

# Sobre los genes paraoxonasa-1 y *SR-B1*, y su importancia en la aterosclerosis

Francisco Rodríguez Esparragón<sup>a</sup>, Yaidé Hernández Trujillo<sup>a</sup>, Antonio Macías Reyes<sup>a</sup>, Enrique Hernández Ortega<sup>b</sup>, Alfonso Medina<sup>b</sup> y José C. Rodríguez Pérez<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup>Unidad de Investigación. Hospital Universitario de Gran Canaria Doctor Negrín. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC). Las Palmas de Gran Canaria. España.

<sup>b</sup>Servicios de Cardiología. Hospital Universitario de Gran Canaria Doctor Negrín. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC). Las Palmas de Gran Canaria. España.

<sup>c</sup>Nefrología. Hospital Universitario de Gran Canaria Doctor Negrín. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC). Las Palmas de Gran Canaria. España.

La lipoproteína de alta densidad (HDL) constituye un factor de protección independiente de enfermedad cardiovascular. La enzima paraoxonasa-1 (PON-1) contribuye a las propiedades antiaterogénicas asociadas al HDL. Estudios *in vitro* muestran que posee una gran heterogeneidad de sustratos, algunos de los cuales participan en la progresión de las lesiones ateroscleróticas. Se han desarrollado modelos animales que muestran su papel ateroprotector. En humanos, las variantes PON-1 Gln192Arg y Met55Leu parecen asociarse con una mayor susceptibilidad cardiovascular, con diferentes actividades y concentración de la proteína PON-1. El gen *CLA-1* (*CD36 and Lysosomal integral membrane protein-II Analogous-1*) es el homólogo humano del gen *SR-B1* (*Scavenger Receptor class B type 1*) y constituye el primer receptor de alta afinidad de HDL bien caracterizado. El receptor *CLA-1* participa en el transporte reverso de colesterol a través de la entrada selectiva de ésteres de colesterol nativos y oxidados, y su papel ateroprotector se ha deducido de los estudios en animales genéticamente manipulados. En humanos, el gen *CLA-1* es polimórfico y algunas de sus variantes han sido previamente asociadas con cambios fenotípicos en lipoproteínas plasmáticas. Ambos genes participan en el complejo metabolismo del HDL y, presumiblemente, en los mecanismos de defensa frente a estrés oxidativo.

**Palabras clave:** *Paraoxonasa. SR-B1. Ésteres de colesterol. Estrés oxidativo. Homocisteína.*

## Concerning the Significance of Paraoxonase-1 and *SR-B1* Genes in Atherosclerosis

High-density lipoprotein (HDL) is an independent protective factor against cardiovascular disease. The enzyme paraoxonase-1 (PON-1) contributes to the anti-atherogenic effects of HDL. *In vitro* studies have demonstrated that paraoxonase's substrates are highly heterogeneous and that some contribute to the development of atherosclerotic lesions. The atheroprotective role of PON-1 was established in genetically engineered animal models. In humans, the PON-1 Gln192Arg and Met55Leu polymorphisms appear to be associated with increased susceptibility to cardiovascular disease and with different PON-1 activity levels and concentrations. The *CLA-1* (*CD36 and Lysosomal integral membrane protein-II Analogous-1*) gene is the human homologue of the murine *SR-B1* (*Scavenger Receptor class B type 1*) gene. *SR-B1* was the first high-affinity HDL receptor to be identified at the molecular level. The *CLA-1* receptor plays a pivotal role in HDL-mediated reverse cholesterol transport by mediating the selective uptake of free cholesterol as well as of native and oxidized cholesteryl esters. Its atheroprotective role has also been established in transgenic mice studies. Several polymorphic variants of the *CLA-1* gene have been described, some of which are associated with phenotypic changes in plasma lipoproteins. Both genes participate in the complex HDL metabolic pathway and, presumably, also in defense mechanisms against oxidative stress.

**Key words:** *Paraoxonase. SR-B1. Cholesteryl esters. Oxidative stress. Homocysteine.*

Full English text available from: [www.revespcardiol.org](http://www.revespcardiol.org)

Este trabajo se ha realizado en el seno de un Proyecto de Investigación del Instituto de Salud Carlos III (FIS 01/0190) y FUNCIS 6/2002 (con ampliación).

Correspondencia: Prof. J.C. Rodríguez Pérez.  
Unidad de Investigación-Nefrología. Hospital Universitario de Gran Canaria Doctor Negrín.  
Barranco de la Ballena, s/n. 35010 Las Palmas de Gran Canaria. España.  
Correo electrónico: jrodperd@gobiernodecanarias.org

## INTRODUCCIÓN

El proceso de generación aumentado de radicales libres y especies reactivas de oxígeno, en ocasiones unido a una disminución de los mecanismos de defensa antioxidantes, constituye la base de la hipótesis oxidativa de la aterosclerosis<sup>1</sup>. La modificación oxidativa de

las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y la generación de productos derivados permite su acumulación dentro de la pared arterial y acelera el proceso aterosclerótico<sup>1,2</sup>. Inicialmente, cualquier sistema enzimático en el que se generen radicales libres podría estar involucrado en la oxidación de las partículas LDL, incluidos el sistema NADPH oxidasa, la mieloperoxidasa, el P450, la cadena transportadora de electrones mitocondrial, la xantina oxidasa y la lipoxigenasa. En cuanto a esta última, su importancia inicialmente documentada en estudios *in vitro*<sup>3-5</sup> se ha visto refrendada por diversos estudios *in vivo*<sup>6-10</sup> y por la demostración en ratones doble *knockout* para apolipoproteína E y 12/15 lipoxigenasa (*apoE<sup>-/-</sup>/L-12LO<sup>-/-</sup>*) de una disminución relevante de las lesiones ateroscleróticas<sup>11,12</sup>. Pese a todo, también se han evidenciado resultados contradictorios<sup>13</sup>.

### Mecanismo de *seeding*

La acción de la 15 y 12 lipoxigenasas sobre el ácido araquidónico y linoleico genera, principalmente, los ácidos hidroperoxioctadecadienoico (HPODE) e hidroperoxieicosatetraenoico (HPETE). Numerosas aportaciones experimentales justifican que, al menos parcialmente, el mecanismo de formación de las LDL mínimamente oxidadas se debe a la oxidación de fosfolípidos derivados del ácido araquidónico y a la incorporación de los propios productos derivados del metabolismo de lipoxigenasas, especialmente HPODE y HPETE, sobre distintos lípidos de las LDL<sup>14</sup>. Sin embargo, para que se produzca una oxidación efectiva, las LDL han de ser adicionalmente «sembradas» con especies reactivas de oxígeno<sup>14,15</sup>. Las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y su principal componente estructural, la apolipoproteína AI, evitan la oxidación de las LDL<sup>1</sup>. Hay distintos mecanismos moleculares involucrados que acontecen tras una transferencia de ésteres de colesterol peroxidados (CEOOH) desde las LDL a las HDL, en un proceso parcialmente determinado por la actividad enzimática de la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP)<sup>16</sup>. Pese a lo dicho, el papel de la CETP es potencialmente aterogénico y el uso protector de los inhibidores de la CETP (JTT-705 y torcetrapib) se muestra en diferentes ensayos clínicos<sup>17,18</sup>. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el mecanismo de transferencia de ésteres de colesterol (CE) desde las HDL a lipoproteínas cuyo contenido proteínico es la apolipoproteína-B (proceso que se produce en intercambio por triglicéridos) es bidireccional y depende de la concentración de lipoproteínas ricas en triglicéridos<sup>16,19</sup>. Como es conocido, más que las concentraciones elevadas de HDL es su renovación lo que probablemente tiene mayor relevancia en la protección vascular. En particular, la acción de la CETP en las HDL facilita la actividad de esterificación de la LCAT (lecitín-colesterol aciltransferasa) y, por tanto, el eflujo de coleste-

rol. A su vez, la acción combinada de CETP y de la lipasa hepática sobre HDL maduras (HDL<sub>2</sub>) genera fracciones de HDL pobres en lípidos que son mejores aceptores de colesterol<sup>17,20</sup>.

