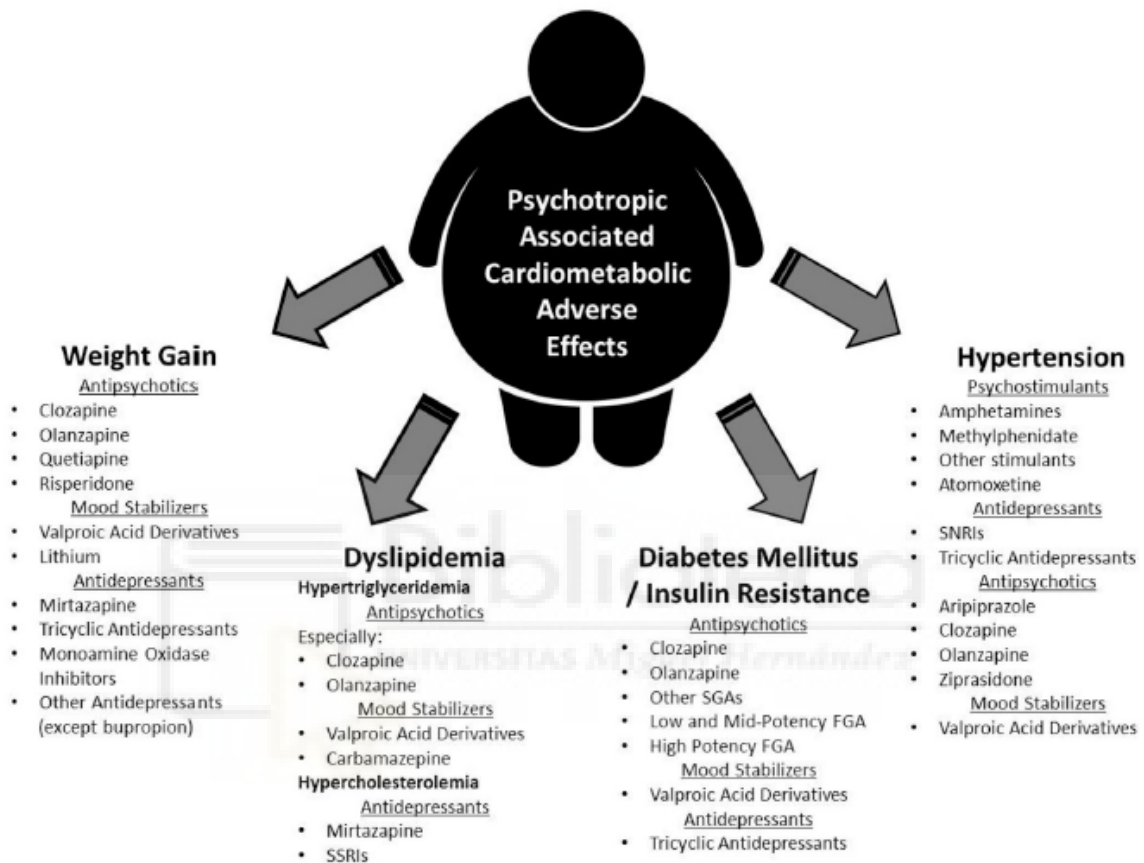
Los psicofármacos también ejercen un efecto sobre la lipogénesis y adipogénesis mediante la alteración del metabolismo lipídico por distintas vías que puede acabar en hiperlipidemia. Otro mecanismo importante es el incremento de ácidos grasos saturados y la disminución de monoinsaturados en plasma, que genera predisposición a la resistencia insulínica. (Siafis et al. 2018).

#### **Resistencia a la insulina.**

Existen asociaciones robustas entre los psicofármacos y el desarrollo de resistencia a la insulina. Fármacos como la olanzapina actúan sobre la gluconeogénesis hepática por medio de la activación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK). Otras evidencias sugieren



que se produce hiperglucemia por una incapacidad de la insulina de contener la producción hepática de glucosa al verse trastornada la correcta secreción de las hormonas insulina (anabolismo de glucosa) y glucagón (catabolismo de glucosa) (Siafis et al. 2018). Otros fármacos como el Litio actúan disminuyendo los niveles de insulina y por tanto aumentando el nivel de glucosa en sangre (Abosi et al. 2018).



**Figura 5. Resumen de fármacos psicotrónicos asociados a efectos iatrogénicos cardiometabólicos.**  
(Abosi et al. 2018).

## 2. OBJETIVOS

En el presente Trabajo de Fin de Máster, en el que se estudia a los pacientes del Centro Socio Asistencial del Doctor Esquerdo, los objetivos son:

- Determinar los niveles de actividad paraoxonasa 1 (PON1) humana.
- Inferir el genotipo conforme a las actividades PON1.
- Describir las características sociodemográficas, biológicas, médicas y farmacológicas en el marco de la literatura disponible con respecto a la influencia de los tratamientos psicofarmacológicos en la actividad paraoxonasa.



### 3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

A continuación, se muestra el resumen de las condiciones de ensayo de la actividad PON1 que se detallan en las secciones 3.1-3.4. (Tabla 1).

**Tabla 1. Resumen de las condiciones de ensayo de la actividad PON1 en muestras de suero humano.**

Actividades	Tampón del Sustrato	Composición del Tampón	Dilución de Sustrato	Concentración de Sustrato y Tampón	Dilución de muestras (M)	Producto de reacción	Condiciones de detección
CMPA	LS	TRIS 20mM CaCl <sub>2</sub> 1mM pH 8	CMPA 3mM+Et 25 ml LS	CMPA 3 mM/L	[1:40]	4- (clorometil) fenol	λ=280 nm 25°C
PA LS	LS	TRIS 20mM CaCl <sub>2</sub> 1mM pH 8	PA 440mM 25 ml LS	PALS 3,26 mM/L	[1:80]	Fenol	λ=270 nm 25°C
PA HS	HS	TRIS 20mM CaCl <sub>2</sub> 1mM NaCl 2M pH 8	PA 440 mM 25 ml HS	PAHS 3,26 mM/L	[1:40]	Fenol	λ=270 nm 25°C

Tres actividades: CMPA (4-(clorometil) fenil acetato); PA LS (Fenil acetato Baja Sal); PA HS (Fenil acetato Alta Sal). LS (Baja Sal); HS (Alta Sal); TRIS (tris(hidroximetil)aminometano); Ca Cl<sub>2</sub> (Cloruro de Calcio); NaCl (Cloruro de Sodio); Sustrato (S); Et (Etanol); Muestras (M); λ (longitud de onda).

#### 3.1. Preparación de tampones

Se prepararon dos tampones con tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) para la dilución posterior de las muestras. Uno de ellos se preparó sin NaCl (bajo en sal 'LS') y al otro se le adicionó NaCl (alto en sal 'HS') (Tabla 1 resumen). Ambas preparaciones se describen a continuación:

Para obtener el tampón de dilución bajo en sal (LS), se mezcló TRIS 20 mM (2,442 g) con cloruro cálcico (CaCl<sub>2</sub>) 1 mM (11,1 mg) mediante ajuste con pHmetro y ácido clorhídrico (HCl) 1M, hasta obtener un pH 8.00. Este tampón se utilizó para obtener las diluciones de sustrato de CMPA y PALS. Además fue el tampón con el que se diluyeron las muestras de suero en preparación para la medición de las actividades en CMPA y PAHS y PALS.

El tampón de dilución alto en sal (HS) se realizó añadiendo NaCl 2M (116,8 g) a la mezcla 'LS'. Este tampón se empleó para obtener la dilución de sustrato de PAHS.

### 3.2. Preparación de sustratos

Se prepararon tres diluciones de sustrato distintas para medir tres condiciones de actividad (CMPA, PALS y PAHS) a partir de dos sustratos, CMPA (acetato de 4-(clorometil) fenilo) y PA (acetato de fenilo) (Tabla 1 resumen). La elaboración se detalla a continuación:

Para las dos diluciones a partir del sustrato PA 400mM (almacenado a -18°C y en oscuridad) se añadieron 205 µl del mismo a dos matraces aforados, y se enrasaron ambos hasta 25 ml con Tampón LS y HS respectivamente. Seguidamente se homogenizaron.

En cuanto a la dilución de sustrato CMPA, se trabajó en una campana de seguridad en condiciones de oscuridad y con una lámpara de luz amarilla. Se añadieron 325 µl de etanol a un tubo eppendorf opaco que contenía 20 µl de sustrato de CMPA puro. Una vez añadido el etanol, se agitó durante 1 min a 37 °C. Tras pasarlo por el vórtex (5s), el baño de ultrasonidos (5s), el vórtex (5s) y la centrifuga (5s) se trasvasaron en la campana 188 µl del mismo a un matraz aforado que contenía 24 ml de Tampón LS a 37°C. Se enrasó hasta 25 ml con Tampón LS y se homogenizó.

Los tres sustratos se trasvasaron a botes de 30 ml de color topacio para proceder a la medición de las absorbancias con las muestras en el espectrofotómetro de microplacas.

### 3.3. Ensayos previos de estabilidad y precisión

Antes de comenzar con los ensayos de muestras, se realizaron tres validaciones para comprobar la estabilidad de los sustratos que se iban a utilizar (CMPA y PA), la estabilidad de muestras de suero control tras 24h descongeladas y almacenadas entre 4-8°C, y la precisión de pipeteado. Los detalles se describen a continuación.

#### 3.3.1. Precisión intra-día.

En primer lugar, se realizó un ensayo de precisión intradía (a día cero de descongelación) de la muestra de suero control para valorar la precisión y homogeneidad de pipeteo tanto por el factor de manejo como de calibrado del material. Se realizó en 6 muestras de suero control, analizadas por triplicado, para cada una de las 3 actividades, CMPA, PALS y PAHS. Se procedió de forma idéntica a la preparación de muestras y sustratos que se detalla en el apartado 3.4.2, 3.4.3 y 3.4.4.

#### 3.3.2. Estabilidad 24h a temperatura 4-8°C.

En segundo lugar, se llevó a cabo un ensayo para conocer la estabilidad de la muestra de suero control descongelada y almacenada durante 24 horas a 4-8 °C. Se prepararon 3 muestras de suero control analizadas por triplicado para cada una de las actividades CMPA, PALS y PAHS (ver apartado 3.4.2 y 3.4.3 y 3.4.4).

#### 3.3.3. Hidrólisis química de las disoluciones de trabajo de los sustratos.

En tercer lugar, se midió la hidrólisis química de los sustratos CMPA y PA. Se realizó una medición de absorbancias en el espectrofotómetro (UV/Vis DU 520 de Beckman Coulter ) de los dos sustratos previamente preparados y diluidos ambos a 0,3 mM con tampón LS. Así se determinó su espectro de absorción entre 200 y 320 nm, con el fin de comprobar si se

producía hidrólisis química en las longitudes de onda en que absorben el producto de reacción, siendo  $\lambda=270$  nm para PA y  $\lambda=280$  nm para CMPA. (Tabla 1 resumen).

### 3.4. Ensayo de medición de la actividad PON1 en muestras de suero humano

#### 3.4.1. Descripción muestral.

Se disponía de 29 muestras de suero procedentes de 29 pacientes internados en el Centro Socio Asistencial del Doctor Esquerdo, situado en San Juan de Alicante. Las muestras en el interior de viales opacos se congelaron a  $-80$  °C. Se realizó un trasvase de 15  $\mu$ l de suero de los 29 viales de muestras a tubos eppendorf, para facilitar la preparación posterior de las muestras y proteger los viales originales de la descongelación.

Se registró información en variables socio-demográficas (género y edad); biológicas (peso, altura y bioquímica); médicas (diagnóstico psiquiátrico, indicadores de obesidad, alteraciones cardiovasculares y metabólicas); y farmacológicas (fármacos prescritos, dosis y duración del tratamiento) de 60 pacientes tratados de forma anónima, 33 hombres y 27 mujeres, entre los cuales se encuentran los 29 casos en los que se pudo medir la actividad PON1. Los datos se recopilaban en el propio centro asistencial. Los psicofármacos aparecen divididos en 5 grupos principales: neurolépticos, anticonvulsivos, antidepresivos, ansiolíticos y fármacos contra el Parkinson. Además, se registró la presencia de hipertensión arterial (HTA), sobrepeso, Diabetes Mellitus II (DM2) y dislipidemia.

Este estudio está aprobado por el Comité de Ética de Investigación con Humanos (CEIH) y por el Órgano Evaluador de Proyectos de la UMH (referencia IB.JEM.01.18).

#### 3.4.2. Preparación de muestras.

A partir de los 15  $\mu$ l de las 29 muestras de suero almacenadas a  $-80$ °C, se añadieron 5  $\mu$ l en 29 tubos vacíos. Seguidamente, se prepararon dos diluciones de distinta concentración [1:40] y [1:80] con Tampón LS. Para preparar la dilución [1:40] se añadieron 195  $\mu$ l de Tampón LS a los 5  $\mu$ l de cada muestra homogenizando adecuadamente, y se trasvasaron 50  $\mu$ l de la mezcla a otros 29 tubos vacíos, quedando las diluciones [1:40] con un volumen de 150  $\mu$ l. La segunda dilución [1:80] se obtuvo añadiendo 50  $\mu$ l de Tampón LS a los 29 tubos con 50  $\mu$ l trasvasados anteriormente, quedando con un volumen de 100  $\mu$ l. (Tabla 1 resumen).

Las muestras de suero diluidas a 1:40 se emplearon para medir las actividades CMPA y PAHS; y las diluidas a 1:80 se utilizaron para la actividad PALS.

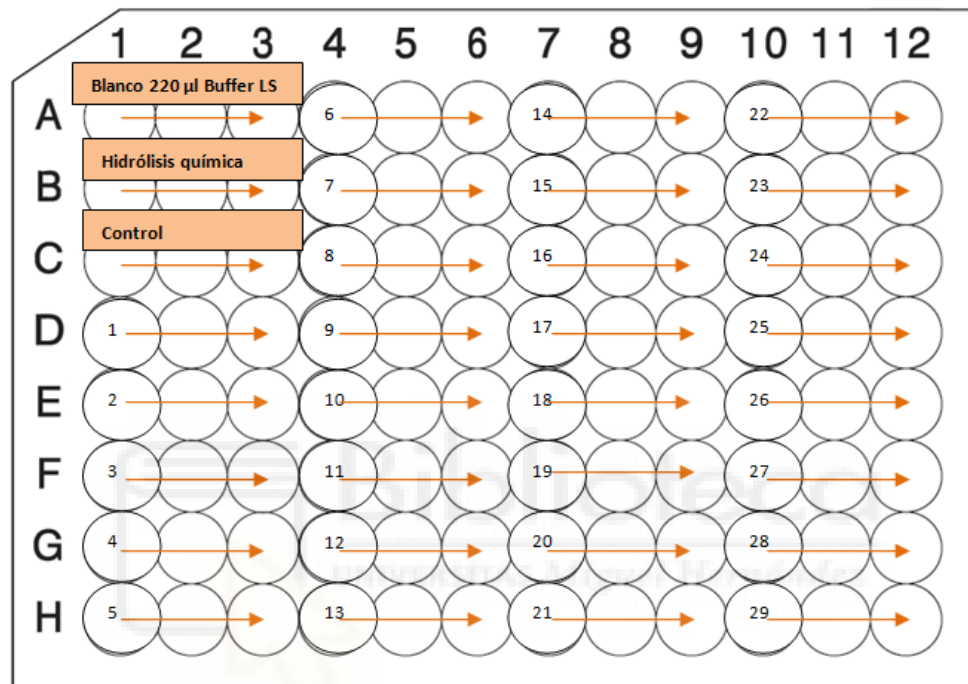
#### 3.4.3. Medición de actividad PON1 en el espectrofotómetro.

Para determinar la actividad PON1 de las 29 muestras ya preparadas y diluidas, se prepararon 3 microplacas de 96 pocillos, una para cada actividad y en el siguiente orden: 1° CMPA, 2° PALS y 3° PAHS. En cada microplaca se añadió:

- I. Un blanco con Tampón LS y sin sustrato (Control 1).

- II. Un control de hidrólisis química (no enzimática) con sustrato pero sin suero, es decir, añadiendo primero 20 µl de Tampón LS y segundo, añadiendo 200 µl del sustrato correspondiente a cada actividad, CMPA, PALS o PAHS. (Control 2).
- III. Un suero control. Este control y junto con el resto de pocillos, contienen 20 µl de muestra y 200 µl del sustrato correspondiente a cada actividad, CMPA, PALS o PAHS. (Control 3).

La distribución de las muestras en cada microplaca se realizó por triplicado y es la que se describe a continuación (Figura 6):



**Figura 6. Representación de una microplaca de 96 pocillos según la distribución de controles y muestras por triplicado para el análisis en espectrofotómetro.** Blanco (A123), Hidrólisis química (B123), Suero control (C123), y n=29 muestras desde D123 hasta H10, 11, 12.

Se añadieron primero 20 µl de los controles y muestras en los pocillos de las columnas 1, 2 y 3, diluyéndolas (excepto el blanco) a través de una pipeta multicanal con 200 µl del sustrato correspondiente (CMPA, PALS o PAHS). Seguidamente se procedió al análisis de cada columna por separado en el espectrofotómetro de microplacas SPECTRO star Omega (BMG Labtech). Éste ofrece 15 datos de absorbancia en 15 tiempos durante 1'52", lo que dura una medición.

A continuación se añadieron las correspondientes muestras y sustratos a las siguientes columnas 4, 5 y 6 y se midió, siguiendo con las siguientes 7, 8 y 9 columnas y finalizando con la 10, 11 y 12. Las condiciones de temperatura ambiente de trabajo fueron 25°C.

Las actividades de PALS y PAHS se midieron en una longitud de onda de 270 nm, y las de CMPA a 280 nm, que son respectivamente las longitudes en las cuales el sustrato absorben

sendos productos de reacción. Todos los datos fueron guardados y trasladados para su análisis estadístico.

### 3.4.4. Cálculo de la actividad enzimática PON1.

Con las absorbancias recogidas de los ensayos CMPA, PALS y PAHS, se calcularon las actividades PON1 de las 29 muestras de suero humano, analizadas por triplicado.

En primer lugar se calcularon las actividades a partir de la media de absorbancias recogidas en los 15 tiempos de una medición para cada triplicado, según la siguiente expresión derivada de la ley de Lambert-Beer (Figura 7).

$$\text{Actividad} = \frac{V \times m}{\epsilon \times \frac{V_s}{d} \times l}$$

**Figura 7. Expresión de cálculo de actividad enzimática de la PON1 (μmol/min/mL).**

V (volumen total), m (pendiente de la recta representada entre la absorbancia y el tiempo), ε (coeficiente de extinción molar), Vs (Volumen de suero), d (factor de dilución).

Con las actividades de los triplicados se calculó la media de cada actividad (μmol/min/mL) ± desviación estándar (SD) y los porcentajes del coeficiente de variación (CV%)= SD/Media x 100. Se consideraron valores de actividad aceptables todos aquellos cuyo CV% fue menor a 20.

Los factores de cálculo que se emplearon para obtener la actividad según la fórmula expresada anteriormente se indican a continuación (tabla 2):

**Tabla 2. Factores de cálculo de actividad PON1.**

Actividad	V (μl)	ε (mM <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )	Vs (μl)	Factor dilución
CMPA	220	1,3	20	40
PALS	220	1,31	20	80
PAHS	220	1,31	20	40

V (volumen total), ε (coeficiente de extinción molar), Vs (Volumen de suero diluido).

### 3.5. Genotipado inferido

A partir de la media de las actividades séricas de CMPA y PAHS para cada caso se infirió el genotipo PON<sub>192</sub> de las 29 muestras de suero humano, según tres grupos: PON<sub>1Q/Q192</sub>; PON<sub>1Q/R192</sub>; PON<sub>1R/R192</sub>, siguiendo el método de Richter et al., 2008.

Así mismo se calcularon las frecuencias alélicas f(Q) y f(R) mediante las siguientes expresiones (Figura 8).

$$f(Q) = \frac{n_{QQ} \times 2 + n_{QR}}{2 \times n_T} \quad f(R) = \frac{n_{RR} \times 2 + n_{QR}}{2 \times n_T}$$

**Figura 8. Expresiones de cálculo de frecuencias alélicas f(Q) y f(R) según el número de individuos y los genotipos inferidos PON1Q/Q192/ PON1Q/R192/ PON1R/R192.**

nQQ (número de individuos con genotipo Q/Q), nQR (número de individuos con genotipo Q/R), nRR (número de individuos con genotipo R/R), nT (número de individuos totales).

### 3.6. Validación del blanco y el control de hidrólisis química.

Por último, se validaron el blanco y el control de hidrólisis química utilizados en el ensayo de medición de la actividad PON1 de muestras séricas humanas. Se comparó frente al suero control y se comprobó su validez a lo largo de los 15 ciclos en el espectrofotómetro.

### 3.7. Análisis estadístico

Atendiendo al ensayo del apartado 4.3.2, de estabilidad de las muestras tras 24h de descongelación almacenadas a 4-8°C, se compararon las actividades con las del ensayo intradía (día cero de descongelación). Se realizó el test estadístico de la t-student para muestras independientes.

En cuanto a los datos obtenidos del cálculo de la actividad PON1 en muestras de suero humano y el genotipado inferido (ver apartados 4.4.4 y 4.5), se comprobó si había diferencias significativas (ANOVA) entre las tres actividades (CMPA, PALS y PAHS) y las 29 muestras analizadas.

Además, se realizó el análisis de la varianza de un factor (ANOVA) de las tres actividades, CMPA, PALS y PAHS frente a los genotipos inferidos, Q/Q, Q/R y R/R.

Por último, se realizó el test de la t-student para obtener una comparativa de variables farmacológicas y médicas entre sexos.

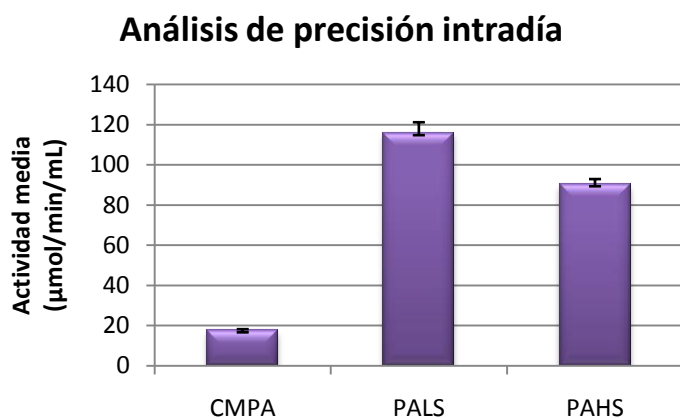
Se utilizó la herramienta de 'Analyse-it®' para el software Microsoft Excel.



## 4. RESULTADOS

### 4.1. Ensayo de precisión intradía

La actividad fue menor en CMPA que en PAHS y PALS (16, 82.9, 106.5  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$ ) (Figura 9).



**Figura 9. Análisis de precisión de las actividades CMPA, PALS, PAHS en el suero control.** N=6 muestras suero. Cada muestra control se analizó por triplicado.

Se consideró una precisión alta, ya que los resultados del coeficiente de variación muestran un valor menor a 5%. (Tabla 3).

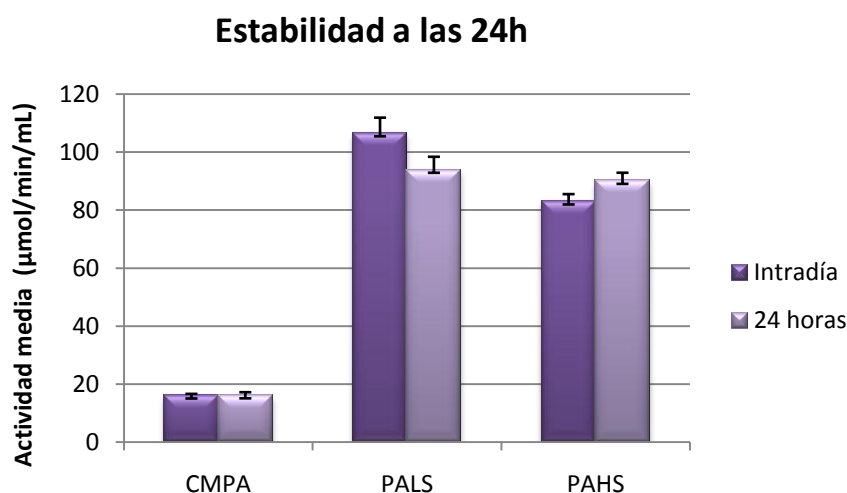
**Tabla 3. Coeficientes de variación de las actividades CMPA, PALS y PAHS de las muestras control del ensayo intradía.**

	Actividad	CV%
<b>CMPA</b>	17,65	3,4
<b>PALS</b>	115,72	4,9
<b>PAHS</b>	90,31	2,9

Porcentaje del coeficiente de variación (CV%) para cada actividad= Desviación estándar (SD) /Media x 100. Los datos se expresan como la media  $\pm$  Desviación estándar (SD). Actividad medida en  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$ .