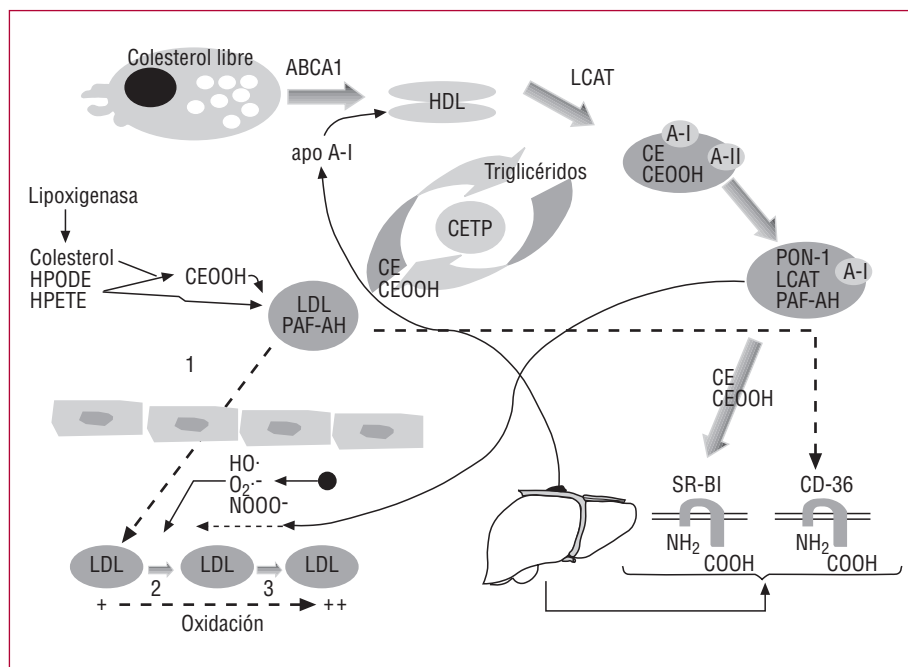
El mecanismo de formación de LDL mínimamente oxidadas consta al menos de tres pasos<sup>14,15</sup>. El primero consistiría en el mencionado sembrado de las LDL con productos del metabolismo del ácido araquidónico y con CEOOH<sup>14</sup>. El segundo, en el trasvase de las LDL al espacio subendotelial, donde se produciría una acumulación adicional de especies reactivas del oxígeno. Y el tercero, conlleva la oxidación de fosfolípidos de las LDL cuando se alcanza un nivel umbral de especies reactivas del oxígeno<sup>15</sup>. En el primero de los pasos descritos es donde presumiblemente interviene la actividad enzimática paraoxonasa. En la figura 1 se muestra un esquema general de los mecanismos discutidos en esta revisión.

### Sobre la medición plasmática de fosfolípidos oxidados e hidroperóxidos

La heterogeneidad metodológica al tratar de valorar la peroxidación lipídica en el plasma depende no sólo de la propia técnica utilizada, sino de si la valoración se realiza sobre el contenido en lípidos peroxidados totales o en determinadas subfracciones. Esto ha generado diversas discrepancias sobre el contenido normal de peróxidos en sujetos sanos. Mediante HPLC y detección por quimioluminiscencia, Bowry et al<sup>21</sup> determinaron en plasma y en lipoproteínas aisladas (HDL y LDL) que las HDL portaban el 85% del contenido total de CEOOH y el total de fosfolípidos peroxidados (PLOOH), detectados como hidroperóxidos de fosfatidilcolina. Por el contrario, Nourooz-Zadeh et al<sup>22</sup> analizaron el contenido total en hidroperóxidos lipídicos y comprobaron que radicaban mayoritariamente en las LDL y no en las HDL.

### Sobre las paraoxonasas 1, 2 y 3 (PON-1, PON-2 y PON-3)

La paraoxonasa/arilesterasa humana (PON-1) (EC 3.1.1.2) es una glucoproteína calcio-dependiente que se encuentra unida a las partículas de HDL. Se ha intentado demostrar que la paraoxonasa sérica disminuye el riesgo de enfermedad coronaria por su acción destructora de moléculas proinflamatorias involucradas en la iniciación y la progresión de las lesiones ateroscleróticas<sup>23</sup>. El potencial antiaterogénico de la paraoxonasa vendría dado por su capacidad de hidrolizar lípidos oxidados, fosfolípidos y CEOOH, limitando su acumulación en las LDL. Estudios *in vitro* han mostrado que la actividad paraoxonasa previene la oxidación de las LDL<sup>24</sup> e incluso la oxidación de las propias HDL<sup>25</sup>. PON-1 *in vivo* parece actuar de forma similar<sup>26-28</sup>. PON-1 se caracteriza por hidrolizar, además,



**Fig. 1.** Esquema general del metabolismo de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y su papel protector frente a la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL).

distintos ésteres de ácidos carboxílicos y algunos organofosforados. Pese a que el sustrato fisiológico real de la enzima PON-1 no se conoce bien, ha sido posible determinar su actividad sérica utilizando como sustrato el paraoxón. Mediante la determinación de esta actividad se ha observado que los valores séricos paraoxonasa varían entre individuos y, sin embargo, permanecen relativamente constantes en un individuo dado<sup>23</sup>. Distintas situaciones fisiopatológicas vinculadas a un aumento del estrés oxidativo y factores ambientales producen una disminución de la actividad sérica paraoxonasa<sup>29-34</sup>. Contrariamente, se ha descrito un aumento del estrés oxidativo en ratones *knockout* PON-1 y en los doble *knockout* apo E/PON-1 y, en estos modelos, una respuesta diferente de la expresión en macrófagos de PON-2 y de PON-3<sup>35,36</sup>.

La unión entre la paraoxonasa y la partícula de HDL se constituyó, en parte, como una posible explicación a la relación inversa entre los valores de HDL y la enfermedad coronaria mostrada en distintos estudios poblacionales<sup>23</sup>. La actividad antioxidante justificaría su papel protector, actividad que ha de conservarse incluso en el proceso de transporte reverso de colesterol. Así, la esterificación del exceso de colesterol se realiza en la superficie de las HDL y es mediada por la actividad LCAT, la cual es especialmente sensible a hidroperóxidos lipídicos<sup>37,38</sup>. Es importante tener en cuenta que la actividad enzimática paraoxonasa se restringe a ciertas subfracciones del HDL<sup>39</sup> y que es necesaria la apolipoproteína AI para su estabilidad<sup>40</sup>.