### 4.2. Ensayo de estabilidad a las 24h almacenado entre 4-8°C

Según la prueba de la t-student, no se observaron diferencias significativas entre el tiempo 0h y las 24 h de refrigeración para las actividades CMPA y PAHS (8,5% y 0,25% respectivamente). Sin embargo, sí que se observó una diferencia significativa para la actividad PALS (18,8%). (Figura 10).



**Figura 10. Ensayo de estabilidad de las actividades PON1 tras mantener el suero control durante 24 horas entre 4-8 °C.**

Los datos se expresan como la media  $\pm$  Desviación estándar (SD). Intradía n=6 y 24h n=3.

Seguidamente, se compararon los resultados de actividad a 0h y a 24h de la descongelación. (Tabla 4).

**Tabla 4. Comparativa de actividad y coeficientes de variación en muestras control determinadas a cero horas tras la descongelación y a las 24 horas mantenidas entre 4-8°C.**

Actividad	CV% 0h	CV% 24h	Actividad 0h	Actividad 24h	Valor p de t-student
<b>CMPA</b>	3,38	6,84	17,65	16,14	0,203
<b>PALS</b>	4,93	4,82	115,72	93,91	0,008
<b>PAHS</b>	2,86	3,15	90,31	90,08	0,963

Coefficiente de variación (CV) = Desviación estándar (SD) /Media x 100. Actividad medida en  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$ .

#### 4.3. Ensayo de estabilidad de sustratos

En la longitud de onda a la que absorben el producto de reacción el acetato de 4-(clorometil) fenilo (CMPA) a 280 nm, y el acetato de fenilo (PA) a 270 nm, se confirmó la ausencia de un pico, por tanto, la hidrólisis química de los sustratos se consideró despreciable y en consecuencia el sustrato se consideró estable en las condiciones experimentales (ver preparación de los sustratos en Materiales y métodos). (Figura 11).

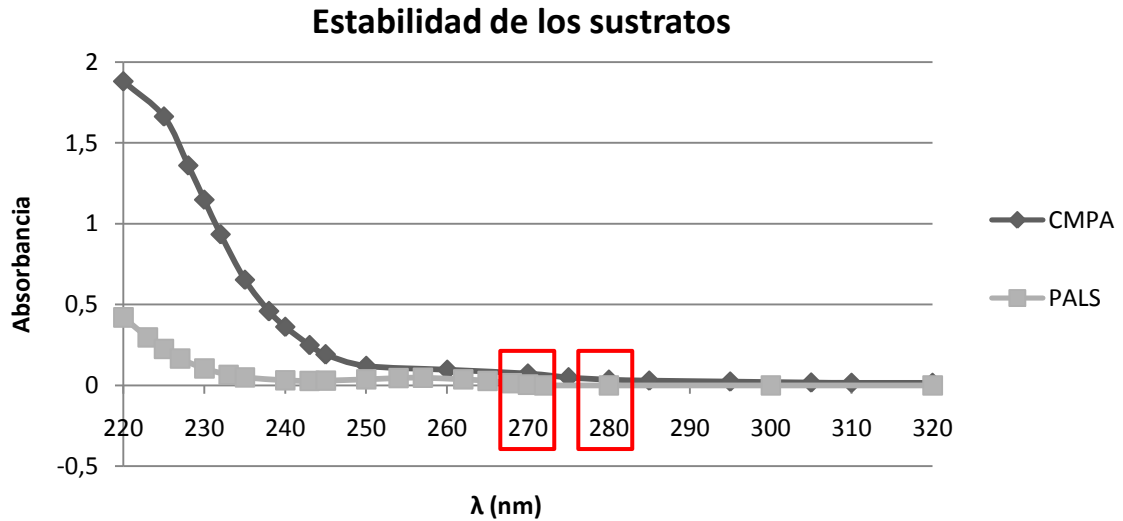
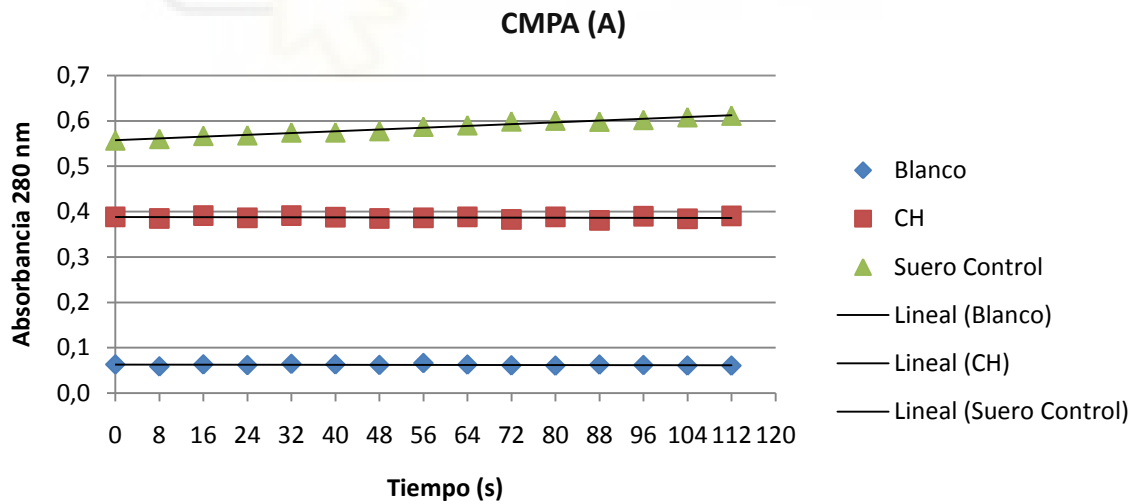


Figura 11. Espectro de absorbancias de los sustratos acetato de 4-(clorometil) fenilo (CMPA) y acetato de fenilo (PA) a 270 y 280 nm respectivamente.

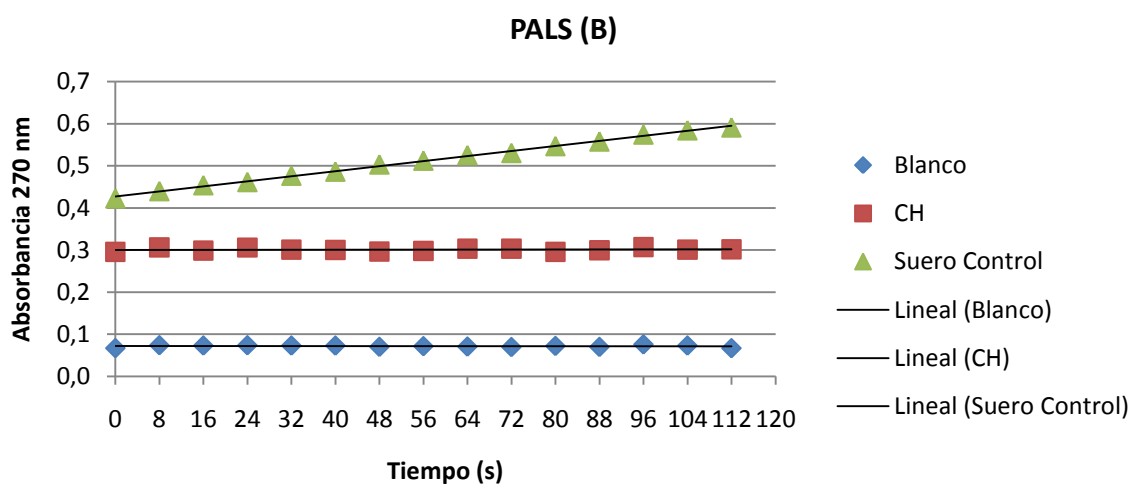
#### 4.4. Validación del blanco y el control de hidrólisis química en la medición de PON<sub>1</sub>.

No se produjo actividad en el control de hidrólisis química (CH) ni en el blanco en las tres actividades medidas, CMPA (A), PALS (B) y PAHS (C). (Figura 12).

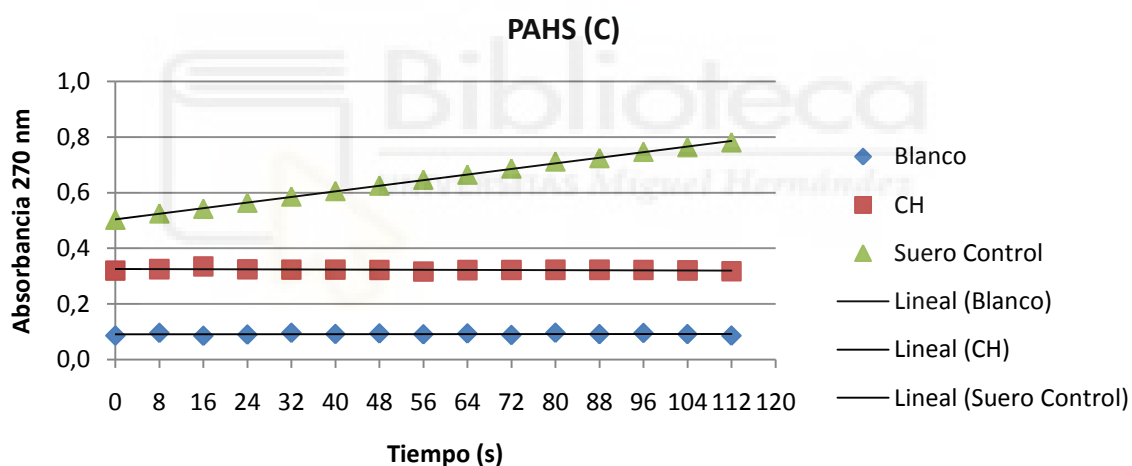
(A) Suero Control ( $R^2 = 0,978$ ); Blanco ( $R^2 = 0,048$ ); CH ( $R^2 = 0,035$ )



(B) Suero Control ( $R^2 = 0,997$ ); Blanco ( $R^2 = 0,011$ ); CH ( $R^2 = 0,015$ )



(C) Suero Control ( $R^2 = 0,999$ ); Blanco ( $R^2 = 0,008$ ); CH ( $R^2 = 0,221$ )



**Figura 12. Representación de absorbancias frente al tiempo de los controles de blanco, hidrólisis química (CH) y suero control para las tres actividades CMPA (A), PALS (B) y PAHS (C).**

A continuación se muestra la validez del blanco y el control de hidrólisis química (CH), que no presentan actividad, en comparación al suero control que sí que presenta. (Tabla 5).

**Tabla 5. Actividades de los controles de CH y blanco con respecto al suero control (**

Actividades	Blanco	CH	Suero Control
<b>CMPA</b>	-0,4	-0,5	15,52
<b>PALS</b>	-0,5	0,8	93,39
<b>PAHS</b>	0,3	-1,7	78,45

CH (Hidrólisis química). Actividad medida en  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$ .

#### 4.5. Ensayo de actividad PON1 y genotipo inferido.

Las medias de las actividades de las 29 muestras de suero fueron 20,2  $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{mL}$  para CMPA, 63,4  $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{mL}$  en PAHS y 101,8  $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{mL}$  en PALS. (Figura 13).

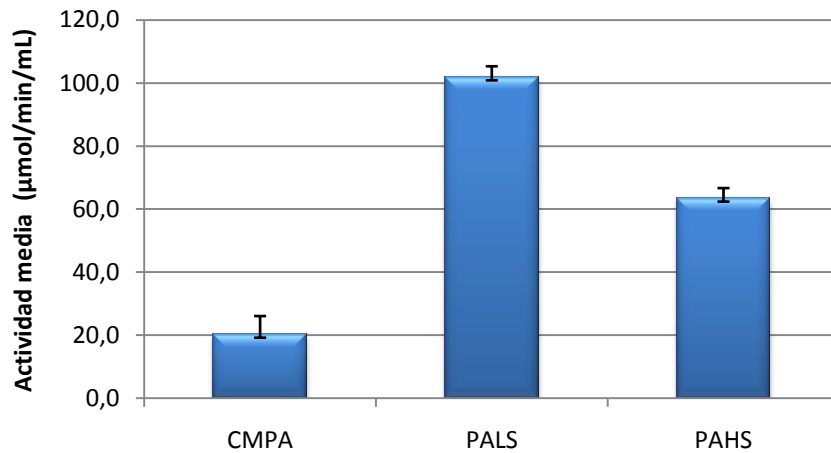


Figura 13 Media de actividades PON1 (CMPA, PALS Y PAHS) que resume las 29 muestras.

Se representó la actividad CMPA frente a la PAHS de las 29 muestras, resultando en tres regresiones lineales, una para cada genotipo inferido, QQ ( $R_2=0,646$ ), QR ( $R_2=0,81$ ) y RR ( $R_2=0,989$ ) (Figura 14).

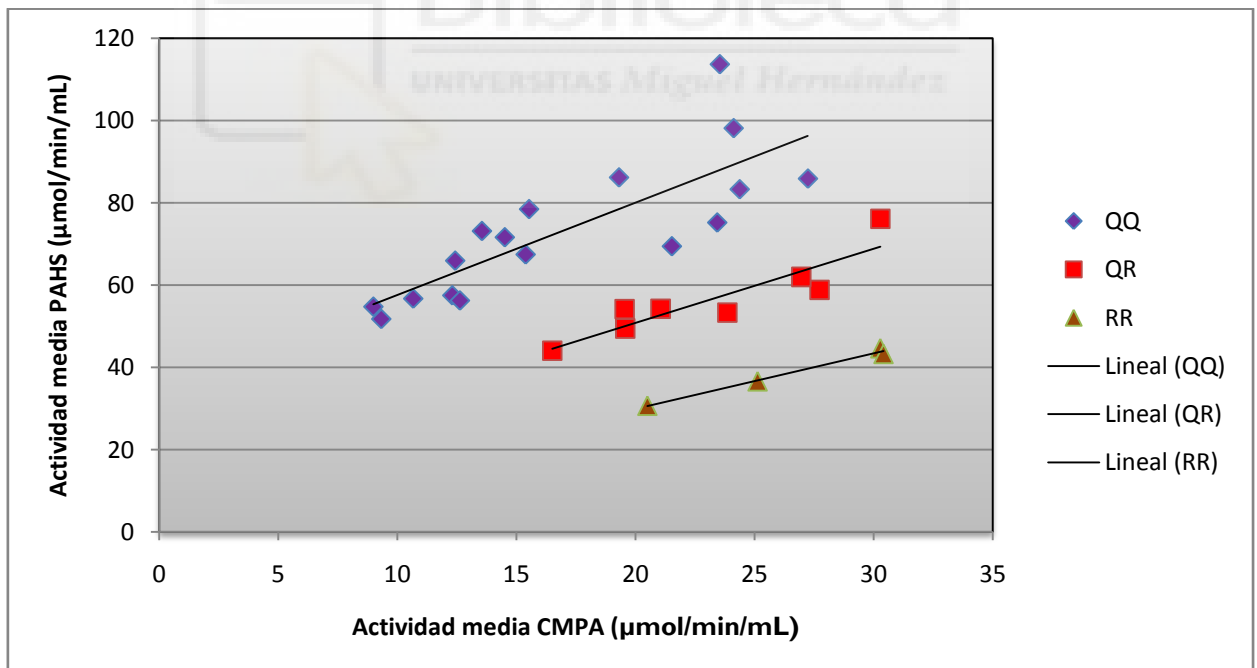


Figura 14. Determinación de la actividad hidrolítica de PON1<sub>192</sub> para cada fenotipo/genotipo utilizando los sustratos CMPA y PA.

N=29. QQ indica PON1<sub>Q/Q192</sub>; QR, PON1<sub>Q/R192</sub>; RR, PON1<sub>R/R192</sub>.

Se obtuvieron las frecuencias alélicas 0,72 para f(Q) y 0,28 para f(R) (Tabla 6).

A continuación se muestran las frecuencias de cada genotipo inferido junto con el número de individuos perteneciente a cada grupo.

**Tabla 6. Frecuencias genotípicas de PON1<sub>192</sub>QQ, PON1<sub>192</sub>QR y PON1<sub>192</sub>RR.**

Genotipo	N° individuos	Frecuencia
Q/Q	17	0,59
Q/R	8	0,27
R/R	4	0,14
<b>Total</b>	<b>29</b>	<b>1</b>

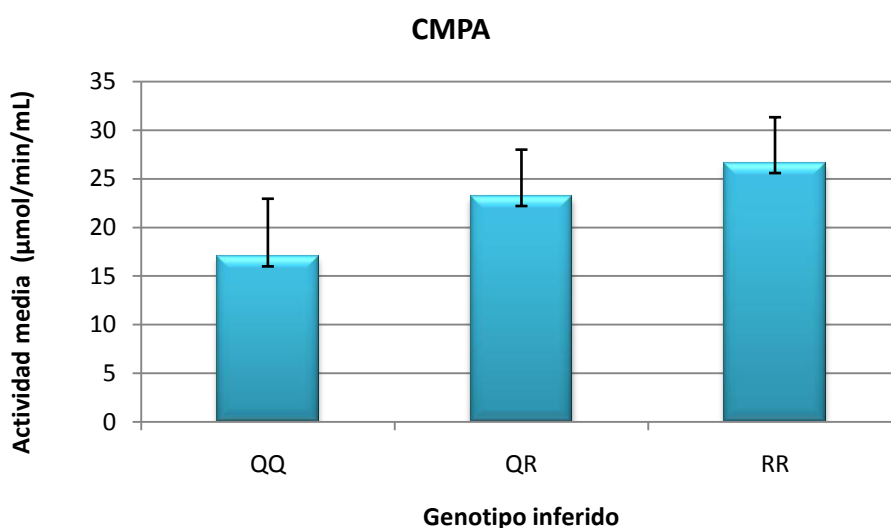
La comparativa entre las distintas actividades PON1 de los pacientes en estudio respecto al Suero Control (Tabla 7) mostró un porcentaje mayoritario de individuos con menor actividad PAHS y CMPA (56%) en el grupo genotípico QQ. La totalidad de individuos de genotipo QR y RR mostró una menor actividad arilesterasa en presencia de sal (PAHS) y mayor en CMPA.

**Tabla 7. Porcentaje de actividades respecto al Suero Control.**

Grupo genotípico	% Actividades		
	M PAHS y CMPA	m PAHS y M CMPA	m PAHS y CMPA
QQ	31	13	56
QR y RR	0	100	0

M (Mayor); m (menor); Genotipos QQ, QR y RR constituyen PON1<sub>Q/Q192</sub>, PON1<sub>Q/R192</sub> y PON1<sub>R/R192</sub> respectivamente.

Según el test de ANOVA, se encontraron diferencias significativas de actividad entre los distintos genotipos, con un valor  $p = 0,004$  ( $p < 0,05$ ). (Figura 15)



**Figura 15. Representación de actividades CMPA frente al genotipo inferido, QQ, QR y RR.**

Tabla 8. Actividades de CMPA con desviación estándar (SD) según el genotipo inferido.

Genotipo inferido	CMPA	CMPA SD
QQ	16,98	5,96
QR	23,19	4,80
RR	26,58	4,75

Actividad medida en  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$ .

Según el test de ANOVA, no se encontraron diferencias significativas de actividad entre los distintos genotipos, con un valor  $p = 0,877$  ( $p > 0,05$ ). (Figura 16)

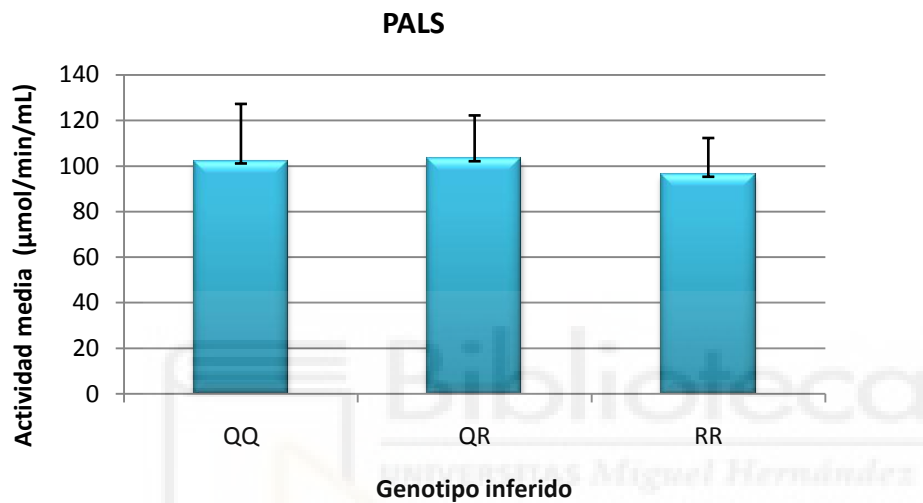


Figura 16. Representación de actividades PALS frente al genotipo inferido, QQ, QR y RR.

Tabla 9. Actividades de PALS con desviación estándar (SD) según el genotipo inferido.

Genotipo inferido	PALS	PALS SD
QQ	102,07	25,12
QR	103,04	19,10
RR	96,23	16,00

Actividad medida en  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$ .

Según el test de ANOVA, se encontraron diferencias significativas de actividad entre los distintos genotipos, con un valor  $p = 0,0003$  ( $p < 0,05$ ). (Figura 17)

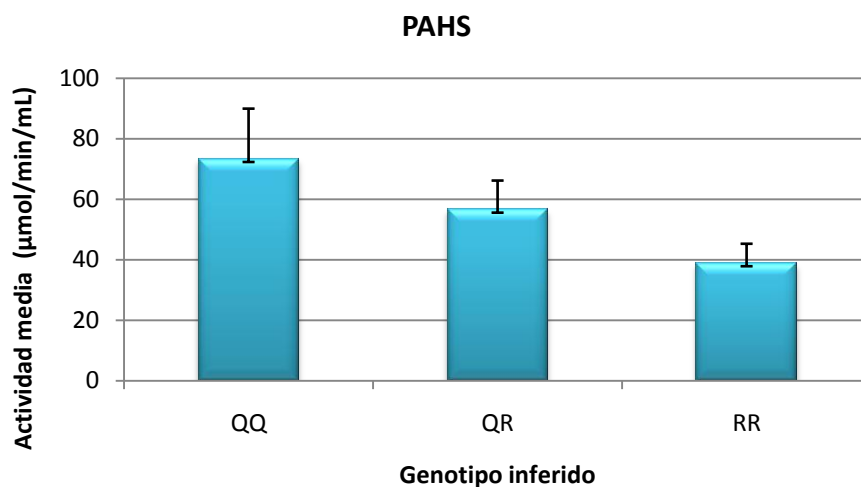


Figura 17. Representación de actividades PAHS frente al genotipo inferido, QQ, QR y RR.

Tabla 10. Actividades de PALS con desviación estándar (SD) según el genotipo inferido.

Genotipo inferido	PAHS	PAHS SD
QQ	73,24	16,64
QR	56,50	9,61
RR	38,78	6,44

Actividad medida en  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$ .

Según el test de ANOVA, hubieron diferencias significativas de actividad entre los distintos genotipos según la razón de actividades PAHS/CMPA, con un valor  $p = 4,8 \text{ E-}09$  ( $p < 0,05$ ). (Figura 18).

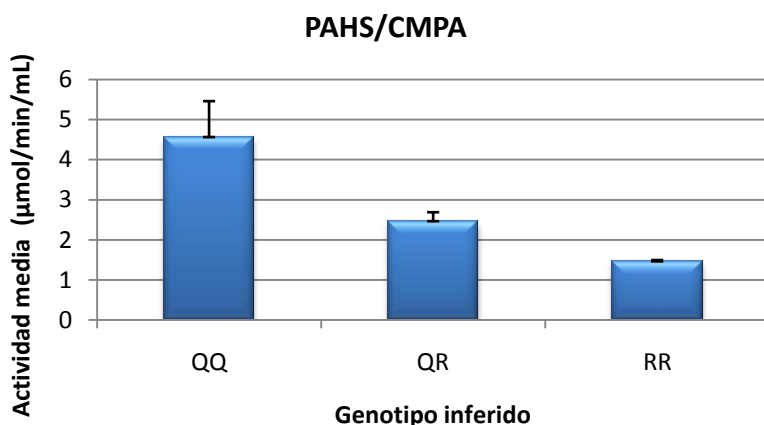


Figura 18. Razón de actividades PA HS/CMPA para cada uno de los genotipos inferidos QQ, QR y RR.



Tabla 11. Razón de actividades PAHS/CMPA con desviación estándar (SD) según el genotipo inferido.