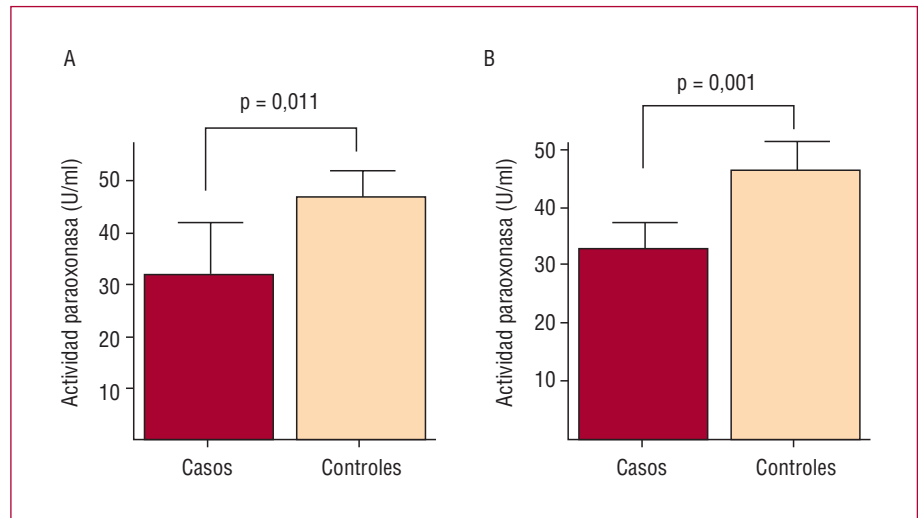
El gen humano *PON-1* se localiza en el brazo largo del cromosoma 7 (7q21-q22)<sup>41</sup> y presenta algunas variantes de interés<sup>42</sup>. El polimorfismo Gln<sup>192</sup>→Arg

(Q/R) determina los alelos PON1 A (Q) y PON1 B (R) asociados con una menor/mayor actividad de la enzima dependiendo del sustrato. El polimorfismo Met<sup>55</sup>→Leu determina la aparición de los alelos L (leucina 55) y M (metionina 55). La variante Met<sup>55</sup>→Leu es la causante de modificaciones en las concentraciones séricas, pero no en la actividad enzimática paraoxonasa<sup>43</sup>.

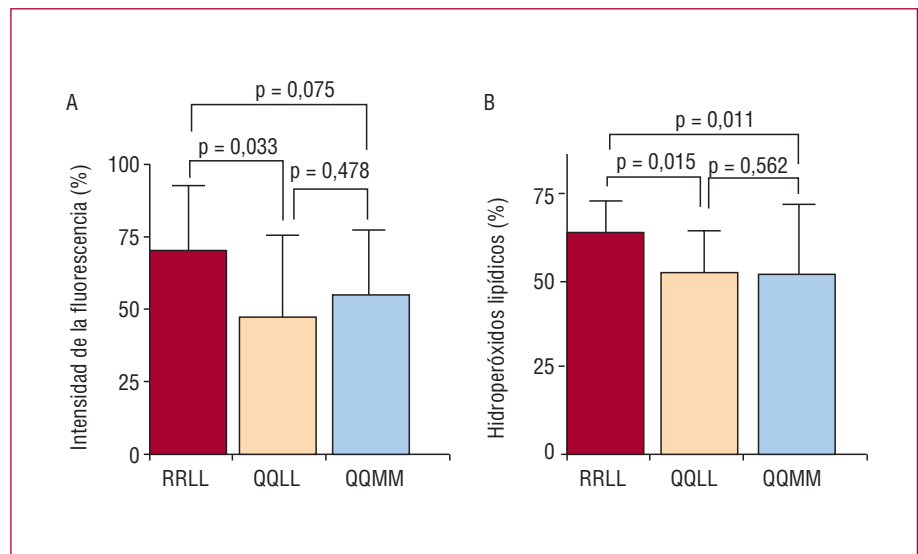
El polimorfismo Gln<sup>192</sup>→Arg del gen *PON-1* ha sido asociado con la enfermedad vascular en diabéticos<sup>44-47</sup> y en no diabéticos por algunos grupos<sup>46</sup>, pero no por otros<sup>48-50</sup>. Se han publicado algunos metaanálisis que muestran una asociación débil de la variante con la enfermedad cardiovascular<sup>34,51,52</sup>. Toda vez que hay otros determinantes no genéticos que afectan a la variabilidad interindividual de la actividad PON-1, algunos autores sugieren la conveniencia de considerar conjuntamente en los estudios de asociación, los genotipos y actividad PON-1<sup>34,53</sup>. Además, el hecho de que la asociación no se muestre en todas las poblaciones estudiadas sugiere que no se trata de una mutación funcional, sino de un marcador de otra mutación en el propio gen *PON-1* o en otro gen cercano<sup>54</sup>. Por otro lado, es posible que haya interacciones en el genotipo y el medio ambiente todavía no bien caracterizadas o prevalentes en poblaciones concretas, que resulten determinantes para estos estudios<sup>55,56</sup>.

El interés del polimorfismo Met<sup>55</sup>→Leu como factor de riesgo genético para la enfermedad cardiovascular fue evaluado por Garin et al<sup>43</sup>, quienes encontraron que la homocigosis Leu55 constituía un factor de riesgo independiente para la enfermedad cardiovascular en diabéticos.

**Fig. 2.** A. Disminución significativa de la actividad paraoxonasa en 68 varones diabéticos frente a 93 no diabéticos ajustados por edad. B. Disminución significativa de la actividad paraoxonasa en 161 varones después de un evento coronario agudo y en 184 controles ajustados por edad<sup>123</sup>. Las barras representan la media y la desviación típica. La comparación se realizó mediante el test de la t de Student.



**Fig. 3.** A. Diferente comportamiento de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) de acuerdo con las isoformas paraoxonasa en prevenir la oxidación del L-1-palmitoil-2-araquidonil-sn-glicerol-3-fosforilcolina más ácido hidroperoxiotetradecadienoico. Las muestras de HDL se aislaron por precipitación y se ajustaron con tampón salino a 20 unidades de arilesterasa<sup>107,108</sup>. Los experimentos se realizaron mediante el ensayo libre de células (J Lipid Res. 2001;42:1308-17). B. Diferente comportamiento de HDL de acuerdo con las isoformas paraoxonasa en prevenir su propia oxidación. La determinación de la peroxidación lipídica se llevó a cabo mediante el método del Xylenol Orange (FOX) (Biochem J. 1996;313:781-6). Todos los experimentos se realizaron en presencia de fenilmetilsulfoniifluoruro (PMSF)<sup>107,108</sup>.



El mecanismo por el cual los polimorfismos en el gen *PON-1* incrementan la susceptibilidad cardiovascular se desconoce. La presencia de los alelos 192R y 55L significa una mayor actividad enzimática hacia el paraoxón y, sin embargo, constituyen variantes de riesgo en determinados grupos poblacionales. Este hecho constituyó, durante cierto tiempo, un importante dilema, puesto que se vinculaba la actividad de hidrólisis frente al paraoxón con la actividad frente al sustrato enzimático real. Para explicar esta paradoja se propusieron algunas teorías. Así, la actividad enzimática paraoxonasa disminuida tras el infarto de miocardio<sup>29</sup>, en la hipercolesterolemia familiar<sup>30</sup>, la diabetes<sup>31</sup> y asociada al fallo renal<sup>32,33</sup> sugería la influencia directa en la modulación de la actividad y la concentración enzimática del estrés oxidativo (fig. 2). Por otro lado, la mayor actividad hidrolítica hacia el paraoxón o hacia otros sustratos exógenos no implicaría, como se ha dicho, una mayor capacidad antioxidante. A esta última

explicación contribuyó su correspondiente confirmación experimental en humanos. Mackness et al<sup>57</sup> comprobaron que la capacidad de protección frente a la oxidación de las LDL conferida por las partículas de HDL resultaba mayor para los homocigóticos QQ/MM que para los homocigóticos RR/LL (fig. 3). Cao et al<sup>58</sup> observaron que las diferencias con respecto a la hidrólisis del paraoxón en función de la variante Gln<sup>192</sup>→Arg no afectaban a la capacidad protectora de la proteína PON-1 frente a la oxidación de las LDL. Aviram et al<sup>25</sup> observaron que, tras inactivar la actividad PON-1 arilesterasa (calcio-dependiente) no se eliminaba la capacidad enzimática de inhibir la oxidación de las LDL; por el contrario, el calor abolía dicha capacidad de inhibición. Estos autores sugirieron sitios activos diferentes de PON-1, uno causante de la actividad paraoxonasa calcio-dependiente y otro, calcio-independiente, donde reside la capacidad de protección frente a la oxidación de las LDL<sup>58</sup>.

Tras la caracterización inicial del gen *PON-1* se identificaron nuevos genes (*PON-like*) designados *PON-2* y *PON-3*, respectivamente, localizados también en 7q21.3<sup>59,60</sup>. Al contrario que *PON-1*, que se expresa mayoritariamente en el hígado, *PON-2* se expresa en distintos tejidos.

Mochizuki et al<sup>59</sup> identificaron varias formas del ARNm del gen *PON-2* producidas por *splicing* alternativo o constituidos por un segundo sitio de inicio de la transcripción. Asimismo, estos autores caracterizaron dos polimorfismos en la secuencia codificadora del gen: Arg<sup>148</sup>→Gly y Cys<sup>311</sup>→Ser.

En indios asiáticos, Sanghera et al<sup>61</sup> observaron, al estudiar las variantes polimórficas *PON-1* (Gln<sup>192</sup>→Arg) y *PON-2* (Cys<sup>311</sup>→Ser), que ambas contribuían sinérgicamente al riesgo cardiovascular.

Como se ha comentado con anterioridad, la familia génica paraoxonasa está constituida por 3 miembros: *PON-1*, *PON-2* y *PON-3*. El papel fisiológico de los productos génicos correspondientes constituye un campo de creciente interés. Hasta el momento se han caracterizado y purificado la paraoxonasa/arilesterasa sérica *PON-1* y la paraoxonasa *PON-3* de suero de conejo<sup>62</sup>. Al contrario que *PON-1*, *PON-3* presenta una actividad arilesterasa limitada y ausencia completa de actividad paraoxonasa; sin embargo, hidroliza rápidamente lactonas y su actividad protectora frente a la oxidación inducida por Cu<sup>2+</sup> de las partículas LDL es superior a la descrita para la proteína *PON-1*.

### ¿Qué enzima es la principal causante de la actividad antioxidante de las HDL?

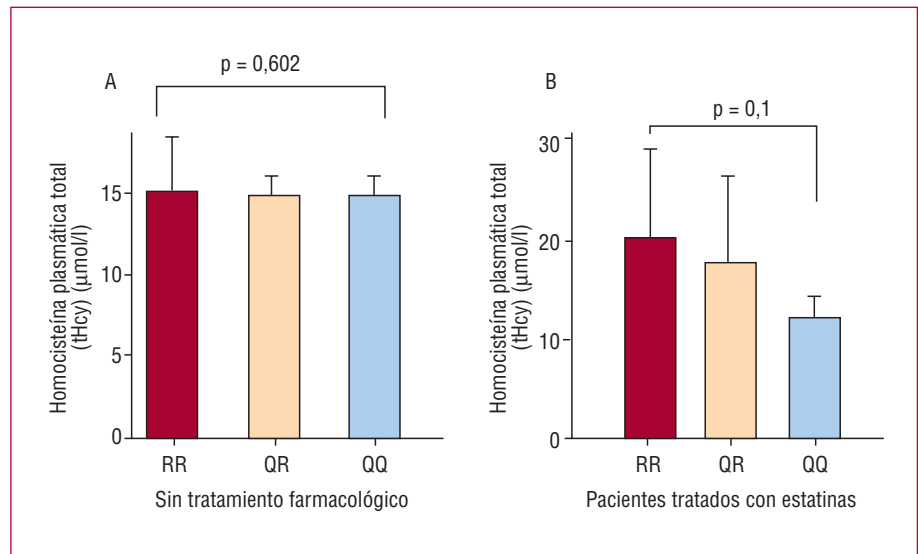
Las propiedades antioxidantes de las HDL no son exclusividad propia de la enzima paraoxonasa. La más importante es la acetilhidrolasa del factor activador de plaquetas (PAF-AH). La actividad enzimática PAF-AH plasmática inactiva el factor activador de plaquetas (PAF) y, por tanto, regula su función y sus efectos fisiopatológicos<sup>63</sup>. Aproximadamente el 70% de la actividad plasmática PAF-AH se asocia a las LDL y el resto a las HDL, sugiriéndose que hay un intercambio activo entre ambas fracciones<sup>64</sup>. PAF-AH hidroliza lípidos peroxidados y actúa a modo de fosfolipasa A<sub>2</sub>, pero no C o D, y su papel antiaterogénico es controvertido<sup>65-68</sup>. Marathe et al<sup>69</sup> publicaron un excelente trabajo que sugiere que PAF-AH es la causante de toda la actividad hidrolasa de fosfolípidos oxidados y no la actividad enzimática paraoxonasa. Como se ha comentado, *PON-1* es una enzima calcio-dependiente, mientras que la actividad PAF-AH no lo es. PAF-AH es una fosfolipasa A<sub>2</sub> que pertenece a la familia de las serinaesterasas y, por tanto, puede inhibirse su actividad con inhibidores específicos que bloquean la actividad PAF-AH, pero no la actividad *PON*. Esta última carece de residuos serina en su sitio activo. Usando esta estrategia en fracciones purificadas *PON-1* se muestra que es