Genotipo inferido	PAHS / CMPA	PAHS / CMPA SD
QQ	4,56	0,89
QR	2,46	0,22
RR	1,46	0,03

Según el test de ANOVA, hubieron diferencias significativas de actividad entre los distintos genotipos según la razón de actividades PALS/PAHS, con un valor  $p = 0,0006$  ( $p < 0,05$ ). (Figura 19)

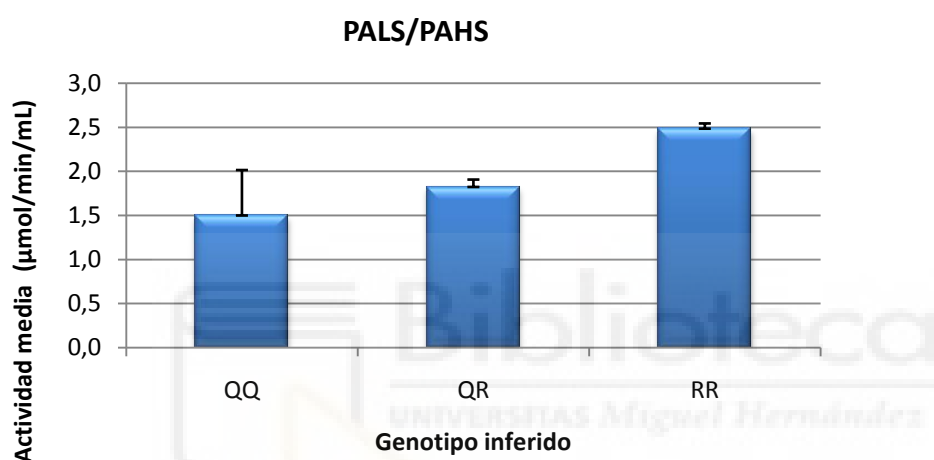


Figura 19. Razón de actividades PALS/PAHS para cada uno de los genotipos inferidos QQ, QR y RR.

Tabla 12. Razón de actividades PAHS/CMPA con desviación estándar (SD) según el genotipo inferido.

Genotipo inferido	PALS / PAHS	PALS / PAHS SD
QQ	1,498	0,515
QR	1,822	0,084
RR	2,482	0,059

#### 4.6. Análisis descriptivo de variables farmacológicas y médicas.

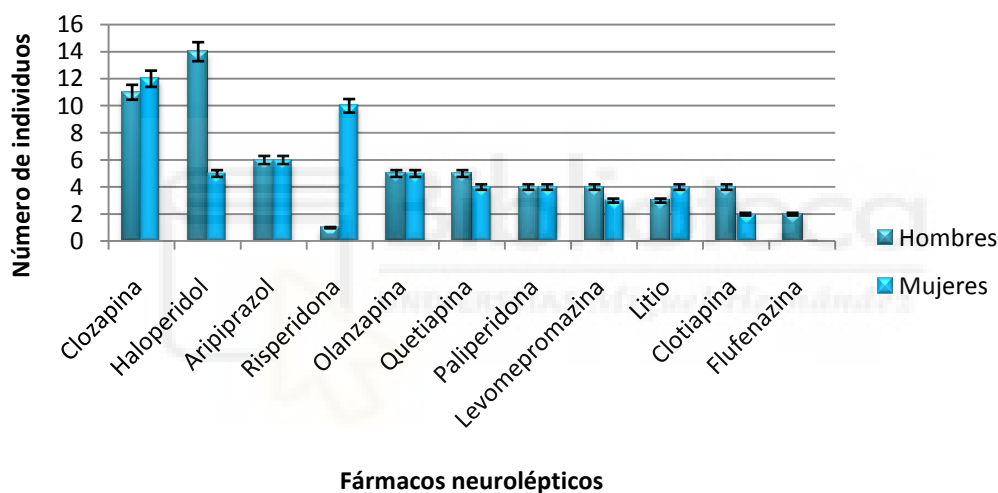
A través de un análisis de datos de 27 mujeres y 33 hombres, se obtuvieron datos de toma de los distintos psicofármacos y distintos trastornos metabólicos.

Los pacientes ensayados en este estudio estaban siendo medicados con neurolepticos (97%), anticonvulsionantes (60%), ansiolíticos (58%), antidepresivos (23%) y fármacos para el Parkinson (23%). Además, varios de ellos padecían sobrepeso (47%), dislipidemia (32%), hipertensión arterial (18%) y Diabetes Mellitus II (8%).

##### 4.6.1. Variables farmacológicas:

- **Fármacos neurolepticos**

El 100% de las mujeres y el 97% de los hombres tomaban neurolepticos. (Figura 20)



**Figura 20. Toma diaria de fármacos neurolepticos más ingeridos frente al número de individuos.**

Se observó que varios pacientes recibían varios fármacos. En cuanto a diferencias entre hombres y mujeres, solo se observaron diferencias significativas en la toma de Risperidona con un valor de  $p=0,003$  ( $<0,05$ ) según t-student.

Los fármacos más ingeridos son clozapina (40%), haloperidol (33%), aripiprazol (21%), risperidona (19%) y olanzapina (17%). (Figura 21).

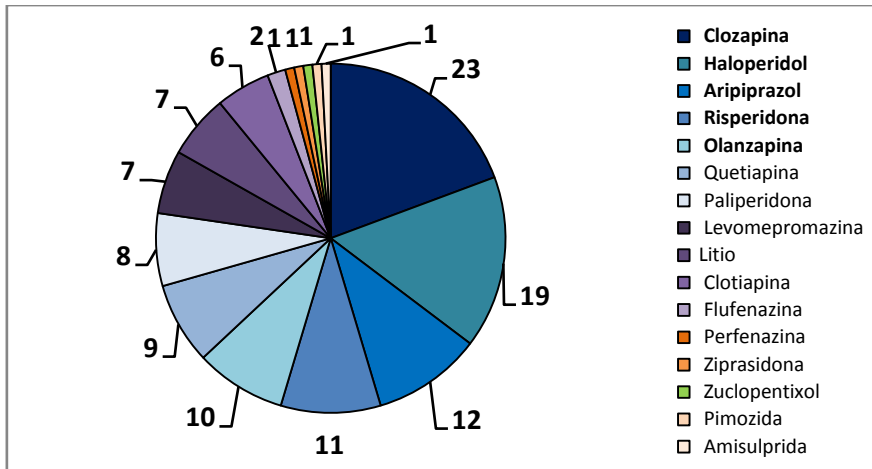


Figura 21. Toma de los distintos neurolépticos de mayor (19) a menor (1) proporción de individuos.

- **Fármacos anticonvulsiantes**

Un 65,5% del total de hombres y un 55,5% de las mujeres tomaban anticonvulsiantes (Figura 22).

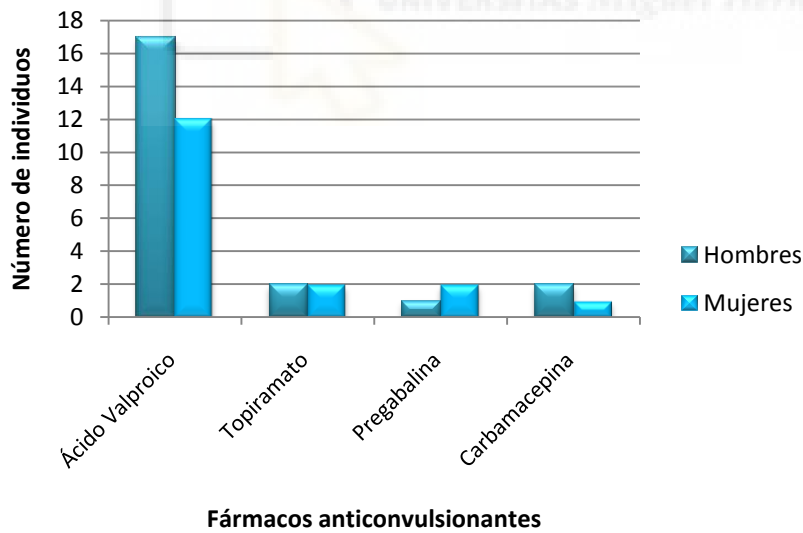


Figura 22. Toma diaria de fármacos anticonvulsiantes más ingeridos frente al número de individuos.

No se observaron diferencias significativas entre hombres y mujeres según t-student.

Los fármacos más ingeridos son el ácido valproico (48,3% del total de individuos), topiramato (6,7%), pregabalina (5%) y carbamacepina (5%). (Figura 23).

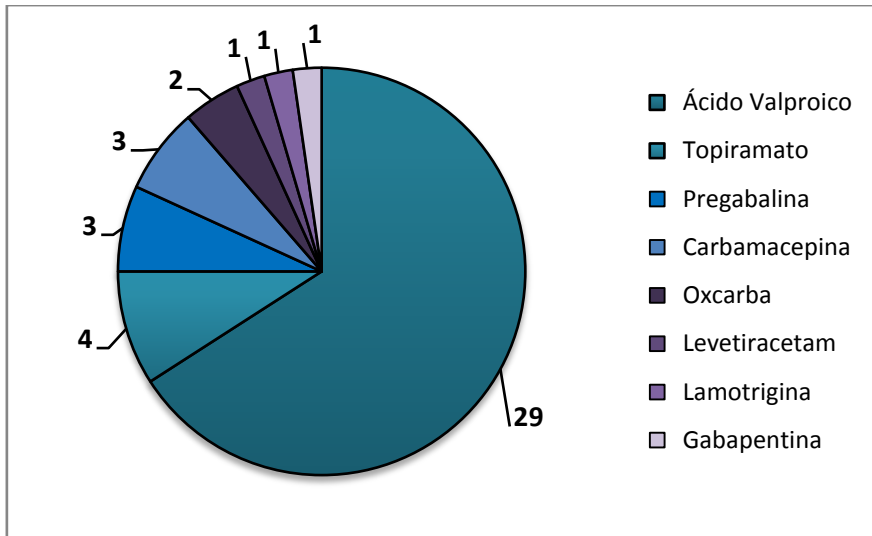


Figura 23. Toma de los distintos anticonvulsionantes de mayor (29) a menor (1) proporción de individuos.

- **Fármacos antidepresivos**

Un 22% del total de hombres y un 26% de las mujeres tomaban fármacos antidepresivos (Figura 24).

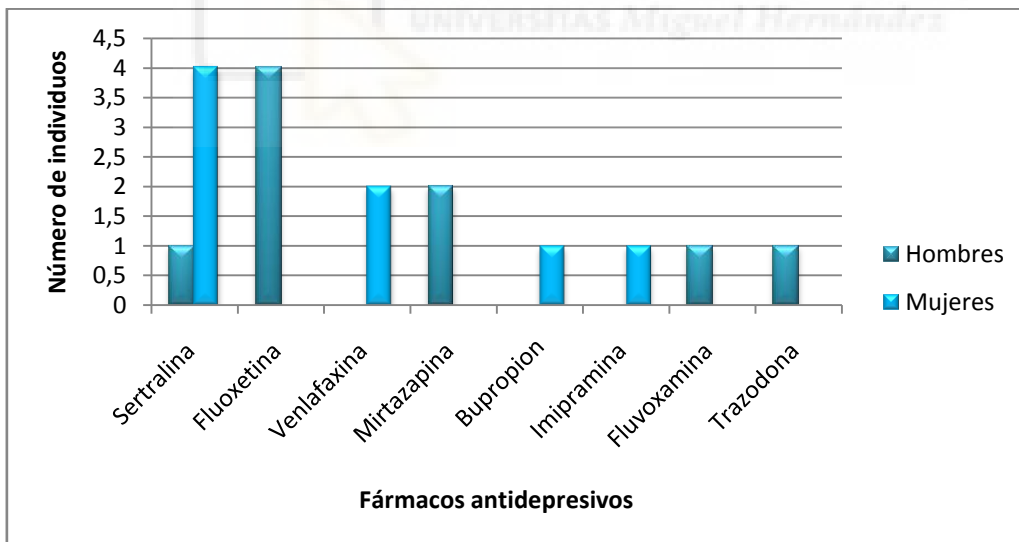
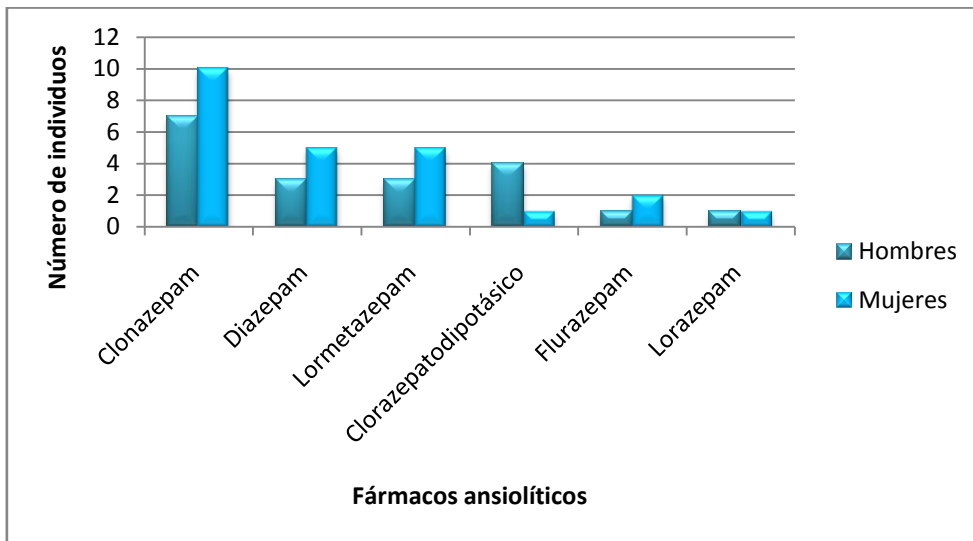


Figura 24. Toma diaria de fármacos antidepresivos más ingeridos frente al número de individuos.