PAF-AH la única fosfolipasa A<sub>2</sub> de las HDL y que *PON-1* carece de actividad fosfolipasa sobre PAF o sobre fosfolípidos oxidados. Pese a todo lo anterior, hay evidencias directas de que *PON-1* al menos debe estar presente para justificar propiedades antioxidantes y antiaterogénicas<sup>27-70</sup>. Algunos autores muestran actividad de hidrólisis de PAF por la *PON-1* sérica utilizando inhibidores específicos de la actividad PAF-AH<sup>71</sup>. Además, en el modelo de ratón *knockout* para el gen *PON-1*, la actividad PAF-AH permanece similar al salvaje<sup>27-72</sup>. La lipoproteína HDL aislada de ratones *knockout* *PON-1* es proinflamatoria, es decir, en ausencia de *PON-1*, la actividad PAF-AH es incapaz de preservar las propiedades antioxidantes de las HDL<sup>27,72</sup>. En animales transgénicos que expresan *PON-1* humano se comprueba cierto grado de protección frente al desarrollo de aterosclerosis<sup>27,70</sup> como también, por otro lado, lo presentan los modelos murinos que sobreexpresan PAF-AH<sup>67,73,74</sup>. Alternativamente se ha propuesto una actuación coordinada de ambas enzimas *in vivo*, ya que difieren en su afinidad hacia fosfolípidos oxidados en función de la longitud de la cadena del ácido graso esterificado en la posición *sn-2*<sup>25,64,71,75,76</sup>. Estos excelentes trabajos completan los realizados por Aviram et al<sup>77,78</sup> y Rozenberg et al<sup>36,79</sup>, quienes utilizaron isoformas recombinantes Q y R y observaron, *in vitro* y en lesiones ateroscleróticas, que la hidrólisis de lípidos oxidados se producía de forma diferencial, Q (33% de capacidad de reducción de oxidación de las LDL inducida por Cu<sup>2+</sup>) > R (20% de reducción). Los últimos trabajos publicados se han centrado en desarrollar métodos que permitan obtener una proteína paraoxonasa cada vez más pura. En éstos se ha observado que la proteína «sola» parece incapaz de evitar la oxidación de las LDL<sup>80-82</sup>. Otros mecanismos moleculares que median la protección vascular en la interacción HDL-paraoxonasa han sido recientemente comunicados<sup>83,84</sup>.

### Sobre la actividad tiolactona hidrolasa

La homocisteína (Hcy) medida como homocisteína plasmática total (tHcy) es considerada un factor de riesgo independiente y gradual de la enfermedad cardiovascular<sup>85-87</sup>. Los determinantes en las variaciones plasmáticas de tHcy son en su mayor parte conocidos e incluyen tanto factores ambientales como genéticos<sup>88-90</sup>. Las hipótesis moleculares que vinculan las concentraciones elevadas de Hcy con la enfermedad pasan por una toxicidad directa sobre las células endoteliales, la oxidación de la Hcy, el crecimiento de células musculares lisas y la activación de genes de importancia en el desarrollo de la aterosclerosis<sup>91-94</sup>. Los incrementos de Hcy en el plasma se asocian con otros procesos de afección proteínica. El 80-90% de la Hcy plasmática se encuentra unido a proteínas, la mitad aproximada de este porcentaje a través de puentes di-

**Fig. 4.** A: concentración media de homocisteína plasmática total de acuerdo con los genotipos PON-1 Gln192Arg (RR (Arg/Arg); QR (Gln/Arg); QQ (Gln/Gln) en un grupo control de 243 varones sanos y sin tratamiento farmacológico<sup>107,108</sup>. B: concentración media de homocisteína plasmática total (tHcy) de acuerdo con los genotipos PON-1 Gln192Arg en un grupo de 20 pacientes tratados con estatinas<sup>107,108</sup>.



sulfuro y la otra mitad aproximadamente formando enlaces amida más estables<sup>95,96</sup>. En el interior celular, la edición por parte de ciertas aminoacil-t-ARN sintasas de la Hcy conlleva la formación de un tioéster: la homocisteína tiolactona<sup>97</sup>. En estudios *in vitro* se ha demostrado que la formación de esta lactona es directamente proporcional a la concentración de Hcy e inversamente proporcional a la concentración de metionina, y es inhibida por la administración de ácido fólico<sup>97,98</sup>. Si el mayor porcentaje de Hcy se encuentra unido a proteínas y, además, hay un mecanismo de edición de la Hcy, la pregunta siguiente sería: ¿la incorporación de Hcy a proteínas acontece durante la traducción o bien es postraduccional? Las evidencias *in vitro* realizadas en determinados tipos celulares muestran que dicha incorporación es postraduccional<sup>99,100</sup>. Esto es especialmente importante porque, también derivado de estudios *in vitro*, se sugiere que la N-homocisteinilación de proteínas está mediada por la conversión metabólica de la Hcy en su correspondiente lactona en determinadas situaciones fisiológicas. La detoxificación de homocisteína tiolactona constituye, pues, un mecanismo crucial. Distintos estudios muestran que la actividad enzimática de hidrólisis de estas lactonas es una función de la enzima paraoxonasa<sup>99</sup>. La identidad molecular también se ha puesto de manifiesto. ¿Es esta actividad hidrolítica sobre la homocisteína tiolactona el papel fundamental de PON-1?

### La actividad tiolactona hidrolasa y las isoformas paraoxonasa

Jakubowski et al<sup>101</sup> demostraron que la actividad de hidrólisis de homocisteína tiolactona difiere en función de los genotipos *PON-1*. Así, se encontró una alta actividad tiolactonasa en sujetos portadores de los alelos R192 y L55 y una baja actividad en los sujetos porta-

dores de los alelos Q192 y M55. Los autores sugieren una idea cuya veracidad parece confirmarse en algunos estudios, esto es, la baja actividad lactonasa podría constituir un factor de riesgo cardiovascular importante en los sujetos con concentraciones plasmáticas de Hcy elevadas. Billecke et al<sup>102</sup> mostraron que la especificidad de las isoformas Q y R hacia distintas lactonas es variable, y que también lo es hacia distintos ésteres de ácidos carboxílicos. Sin duda, esto justificaría observaciones clínicas previas sobre efectos farmacológicos diferenciales de fármacos hipolipemiantes sobre la actividad paraoxonasa sérica<sup>103-108</sup> (fig. 4).

### Sobre el gen *SR-B1* (CLA1)

En el metabolismo de la partícula HDL se produce un proceso de captación celular selectiva de sus componentes de forma que penetran los CE pero no el componente proteínico<sup>109</sup>. Este proceso de entrada selectiva está mediado, en el ratón, por un receptor *scavenger* de clase B y tipo 1, *scavenger receptor class B type 1*, o *SR-B1*<sup>110,111</sup>. Constituye éste el primer receptor de las HDL bien caracterizado molecularmente<sup>110</sup>.

En 1993, Calvo y Vega<sup>112</sup> identificaron una nueva secuencia relacionada con el receptor CD36 y con la proteína lisosomal integral de membrana II (LIMP II). El nuevo gen fue denominado *CLA-1* por «CD36 y LIMP II análogo 1». Murao et al<sup>113</sup> comprobaron que la secuencia *SR-B1* era idéntica en un 81% a la secuencia *CLA-1*. El gen *CLA-1* presenta dos formas producidas por *splicing* alternativo originando dos mensajeros de los que se ha deducido dos proteínas de 409 y 509 aminoácidos, respectivamente. La forma identificada por Murao et al<sup>113</sup>, similar a *SR-B1*, corresponde a la de 509 aminoácidos.

Acton et al<sup>110</sup> han identificado en una población control sana varios polimorfismos en la secuencia del

gen humano *CLA-1*. Los autores caracterizaron variantes intrónicas (intrones 3 y 5) y exónicas (exones 1, 8 y 11) mediante análisis conformacional de cadena simple y secuenciación. A nuestro juicio, dos resultan especialmente interesantes. El cambio Gly→Ser, que se localiza en el segundo aminoácido codificado en la molécula de ADNc (sustitución G/A en la primera base de la tripleta), ya que se asoció, en varones, con mayores concentraciones plasmáticas de HDL y menores concentraciones de LDL. Por otro lado, la sustitución C→T, localizada en la tercera base del codón 350 de la molécula de ADNc, se asoció con menores concentraciones de LDL en mujeres.

### Sobre *CLA-1* (*SR-B1*) y propiedades antioxidantes de las HDL

Hay varios mecanismos por los cuales las HDL ejercen efectos antiaterogénicos. El primer lugar lo ocupa el transporte reverso de colesterol, mecanismo por el cual las HDL captan el exceso de colesterol procedente de tejidos extrahepáticos, que tras ser esterificado por acción de la LCAT, es transportado selectivamente al hígado, donde se produce la entrada mediada por *CLA-1* de los CE<sup>110-112,114</sup> (fig. 1). La entrada de CE en el hígado está acoplada a la síntesis y la secreción de ácidos biliares<sup>115,116</sup>. La importancia antiaterogénica del receptor *CLA-1* en el metabolismo de las HDL es fundamental, como se ha concluido de la generación de modelos murinos con pérdida de los genes *SR-B1* y *LCAT* y de modelos, también en ratón, con sobreexpresión transitoria de *SR-B1*<sup>114,117-119</sup>.

*CLA-1/SR-B1* media en el flujo bidireccional de colesterol y fosfolípidos sin esterificar entre las HDL y diversos tipos celulares. El papel fisiológico de este mecanismo bidireccional no está suficientemente aclarado<sup>120</sup>.

La importancia antiaterogénica de las HDL también deriva de su actividad antioxidante directa e indirecta, ya que son capaces de captar CEOOH desde las LDL, siendo posteriormente eliminados en el transporte reverso como hidróxidos de ésteres de colesterol (CE-OH)<sup>121</sup>. Algunos autores muestran que la mayor parte de los CEOOH en humanos se encuentran asociados a las HDL<sup>21</sup>, mientras que otros muestran que son las LDL<sup>22</sup>. En nuestro contexto, resulta también especialmente interesante resaltar que la entrada selectiva de CEOOH en células parenquimales hepáticas, mediada por *CLA-1*, es aproximadamente tres veces superior que para CE nativos<sup>121</sup>.

El papel de *SR-B1* en el metabolismo de las HDL ha planteado una cuestión fundamental. Se trataba de determinar si la expresión hepática de *SR-B1* favorecía la aterogénesis al disminuir las concentraciones de HDL, o bien resultaba antiaterogénica al eliminar CE. Los datos expuestos con anterioridad muestran un papel fundamentalmente antiaterogénico. Esto se debe a

que su expresión es primordialmente hepática, dando un papel relevante a su actividad como receptor *scavenger*; además, parece haber una regulación diferente al menos en macrófagos y en células de Kupffer. Algunos mecanismos de regulación son sutiles. Así, las propias HDL regulan en macrófagos la expresión de *SR-B1*. Las HDL inducen la activación de PPAR-gamma (mensajero y proteína) y su translocación al núcleo, pero también inducen la fosforilación mediada por MAP-cinasas de PPAR-gamma impidiendo de este modo la expresión de genes de respuesta (*SR-B1* y *CD36* entre otros), sugiriendo por tanto un mecanismo por el cual las HDL inhiben la acumulación lipídica<sup>122</sup>.

### Sobre *CLA-1* (*SR-B1*), *PON-1* y la oxidación de lípidos: hipótesis

Navab et al<sup>14,15</sup> presentaron las evidencias experimentales que justifican el mecanismo de *seeding* o sembrado de las LDL. Estos y otros experimentos demostraron igualmente que la acción de las HDL normales sobre las LDL inactiva de manera eficaz la carga aterogénica de éstas. También se ha demostrado que hay un transporte reverso que participa en su eliminación. Es más, este transporte reverso de fosfolípidos peroxidados, pero especialmente de CEOOH es, como se ha comentado, mucho más eficaz que el de fosfolípidos y CE nativos<sup>121</sup>. Por lo tanto, resultaría lógico suponer que la actividad enzimática *PON-1* de eliminación de fosfolípidos peroxidados y CEOOH y su eliminación a través de la ruta del transporte reverso de colesterol contribuirían de forma sinérgica a la reducción del riesgo cardiovascular.

Nosotros hemos intentado abordar esta cuestión a través del análisis de las variantes alélicas polimórficas descritas en el gen *CLA-1* (exones 1 y 8 e intrón 5) tratando de asignarles un fenotipo mensurable y determinar un riesgo cardiovascular asociado para, posteriormente, en una segunda fase, tratar de evaluar si había asociaciones de algún tipo con algunas de las variantes alélicas descritas en el gen *PON-1*. Pudimos comprobar la presencia de este sinergismo genético, y también que algunas de las variantes alélicas *CLA-1* modulan el contenido plasmático de CEOOH. Sin embargo, no obtuvimos evidencias fenotípicas similares asociadas a las variantes *PON-1*<sup>123</sup>.

## CONCLUSIONES

Al papel ateroprotector vinculado al transporte reverso se ha de sumar el efecto antioxidante de las diversas enzimas asociadas con las HDL. La identificación de múltiples sustratos para la enzima paraoxonasa-1 amplía la perspectiva de protección vascular mediada por las HDL, si bien quedan por identificar los mecanismos moleculares precisos por los que ésta se produce. La caracterización del receptor *CLA-1*, de

su función y de su posible papel como determinante de variación de las concentraciones plasmáticas de lípidos oxidados contribuye al conocimiento del metabolismo de las HDL y sugiere la necesidad de abordajes más completos en los estudios en humanos, además de posibilitar la creación de nuevas dianas terapéuticas.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el trabajo realizado por la técnica Dña. Lidia Estupiñán-Quintana.