Se observaron diferencias entre hombres y mujeres. Los fármacos venlafaxina, bupropion e imipramina eran únicamente tomados por mujeres, y mirtazapina, fluvoxamina y trazodona eran consumidos por hombres; siendo setralina el único fármaco compartido por ambos sexos, aunque en mayor proporción para el femenino.

- **Fármacos ansiolíticos**

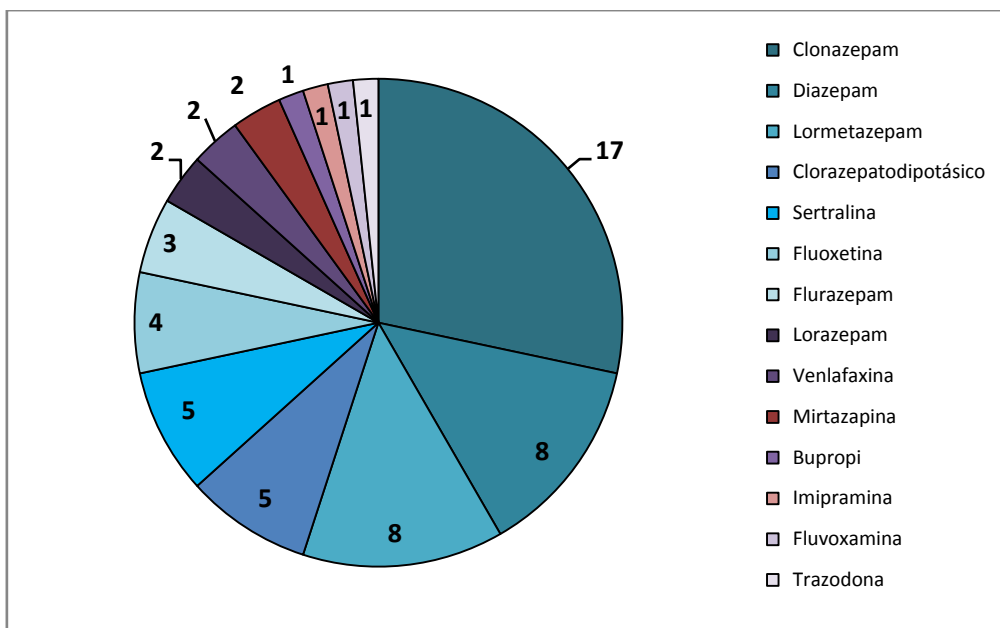
Un 53% del total de hombres y un 66,7% de las mujeres tomaban fármacos ansiolíticos (Figura 25).



**Figura 25. Toma diaria de fármacos ansiolíticos más ingeridos frente al número de individuos.**

No se observaron diferencias significativas entre hombres y mujeres según t-student, aunque cabe decir que sí había más mujeres que hombres tomando ansiolíticos.

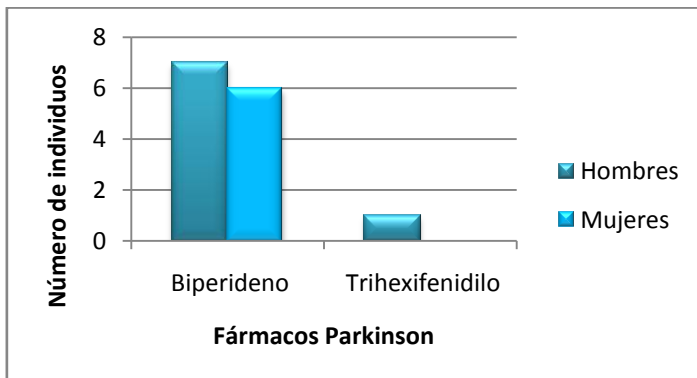
En el gráfico de proporciones de antidepresivos y ansiolíticos se muestra que los fármacos más ingeridos son el clonazepam (28,3% del total de individuos), diazepam (13,3%), lormetazepam (13,3%) y clorazepatodipotásico (8,3%). (Figura 26).



**Figura 26. Toma de los distintos anticonvulsionantes de mayor (29) a menor (1) proporción de individuos.**

- **Fármacos contra el Parkinson:**

Un 25% de hombres y un 22,2% de mujeres tomaban medicamentos para el parkinson (Figura 27).

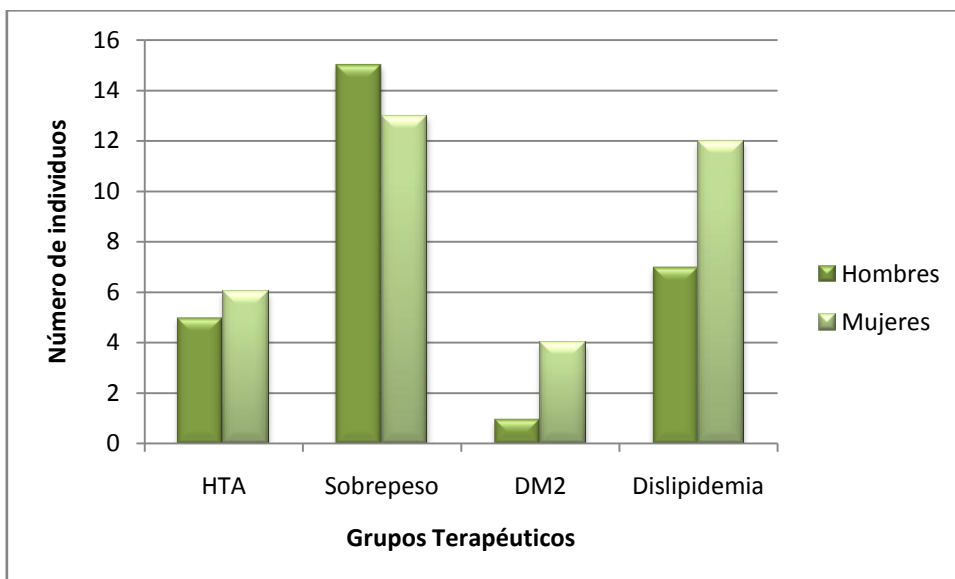


**Figura 27. Toma diaria de fármacos contra el Parkinson ingeridos frente al número de individuos.**

No se observaron diferencias significativas entre hombres y mujeres, únicamente un hombre tomaba trihexifenidilo, y el resto de hombres (25% del total) y mujeres (22,2%) tomaban biperideno.

#### 4.6.2. Variables médicas

Según los datos de los grupos terapéuticos se obtuvieron porcentajes de hipertensión (HTA) (15,6% del total de hombres y 23,1% de las mujeres), sobrepeso (47% hombres y 50% mujeres), Diabetes Mellitus II (DM2) (3,12% hombres y 15,4% mujeres) y dislipidemia (22% hombres y 46,2% mujeres). (Figura 28).



**Figura 28. Grupos terapéuticos frente al número de individuos.**

HTA (hipertensión arterial), DM2 (Diabetes Mellitus II).

No se observaron diferencias significativas entre hombres y mujeres según t-student.

Un mismo caso podía estar en varios grupos terapéuticos. La prevalencia de afección metabólica fue mayor en el grupo femenino.

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. Determinación de la actividad PON1.

Se consideró que la precisión del método era adecuada, así como la ausencia de hidrólisis química de los sustratos tanto en el espectro de absorción como en la microplaca, cuya pendiente ~ 0 apoya que la actividad es específica del propio suero. Debido a que en el ensayo de estabilidad 24h se obtuvieron diferencias significativas en la actividad PALS, se decidió y se recomienda analizar las muestras el mismo día de la descongelación. Estos ensayos previos permiten asegurar que el método es preciso, y se hallan acorde con estudios previos (Gallego 2019; Richter et al. 2008).

### 5.2. Ensayo de actividad PON1 y genotipo inferido en muestras humanas.

#### 5.2.1. Niveles de actividad de PON1.

La media de las actividades PON1 fue más baja en CMPA, con diferencia frente a PAHS y PALS. (Tabla 13). Esto se debe a que PON1 tiene menor capacidad enzimática para hidrolizar CMPA, siendo mayor su actividad arilesterasa para hidrolizar PA. A su vez, la actividad de PAHS (alta en sal) es menor que la de PALS (baja en sal), ya que el NaCl presente únicamente en PAHS es inhibitorio de la actividad arilesterasa conforme a la literatura (Ritcher et al. 2008).

Tabla 13. Rango de actividades CMPA, PALS y PAHS.

Estudio	Actividad ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$ )		
	CMPA LS	PALS	PAHS
Ritcher et al., 2008	5-60	20-160	20-225
Gallego 2019	4-32	14-112	20-190
Presente TFM	9-30	70-144	30-113

#### 5.2.2. Genotipo inferido.

Las frecuencias alélicas de este estudio poseen concordancia con estudios anteriores en población caucásica (Mackness and Mackness 2015) (Tabla 14). Cabe señalar que la frecuencias alélicas PON1<sub>R/R192</sub> y PON1<sub>Q/Q192</sub> varían según la etnia, pudiendo aumentar el polimorfismo R de un 15-30% de la población caucásica a un 70-90% en poblaciones del lejano oriente y de África subsahariana (Mackness and Mackness 2015), y hasta 5 veces más en población afroamericana (McDaniel et al. 2014).

**Tabla 14. Frecuencias alélicas PON1<sub>192</sub> en distintas poblaciones.**

Estudio	Frecuencias alélicas (%)		Población
	f(R)	f(Q)	
Mackness and Mackness, 2015	15-30	70-85	Caucásica
Presente TFM	28	72	Caucásica
Mackness and Mackness, 2015	70-90	10-30	Oriental y subsahariana

f(R): frecuencia de la aloforma PON1<sub>R192</sub>; f(Q): frecuencia de la aloforma PON1<sub>Q192</sub>.

Los ensayos realizados en este trabajo revelan distintos niveles de hidrólisis entre las dos aloformas, PON<sub>Q192</sub> y PON<sub>R192</sub>. De esta manera se pudieron diferenciar los genotipos inferidos, ya que presentaban distintas actividades PAHS y CMPA. Así el genotipo PON<sub>1R/R192</sub> era más eficaz en la hidrólisis del CMPA, mientras que en las actividades PAHS y PALS, el genotipo PON<sub>1R/R192</sub> era el que menor hidrólisis mostraba, siendo PON<sub>1Q/Q192</sub> el que ejercía mayor actividad arilesterasa (hidrólisis de PA). (Richter et al. 2008).

De manera orientativa, en el grupo genotípico PON<sub>1Q/Q192</sub> (QQ), un 56% de individuos presentaban menor actividad PAHS y también menor actividad CMPA respecto al suero control; sólo un 31% tenían mayor actividad PAHS y CMPA que el suero control, y un 13% mostraban mayor actividad CMPA y menor PAHS. Respecto a los grupos genotípicos PON<sub>1Q/R192</sub> (QR) y PON<sub>1R/R192</sub> (RR), el 100% de individuos presentaba menor actividad PAHS y mayor actividad CMPA que el suero control. Sin embargo, es necesario realizar estudios futuros con mayor número de individuos en el grupo control con el objeto de conocer si el tratamiento psiquiátrico produjo un efecto sobre la actividad PON1.