## BIBLIOGRAFÍA

- Navab M, Anantharamaiah GM, Reddy ST, Van Lenten BJ, Ansell BJ, Fonarow GC, et al. The oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL. *J Lipid Res.* 2004;45:993-1007.
- Witztum JL, Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: does it hold for humans? *Trends Cardiovasc Med.* 2001;11:93-102.
- Cathcart MK, McNally AK, Chisolm GM. Lipoxygenase-mediated transformation of human low density lipoprotein to an oxidized and cytotoxic complex. *J Lipid Res.* 1991;32:63-70.
- Sparrow CP, Parthasarathy S, Steinberg D. Enzymatic modification of low density lipoprotein by purified lipoxygenase plus phospholipase A2 mimics cell-mediated oxidative modification. *J Lipid Res.* 1988;29:745-53.
- Yla-Herttuala S, Rosenfeld ME, Parthasarathy S, Sigal E, Sarkioja T, Witztum JL, et al. Gene expression in macrophage-rich human atherosclerotic lesions. 15-lipoxygenase and acetyl low density lipoprotein receptor messenger RNA colocalize with oxidation specific lipid-protein adducts. *J Clin Invest.* 1991;87:1146-52.
- Harats D, Shaish A, George J, Mulkins M, Kurihara H, Levkovitz H, et al. Overexpression of 15-lipoxygenase in vascular endothelium accelerates early atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:2100-5.
- Hatley ME, Srinivasan S, Reilly KB, Bolick DT, Hedrick CC. Increased production of 12/15 lipoxygenase eicosanoids accelerates monocyte/endothelial interactions in diabetic db/db mice. *J Biol Chem.* 2003;278:25369-75.
- Reilly KB, Srinivasan S, Hatley ME, Patricia MK, Lannigan J, Bolick DT, et al. 12/15-Lipoxygenase activity mediates inflammatory monocyte/endothelial interactions and atherosclerosis in vivo. *J Biol Chem.* 2004;279:9440-50.
- Zhao L, Cuff CA, Moss E, Wille U, Cyrus T, Klein EA, et al. Selective interleukin-12 synthesis defect in 12/15-lipoxygenase-deficient macrophages associated with reduced atherosclerosis in a mouse model of familial hypercholesterolemia. *J Biol Chem.* 2002;277:35350-6.
- Sun D, Funk CD. Disruption of 12/15-lipoxygenase expression in peritoneal macrophages. Enhanced utilization of the 5-lipoxygenase pathway and diminished oxidation of low density lipoprotein. *J Biol Chem.* 1996;271:24055-62.
- Cyrus T, Witztum JL, Rader DJ, Tangirala R, Fazio S, Linton MF, et al. Disruption of the 12/15-lipoxygenase gene diminishes atherosclerosis in apo E-deficient mice. *J Clin Invest.* 1999;103:1597-604.
- Cyrus T, Pratico D, Zhao L, Witztum JL, Rader DJ, Rokach J, et al. Absence of 12/15-lipoxygenase expression decreases lipid peroxidation and atherogenesis in apolipoprotein e-deficient mice. *Circulation.* 2001;103:2277-82.
- Belkner J, Chaitidis P, Stender H, Gerth C, Kuban RJ, Yoshimoto T, et al. Expression of 12/15-lipoxygenase attenuates intracellular lipid deposition during in vitro foam cell formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:797-802.
- Navab M, Hama SY, Cooke CJ, Anantharamaiah GM, Chaddha M, Jin L, et al. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: step 1. *J Lipid Res.* 2000;41:1481-94.
- Navab M, Hama SY, Anantharamaiah GM, Hassan K, Hough GP, Watson AD, et al. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: steps 2 and 3. *J Lipid Res.* 2000;41:1495-508.
- Serdyuk AP, Morton RE. Lipid transfer inhibitor protein defines the participation of lipoproteins in lipid transfer reactions: CETP has no preference for cholesteryl esters in HDL versus LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:718-26.
- Brousseau ME, Schaefer EJ, Wolfe ML, Bloedon LT, Digenio AG, Clark RW, et al. Effects of an inhibitor of cholesteryl ester transfer protein on HDL cholesterol. *N Engl J Med.* 2004;350:1505-15.
- Clark RW, Sutfin TA, Ruggeri RB, Willauer AT, Sugarman ED, Magnus-Aryitey G, et al. Raising high-density lipoprotein in humans through inhibition of cholesteryl ester transfer protein: an initial multidose study of torcetrapib. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:490-7.
- Oliveira HC, Quintao EC. In vitro cholesteryl ester bidirectional flow between high-density lipoproteins and triglyceride-rich emulsions: effects of particle concentration and composition, cholesteryl ester transfer activity and oleic acid. *J Biochem Biophys Methods.* 1996;32:45-57.
- Berti JA, Salerno AG, Bighetti EJ, Casquero AC, Boschero AC, Oliveira HC. Effects of diabetes and CETP expression on diet-induced atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *APMIS.* 2005;113:37-44.
- Bowry VW, Stanley KK, Stocker R. High density lipoprotein is the major carrier of lipid hydroperoxides in human blood plasma from fasting donors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992;89:10316-20.
- Nourooz-Zadeh J, Tajaddini-Sarmadi J, Ling KL, Wolff SP. Low-density lipoprotein is the major carrier of lipid hydroperoxides in plasma. Relevance to determination of total plasma lipid hydroperoxide concentrations. *Biochem J.* 1996;313:781-6.
- Heinecke JW, Lusis AJ. Paraoxonase-gene polymorphisms associated with coronary heart disease: support for the oxidative damage hypothesis? *Am J Hum Genet.* 1998;62:20-4.
- Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett.* 1991;286:152-4.
- Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS, Primo-Paromo SL, La Du BN. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest.* 1998;101:1581-90.
- Shih DM, Gu L, Hama S, Xia YR, Navab M, Fogelman AM, et al. Genetic-dietary regulation of serum paraoxonase expression and its role in atherogenesis in a mouse model. *J Clin Invest.* 1996;97:1630-9.
- Shih DM, Gu L, Xia YR, Navab M, Li WF, Hama S, et al. Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature.* 1998;394:284-7.
- Oda MN, Bielicki JK, Ho TT, Berger T, Rubin EM, Forte TM. Paraoxonase I overexpression in mice and its effect on high-density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;290:921-7.
- 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.
- Mackness MI, Hartly D, Bhatnagar D, Winocour PH, Arrol S, Isihola M, et al. Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolaemia and insulin-dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis.* 1991;86:193-9.
- Abbott CA, Mackness MI, Kumar S, Boulton AJ, Durrington PN. Serum paraoxonase activity, concentration, and phenotype