### 5.2.3. Efecto del tratamiento psiquiátrico en la actividad PON1

Se sabe que el tratamiento psicofarmacológico altera el sistema endocrino y metabólico, lo cual hace de los pacientes psiquiátricos un grupo de riesgo en cuanto a enfermedades cardiovasculares y una consecuente mortalidad temprana con una pérdida de entre 15 y 20 años de vida (Ozenoglu et al. 2008).

Se podría considerar que PON1 está implicada en la ruta de acontecimientos adversos desencadenados por el consumo de psicofármacos. Aunque los mecanismos de acción son diversos y no están totalmente aclarados, se ha demostrado que existe un factor de protección por parte de la PON1. En consecuencia, una disminución de su actividad representaría un factor de susceptibilidad a alteraciones endocrinas mediadas por los psicofármacos. Así como el tratamiento farmacológico causa efectos adversos interaccionando con diversas dianas endógenas, la alteración de la actividad PON1 por dicho tratamiento podría estar involucrada en el desarrollo de la enfermedad. En consecuencia, sería interesante conocer si esas condiciones médicas vienen acompañadas de alteraciones de la PON1, en lo que contribuye el presente proyecto (Abosi et al. 2018).

En línea con las condiciones médicas y el consumo de psicofármacos, se analizaron varios parámetros bioquímicos en un estudio con 22 mujeres obesas tomando ansiolíticos, antidepresivos, antipsicóticos y estabilizadores del ánimo, y se observaron niveles PON1 reducidos frente al grupo control. (Ozenoglu et al. 2008).



Se ha informado que fármacos antipsicóticos o neurolépticos como la clozapina y la risperidona, administrados en el presente estudio a un 40% y un 19% de casos respectivamente, provocan una disminución de la actividad lactonasa de PON1 (Moreira et al. 2019). La olanzapina disminuyó la actividad paraoxonasa y arilesterasa en pacientes con genotipo QQ (Pavál et al. 2018). La risperidona, el aripiprazol y el haloperidol han demostrado efectos inhibitorios de la actividad PON1 sérica (Demir, Balci and Gürbüz 2019; Avcikurt, Sinan and Kockar 2015).

Los antidepresivos fluoxetina y mirtazapina, suministrados a un 7% y un 3% respectivamente en el presente trabajo, influyen en una reducción de la actividad PON1 en suero humano (Avcikurt et al. 2015, Demir et al. 2019). La sertralina, administrada a un 8%, ha demostrado disminuir la actividad PON1 sérica, así como un incremento de óxido nítrico (NO) aumentando la peroxidación hepática (Abdel-Salam et al. 2013).

En cuanto a los ansiolíticos administrados en el presente estudio, no se ha encontrado todavía efecto frente a los niveles de actividad PON1. Se observó en un estudio, que el diazepam no demostraba ejercer cambios en los niveles PON1 séricos (Avcikurt et al. 2015).

Entre los estabilizadores del ánimo empleados para el trastorno bipolar y la manía, el ácido valproico (VPA) era el administrado mayoritariamente en el presente estudio a un 48% de individuos, aunque se administra también como anticonvulsionante para tratar la epilepsia, (McNamara 2012). Se ha demostrado en diversos estudios que provoca una disminución de la actividad arilesterasa PON1, que puede deberse a diversas causas como el daño en la función hepática, la producción de radicales libres, o por acción directa en las propias enzimas (Karikas et al. 2009, Beydemir and Demir 2017).

Por lo tanto, en un futuro, se hace necesario estudiar en la cohorte la potencial asociación entre el tratamiento psicofarmacológico y las actividades PON1, puesto que podría mostrar relación con el agravamiento de la morbilidad en el ámbito psiquiátrico.

#### **5.2.4. El tratamiento psiquiátrico y la alteración endocrina**

Así como los psicofármacos afectan a los niveles de PON1, también ejercen su papel de alteración metabólica y el consecuente aumento del riesgo de enfermedad coronaria.

Los fármacos antipsicóticos o neurolépticos como la clozapina, olanzapina, quetiapina y risperidona son responsables de una importante ganancia de peso. (Abosi et al. 2018). Se ha demostrado que la clozapina y la olanzapina aumentan los niveles de leptina, triglicéridos e insulina (Ozenoglu et al. 2008, (Nicol et al. 2018).

Se ha detectado en pacientes tratados con antipsicóticos frente a grupos control, niveles significativamente más altos de glucosa, insulina, índice de resistencia a la insulina, leptina, triglicéridos, HOMA-IR, colesterol total y LDL, a pesar de tener ambos grupos el mismo rango de masa corporal (Ozenoglu et al. 2008).

Los antidepresivos mirtazapina, tricíclicos, e inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS) se asocian a un aumento de peso, mientras que la fluoxetina y el bupropion se han relacionado con la pérdida de peso (Abosi et al. 2018; Ijaz et al. 2018). Existen pruebas de que los antidepresivos, concretamente los tricíclicos e inhibidores de serotonina y norepinefrina (SNRI), aceleran el ritmo cardíaco vagal, lo cual provoca un

aumento de la presión arterial y la hipertensión entre los pacientes que toman estos medicamentos (Penninx and Lange 2018).

El estabilizador de ánimo VPA posee un efecto dosis dependiente en la expresión génica de la adiponectina (esencial en la regulación de la sensibilidad a la insulina y la homeostasis de glucosa), con lo que favorece una resistencia a la insulina asociada al sobrepeso. (Abosi et al. 2018).

#### 5.2.5. Asociaciones entre condiciones médicas y actividad PON1

La actividad PON1 se considera un marcador de susceptibilidad frente a alteraciones diversas, ya que es un factor de protección antioxidante y antiaterogénico con polimorfismos genéticos asociados a diferentes niveles de actividad (Costa 2011). Por ejemplo, se ha informado de la relevancia clínica de PON1 como marcador de proteína sérica para el diagnóstico de la invasión vascular y microvascular en pacientes con carcinoma hepatocelular (Ding et al. 2020, Huang et al. 2013).

Además, estudios en ratones han demostrado que la ausencia de actividad sérica PON1 está asociada a una susceptibilidad mayor de oxidación de las LDL favoreciendo así la formación de placas ateroscleróticas (She et al. 2012). Por lo tanto, PON1 ha demostrado ser activa en placas ateroscleróticas ayudando a inhibir la aterosclerosis (Zhao et al. 2012).

García-Heredia et al. (2013) cultivaron células endoteliales humanas con LDLox y ensayaron con moléculas de HDL sin PON1 y HDL con PON1. Ésta última resultó ser mucho más eficaz en la reversión de las alteraciones metabólicas y la apoptosis provocadas por la oxidación de LDL. (Mackness and Mackness 2015).

Bajos niveles de PON1 en sangre se han asociado por tanto, a enfermedades con carácter inflamatorio como Diabetes Mellitus II, sobrepeso u obesidad, artritis reumatoide, lupus sistémica, enfermedades hepáticas y renales, entre otras (Goswami et al. 2009). Estas afecciones tienen la función del HDL alterada, y junto con la PON1 sérica disminuida, se favorece la oxidación y la aterosclerosis. En un metanálisis sobre la relación entre la actividad PON1 y la susceptibilidad a enfermedad cardiovascular con 9853 pacientes y 11408 controles, se mostró un 19% menos actividad PON1 en los pacientes respecto a los controles (Mackness and Mackness 2015).

En afecciones como la obesidad, la oxidación de LDL está incrementada debido en gran parte a un daño en la función antioxidante de HDL, con una actividad antioxidante PON1 disminuida. Se ha informado que algunas enfermedades relacionadas con el daño oxidativo y la peroxidación lipídica son mayores en personas con bajos niveles de actividad PON1, contribuyendo al riesgo aumentado de enfermedades cardiovasculares (Ozenoglu et al. 2008); (Ferretti et al. 2005).

Además de todo lo mencionado, es necesario controlar el genotipo en las asociaciones estadísticas con las condiciones de salud. Del genotipo depende el efecto antioxidante que se va a producir por parte de PON1 ligada a las HDL frente a la oxidación de LDL. Se ha probado que la actividad antioxidante es mayor con la isoforma PON<sub>Q192</sub> (Q) siendo así

mismo mayor en homocigóticos  $PON1_{Q/Q192}$  (QQ) que en heterocigóticos  $PON1_{Q/R192}$  (QR) y en homocigóticos  $PON1_{R/R192}$  (RR) (She et al. 2012).

Se observó in vitro que la capacidad de hidrólisis de lípidos oxidados LDL era mayor en la isoforma Q con un 33%, mientras que en R esta capacidad se reducía a un 20% (Aviram et al. 2000). En la misma línea, se ha informado que la isoforma  $PON1_{Q192}$  hidroliza la  $\delta$ -valerolactona procedente de la hidrólisis de lípidos oxidados con mayor eficacia que  $PON1_{R192}$ . (Costa et al. 2011). Todo ello sugiere que la isoforma Q puede ser más eficaz en la actividad lactonasa.

#### 5.2.6. Prevención y hábitos de vida saludables.

Es difícil conocer con exactitud los mecanismos desencadenantes de las enfermedades, dado que los pacientes que reciben el tratamiento psicofarmacológico están expuestos a la interacción entre compuestos químicos y múltiples parámetros asociados al estilo de vida. Es interesante conocer si  $PON1$  constituye un papel clave con el desarrollo de las enfermedades.

Por otro lado, en cuanto a los parámetros asociados al estilo de vida, es esencial como prevención mantener hábitos que expongan al organismo al mínimo daño oxidativo e inmunitario posible, realizando actividad física de forma regular, llevando una alimentación alta en antioxidantes y baja en grasas saturadas y trans, colesterol, sodio y azúcar, evitando el abuso del tabaco y el alcohol (Camps et al. 2009, Moya and Máñez 2018).

En cuanto a la dieta, se ha visto que una alimentación rica en antioxidantes como la vitamina C y E, quercetina, resveratrol y polifenoles de la granada aumenta la actividad sérica  $PON1$  (Costa et al. 2011, Gong et al. 2009, Fuhrman, Volkova and Aviram 2010). La ingesta alta de ácidos grasos poliinsaturados  $\omega$ -3 mejora induce la producción de HDL en personas con hiperlipidemia (Calabresi et al. 2004). Además, una dieta pobre en ácidos grasos insaturados y alta en saturados y trans, constituye un factor de riesgo determinante en la enfermedad cardiovascular.

El consumo moderado de alcohol se ha asociado con un riesgo más bajo de aterosclerosis, al incrementar el colesterol HDL y también de  $PON1$  sérica (Camps et al. 2009). No obstante, se ha visto la administración de una dieta con 36% de alcohol provoca una reducción del nivel de ARNm de  $PON1$  en el hígado aproximadamente un 25% y la actividad de  $PON1$  en sangre (28-58%) (Varatharajalu et al. 2010).

Se sabe que el ejercicio aeróbico realizado de una manera regular disminuye el estrés oxidativo y mejora la sensibilidad a la insulina en personas con sobrepeso (Rector et al. 2007).

Los pacientes con trastornos psiquiátricos requieren un tratamiento multidisciplinar, que incluya dietoterapia especializada en psiquiatría para prevenir el desarrollo de trastornos hormonales y metabólicos, y para apoyar en el éxito del tratamiento (Ferretti et al. 2005).

## 6. CONCLUSIONES

En el presente Trabajo de Fin de Máster, en el que se estudia a los pacientes del Complejo Socio Asistencial del Doctor Esquerdo, se ha llegado a las siguientes conclusiones:

1. El método utilizado para el análisis de la actividad PON1 sérica permitió cuantificar la actividad e inferir los genotipos QQ, QR y RR de 29 pacientes con un nivel de precisión aceptable. Los niveles de actividad y las frecuencias del genotipo inferido correspondieron con las características de una población caucásica.
2. Los tratamientos más frecuentes fueron los antipsicóticos clozapina y haloperidol, el estabilizador del ánimo VPA, los antidepresivos sertralina y fluoxetina, y los ansiolíticos clonazepam y diazepam. Tales tratamientos alterarían los niveles de actividad PON1 y el sistema endocrino, conforme a la literatura consultada.
3. La cohorte presenta elementos del síndrome metabólico y un tratamiento psicofarmacológico, variables que están relacionadas con el riesgo de enfermedad cardiovascular.

## 7. PROYECCION FUTURA

Es necesario dar prioridad a investigaciones de prevención, tratamiento y seguimiento para reducir el síndrome metabólico en el paciente psiquiátrico vulnerable.

Dada la importancia de la actividad PON1, podría considerarse como indicador temprano que alertaría de los efectos adversos del tratamiento psicofarmacológico. Se podría incorporar a los análisis séricos de control semestrales de los pacientes, un análisis de paraoxonasa para correlacionarlo con el desarrollo de la enfermedad metabólica en el cuadro clínico.

Para comprobar esta hipótesis sería interesante realizar un análisis multivariante estudiando la asociación entre las actividades PON1 con el tratamiento farmacológico, el genotipo, los hábitos de vida y las condiciones médicas. Es necesario por tanto, el registro de muchos parámetros en mayor número de casos y la determinación de la actividad PON1 en más pacientes, con el fin de conocer si las condiciones médicas observadas incorporan la PON1 en su cuadro patológico.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Salam, O. M., E. R. Youness, Y. A. Khadrawy & A. A. Sleem (2013) Brain and liver oxidative stress after sertraline and haloperidol treatment in mice. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, 24, 115-23.
- Abosi, O., S. Lopes, S. Schmitz & J. G. Fiedorowicz (2018) Cardiometabolic effects of psychotropic medications. *Horm Mol Biol Clin Investig*, 36.
- Avcikurt, A. S., S. Sinan & F. Kockar (2015) Antidepressant and antipsychotic drugs differentially affect PON1 enzyme activity. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 30, 245-9.
- Aviram, M., E. Hardak, J. Vaya, S. Mahmood, S. Milo, A. Hoffman, S. Billicke, D. Draganov & M. Rosenblat (2000) Human serum paraoxonases (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions: PON1 esterase and peroxidase-like activities. *Circulation*, 101, 2510-7.
- Beydemir, Ş. & Y. Demir (2017) Antiepileptic drugs: Impacts on human serum paraoxonase-1. *J Biochem Mol Toxicol*, 31.
- Calabresi, L., B. Villa, M. Canavesi, C. R. Sirtori, R. W. James, F. Bernini & G. Franceschini (2004) An omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrate increases plasma high-density lipoprotein 2 cholesterol and paraoxonase levels in patients with familial combined hyperlipidemia. *Metabolism*, 53, 153-8.
- Camps, J., J. Marsillach & J. Joven (2009) Pharmacological and lifestyle factors modulating serum paraoxonase-1 activity. *Mini Rev Med Chem*, 9, 911-20.
- Costa, L. G., G. Giordano & C. E. Furlong (2011) Pharmacological and dietary modulators of paraoxonase 1 (PON1) activity and expression: the hunt goes on. *Biochem Pharmacol*, 81, 337-44.
- Cussotto, S., G. Clarke, T. G. Dinan & J. F. Cryan (2019) Psychotropics and the Microbiome: a Chamber of Secrets... *Psychopharmacology (Berl)*, 236, 1411-1432.
- Demir, Y., N. Balcı & M. Gürbüz (2019) Differential effects of selective serotonin reuptake inhibitors on paraoxonase-1 enzyme activity: An in vitro study. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 226, 108608.
- Ding, G. Y., X. D. Zhu, Y. Ji, G. M. Shi, Y. H. Shen, J. Zhou, J. Fan, H. C. Sun & C. Huang (2020) Serum PON1 as a biomarker for the estimation of microvascular invasion in hepatocellular carcinoma. *Ann Transl Med*, 8, 204.
- Donnell, J. O. 2012. Neurofarmacología. In *Las bases farmacológicas de la terapéutica*, ed. MCGRAW-HILL, 2035. ES: Goodman & Gilman.
- Eliana C. Portilla, Wilson Muñoz y Carlos H. Sierra; *Rev Colomb Cardiol*. 2014; 21(5):318---326.
- Ferretti, G., T. Bacchetti, C. Moroni, S. Savino, A. Liuzzi, F. Balzola & V. Bicchiega (2005) Paraoxonase activity in high-density lipoproteins: a comparison between healthy and obese females. *J Clin Endocrinol Metab*, 90, 1728-33.
- Fuhrman, B., N. Volkova & M. Aviram (2010) Pomegranate juice polyphenols increase recombinant paraoxonase-1 binding to high-density lipoprotein: studies in vitro and in diabetic patients. *Nutrition*, 26, 359-66.
- Furlong, C. E., J. Marsillach, G. P. Jarvik & L. G. Costa (2016) Paraoxonases-1, -2 and -3: What are their functions? *Chem Biol Interact*, 259, 51-62.
- García-Heredia, A., J. Marsillach, A. Rull, I. Triguero, I. Fort, B. Mackness, M. Mackness, D. M. Shih, J. Joven & J. Camps (2013) Paraoxonase-1 inhibits oxidized low-density

- lipoprotein-induced metabolic alterations and apoptosis in endothelial cells: a nondirected metabolomic study. *Mediators Inflamm*, 2013, 156053.
- Gong, M., M. Garige, R. Varatharajalu, P. Marmillot, C. Gottipatti, L. C. Leckey & R. M. Lakshman (2009) Quercetin up-regulates paraoxonase 1 gene expression with concomitant protection against LDL oxidation. *Biochem Biophys Res Commun*, 379, 1001-4.
- Goswami, B., D. Tayal, N. Gupta & V. Mallika (2009) Paraoxonase: a multifaceted biomolecule. *Clin Chim Acta*, 410, 1-12.
- Harel, M., A. Aharoni, L. Gaidukov, B. Brumshtein, O. Khersonsky, R. Meged, H. Dvir, R. B. Ravelli, A. McCarthy, L. Toker, I. Silman, J. L. Sussman & D. S. Tawfik (2004) Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nat Struct Mol Biol*, 11, 412-9.
- Herrington, W., B. Lacey, P. Sherliker, J. Armitage & S. Lewington (2016) Epidemiology of Atherosclerosis and the Potential to Reduce the Global Burden of Atherothrombotic Disease. *Circ Res*, 118, 535-46.
- Huang, C., Y. Wang, S. Liu, G. Ding, W. Liu, J. Zhou, M. Kuang, Y. Ji, T. Kondo & J. Fan (2013) Quantitative proteomic analysis identified paraoxonase 1 as a novel serum biomarker for microvascular invasion in hepatocellular carcinoma. *J Proteome Res*, 12, 1838-46.
- Ijaz, S., B. Bolea, S. Davies, J. Savović, A. Richards, S. Sullivan & P. Moran (2018) Antipsychotic polypharmacy and metabolic syndrome in schizophrenia: a review of systematic reviews. *BMC Psychiatry*, 18, 275.
- Karikas, G. A., K. H. Schulpis, A. Bartzeliotou, S. Regoutas, C. Thanopoulou, V. Papaevangelou, A. Giannoulia-Karantana, I. Papassotiriou & A. Fytou-Pallikari (2009) Early effects of sodium valproate monotherapy on serum paraoxonase/arylesterase activities. *Scand J Clin Lab Invest*, 69, 31-5.
- M. Meyer, J. 2012. Neurofarmacología. In *Las bases farmacológicas de la terapéutica*, ed. MCGRAW-HILL, 2035. ES: Goodman & Gilman.
- Mackness, M. & B. Mackness (2015) Human paraoxonase-1 (PON1): Gene structure and expression, promiscuous activities and multiple physiological roles. *Gene*, 567, 12-21.
- Marchio, P., S. Guerra-Ojeda, J. M. Vila, M. Aldasoro, V. M. Victor & M. D. Mauricio (2019) Targeting Early Atherosclerosis: A Focus on Oxidative Stress and Inflammation. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 8563845.
- McDaniel, C. Y., M. B. Dail, R. W. Wills, H. W. Chambers & J. E. Chambers (2014) Paraoxonase 1 polymorphisms within a Mississippi USA population as possible biomarkers of enzyme activities associated with disease susceptibility. *Biochem Genet*, 52, 509-23.
- McNamara, J. O. 2012. Neurofarmacología. In *Las bases farmacológicas de la terapéutica*, ed. MCGRAW-HILL, 2035. ES: Goodman & Gilman.
- Moreira, E. G., K. M. Boll, D. G. Correia, J. F. Soares, C. Rigobello & M. Maes (2019) Why Should Psychiatrists and Neuroscientists Worry about Paraoxonase 1? *Curr Neuropharmacol*, 17, 1004-1020.
- Moya, C. & S. Máñez (2018) Paraoxonases: metabolic role and pharmacological projection. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 391, 349-359.
- Nicol, G. E., M. D. Yingling, K. S. Flavin, J. A. Schweiger, B. W. Patterson, K. B. Schechtman & J. W. Newcomer (2018) Metabolic Effects of Antipsychotics on Adiposity and Insulin Sensitivity in Youths: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Psychiatry*, 75, 788-796.
- Ozenoglu, A., H. Balci, S. Ugurlu, E. Caglar, H. Uzun, C. Sarkis, C. Gunay & E. E. E (2008) The relationships of leptin, adiponectin levels and paraoxonase activity with metabolic and cardiovascular risk factors in females treated with psychiatric drugs. *Clinics (Sao Paulo)*, 63, 651-60.

- Pavál, D., B. Nemeş, R. L. Rusu & E. Dronca (2018) Genotype-phenotype Analysis of Paraoxonase 1 in Schizophrenic Patients Treated with Atypical Antipsychotics. *Clin Psychopharmacol Neurosci*, 16, 32-38.
- Penninx, B. W. J. H. & S. M. M. Lange (2018) Metabolic syndrome in psychiatric patients: overview, mechanisms, and implications. *Dialogues Clin Neurosci*, 20, 63-73.
- Podrez, E. A. (2010) Anti-oxidant properties of high-density lipoprotein and atherosclerosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 37, 719-25.
- Rector, R. S., S. O. Warner, Y. Liu, P. S. Hinton, G. Y. Sun, R. H. Cox, C. S. Stump, M. H. Laughlin, K. C. Dellsperger & T. R. Thomas (2007) Exercise and diet induced weight loss improves measures of oxidative stress and insulin sensitivity in adults with characteristics of the metabolic syndrome. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 293, E500-6.
- Richter, R. J., G. P. Jarvik & C. E. Furlong (2008) Determination of paraoxonase 1 status without the use of toxic organophosphate substrates. *Circ Cardiovasc Genet*, 1, 147-52.
- Rojó, L. E., P. A. Gaspar, H. Silva, L. Risco, P. Arena, K. Cubillos-Robles & B. Jara (2015) Metabolic syndrome and obesity among users of second generation antipsychotics: A global challenge for modern psychopharmacology. *Pharmacol Res*, 101, 74-85.
- She, Z. G., H. Z. Chen, Y. Yan, H. Li & D. P. Liu (2012) The human paraoxonase gene cluster as a target in the treatment of atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal*, 16, 597-632.
- Shunmoogam, N., P. Naidoo & R. Chilton (2018) Paraoxonase (PON)-1: a brief overview on genetics, structure, polymorphisms and clinical relevance. *Vasc Health Risk Manag*, 14, 137-143.
- Siafis, S., D. Tzachanis, M. Samara & G. Papazisis (2018) Antipsychotic Drugs: From Receptor-binding Profiles to Metabolic Side Effects. *Curr Neuropharmacol*, 16, 1210-1223.
- Tomás, M., G. Latorre, M. Sentí & J. Marrugat (2004) [The antioxidant function of high density lipoproteins: a new paradigm in atherosclerosis]. *Rev Esp Cardiol*, 57, 557-69.
- Unsal, C., Y. Albayrak, N. Albayrak, M. Kuloglu & K. Hashimoto (2013) Reduced serum paraoxonase 1 (PON1) activity in patients with schizophrenia treated with olanzapine but not quetiapine. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 9, 1545-52.
- Varatharajalu, R., M. Garige, L. C. Leckey, M. Gong & M. R. Lakshman (2010) Betaine protects chronic alcohol and omega-3 PUFA-mediated down-regulations of PON1 gene, serum PON1 and homocysteine thiolactonase activities with restoration of liver GSH. *Alcohol Clin Exp Res*, 34, 424-31.
- Woudberg, N. J., S. Pedretti, S. Lecour, R. Schulz, N. Vuilleumier, R. W. James & M. A. Frias (2017) Pharmacological Intervention to Modulate HDL: What Do We Target? *Front Pharmacol*, 8, 989.
- Zhao, Y., Y. Ma, Y. Fang, L. Liu, S. Wu, D. Fu & X. Wang (2012) Association between PON1 activity and coronary heart disease risk: a meta-analysis based on 43 studies. *Mol Genet Metab*, 105, 141-8.