- distribution in diabetes mellitus and its relationship to serum lipids and lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15:1812-8.
32. Hasselwander O, McMaster D, Fogarty DG, Maxwell AP, Nicholls DP, Young IS. Serum paraoxonase and platelet-activating factor acetylhydrolase in chronic renal failure. *Clin Chem.* 1998;44:179-81.
  33. Schiavon R, De Fanti E, Giavarina D, Biasioli S, Cavalcanti G, Guidi G. Serum paraoxonase activity is decreased in uremic patients. *Clin Chim Acta.* 1996;247:71-80.
  34. Tomas M, Latorre G, Senti M, Marrugat J. The antioxidant function of high density lipoproteins: a new paradigm in atherosclerosis. *Rev Esp Cardiol.* 2004;57:557-69.
  35. Rosenblat M, Draganov D, Watson CE, Bisgaier CL, La Du BN, Aviram M. Mouse macrophage paraoxonase 2 activity is increased whereas cellular paraoxonase 3 activity is decreased under oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:468-74.
  36. Rozenberg O, Rosenblat M, Coleman R, Shih DM, Aviram M. Paraoxonase (PON1) deficiency is associated with increased macrophage oxidative stress: studies in PON1-knockout mice. *Free Radic Biol Med.* 2003;34:774-84.
  37. Bielicki JK, Forte TM, McCall MR. Minimally oxidized LDL is a potent inhibitor of lecithin:cholesterol acyltransferase activity. *J Lipid Res.* 1996;37:1012-21.
  38. Bielicki JK, Forte TM. Evidence that lipid hydroperoxides inhibit plasma lecithin:cholesterol acyltransferase activity. *J Lipid Res.* 1999;40:948-54.
  39. Bergmeier C, Siekmeier R, Gross W. Distribution spectrum of paraoxonase activity in HDL fractions. *Clin Chem.* 2004;50:2309-15.
  40. Getz GS, Reardon CA. Paraoxonase, a cardioprotective enzyme: continuing issues. *Curr Opin Lipidol.* 2004;15:261-7.
  41. Humbert R, Adler DA, Disteche CM, Hassett C, Omiecinski CJ, Furlong CE. The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nat Genet.* 1993;3:73-6.
  42. Adkins S, Gan KN, Mody M, La Du BN. Molecular basis for the polymorphic forms of human serum paraoxonase/arylesterase: glutamine or arginine at position 191, for the respective A or B allozymes. *Am J Hum Genet.* 1993;52:598-608.
  43. Garin MC, James RW, Dussoix P, Blanche H, Passa P, Froguel P, et al. Paraoxonase polymorphism Met-Leu54 is associated with modified serum concentrations of the enzyme. A possible link between the paraoxonase gene and increased risk of cardiovascular disease in diabetes. *J Clin Invest.* 1997;99:62-6.
  44. Odawara M, Tachi Y, Yamashita K. Paraoxonase polymorphism (Gln192-Arg) is associated with coronary heart disease in Japanese noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82:2257-60.
  45. Ruiz J, Blanche H, James RW, Garin MC, Vaisse C, Charpentier G, et al. Gln-Arg192 polymorphism of paraoxonase and coronary heart disease in type 2 diabetes. *Lancet.* 1995;346:869-72.
  46. Serrato M, Marian AJ. A variant of human paraoxonase/arylesterase (HUMPONA) gene is a risk factor for coronary artery disease. *J Clin Invest.* 1995;96:3005-8.
  47. Suehiro T, Nakauchi Y, Yamamoto M, Arai K, Itoh H, Hamashige N, et al. Paraoxonase gene polymorphism in Japanese subjects with coronary heart disease. *Int J Cardiol.* 1996;57:69-73.
  48. Antikainen M, Murtomaki S, Syvanne M, Pahlman R, Tahvanainen E, Jauhiainen M, et al. The Gln-Arg191 polymorphism of the human paraoxonase gene (HUMPONA) is not associated with the risk of coronary artery disease in Finns. *J Clin Invest.* 1996;98:883-5.
  49. Herrmann SM, Blanc H, Poirier O, Arveiler D, Luc G, Evans A, 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.
  50. Ombres D, Pannitteri G, Montali A, Candeloro A, Seccareccia F, Campagna F, 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.
  51. Lawlor DA, Day IN, Gaunt TR, Hinks LJ, Briggs PJ, Kiessling M, et al. The association of the PON1 Q192R polymorphism with coronary heart disease: findings from the British Women's Heart and Health cohort study and a meta-analysis. *BMC Genet.* 2004;5:17.
  52. Wheeler JG, Keavney BD, Watkins H, Collins R, Danesh J. Four paraoxonase gene polymorphisms in 11212 cases of coronary heart disease and 12786 controls: meta-analysis of 43 studies. *Lancet.* 2004;363:689-95.
  53. Mackness B, Davies GK, Turkie W, Lee E, Roberts DH, Hill E, et al. Paraoxonase status in coronary heart disease: are activity and concentration more important than genotype? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:1451-7.
  54. Hasselwander O, Savage DA, McMaster D, Loughrey CM, McNamee PT, Middleton D, et al. Paraoxonase polymorphisms are not associated with cardiovascular risk in renal transplant recipients. *Kidney Int.* 1999;56:289-98.
  55. Senti M, Tomas M, Marrugat J, Elosua R. Paraoxonase1-192 polymorphism modulates the nonfatal myocardial infarction risk associated with decreased HDLs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:415-20.
  56. James RW, Leviev I, Righetti A. Smoking is associated with reduced serum paraoxonase activity and concentration in patients with coronary artery disease. *Circulation.* 2000;101:2252-7.
  57. Mackness B, Mackness MI, Arrol S, Turkie W, Durrington PN. Effect of the human serum paraoxonase 55 and 192 genetic polymorphisms on the protection by high density lipoprotein against low density lipoprotein oxidative modification. *FEBS Lett.* 1998;423:57-60.
  58. Cao H, Girard-Globa A, Berthezene F, Moulin P. Paraoxonase protection of LDL against peroxidation is independent of its esterase activity towards paraoxon and is unaffected by the Q→R genetic. *J Lipid Res.* 1999;40:133-9.
  59. Mochizuki H, Scherer SW, Xi T, Nickle DC, Majer M, Huizenga JJ, et al. Human PON2 gene at 7q21.3: cloning, multiple mRNA forms, and missense polymorphisms in the coding sequence. *Gene.* 1998;213:149-57.
  60. Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber L, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of multigene family. *Genomics.* 1996;33:498-507.
  61. Sanghera DK, Aston CE, Saha N, Kamboh MI. DNA polymorphisms in two paraoxonase genes (PON1 and PON2) are associated with the risk of coronary heart disease. *Am J Hum Genet.* 1998;62:36-44.
  62. Draganov DI, Stetson PL, Watson CE, Billecke SS, La Du BN. Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is an HDL-associated lactonase and protects LDL against oxidation. *J Biol Chem.* 2000;275:33435-42.
  63. Stafforini DM, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Platelet-activating factor, a pleiotropic mediator of physiological and pathological processes. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2003;40:643-72.
  64. Tselepis AD, John CM. Inflammation, bioactive lipids and atherosclerosis: potential roles of a lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet activating factor-acetylhydrolase. *Atheroscler Suppl.* 2002;3:57-68.
  65. Caslake MJ, Packard CJ, Suckling KE, Holmes SD, Chamberlain P, Macphee CH. Lipoprotein-associated phospholipase A(2), platelet-activating factor acetylhydrolase: a potential new risk factor for coronary artery disease. *Atherosclerosis.* 2000;150:413-9.
  66. Packard CJ, O'leily DS, Caslake MJ, McMahon AD, Ford I, Cononey J, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 as an independent predictor of coronary heart disease. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med.* 2000;343:1148-55.
  67. Quarck R, De Geest B, Stengel D, Mertens A, Lox M, Theilmeyer G, et al. Adenovirus-mediated gene transfer of human platelet-activating factor-acetylhydrolase prevents injury-induced neointima formation and reduces spontaneous atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation.* 2001;103:2495-500.

68. Chen CH. Platelet-activating factor acetylhydrolase: is it good or bad for you? *Curr Opin Lipidol*. 2004;15:337-41.
69. Marathe GK, Zimmerman GA, McIntyre TM. Platelet-activating factor acetylhydrolase, and not paraoxonase-1, is the oxidized phospholipid hydrolase of high density lipoprotein particles. *J Biol Chem*. 2003;278:3937-47.
70. Tward A, Xia YR, Wang XP, Shi YS, Park C, Castellani LW, et al. Decreased atherosclerotic lesion formation in human serum paraoxonase transgenic mice. *Circulation*. 2002;106:484-90.
71. Rodrigo L, Mackness B, Durrington PN, Hernández A, Mackness MI. Hydrolysis of platelet-activating factor by human serum paraoxonase. *Biochem J*. 2001;354:1-7.
72. Shih DM, Xia YR, Wang XP, Miller E, Castellani LW, Subbanagounder G, et al. Combined serum paraoxonase knockout/apolipoprotein E knockout mice exhibit increased lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *J Biol Chem*. 2000;275:17527-35.
73. De Geest B, Stengel D, Landeloos M, Lox M, Le Gat L, Collen D, et al. Effect of overexpression of human apo A-I in C57BL/6 and C57BL/6 apo E-deficient mice on 2 lipoprotein-associated enzymes, platelet-activating factor acetylhydrolase and paraoxonase. Comparison of adenovirus-mediated human apo A-I gene transfer and human apo A-I transgenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:E68-E75.
74. Theilmeier G, De Geest B, Van Veldhoven PP, Stengel D, Michiels C, Lox M, et al. HDL-associated PAF-AH reduces endothelial adhesiveness in apoE<sup>-/-</sup> mice. *FASEB J*. 2000;14:2032-9.
75. Subramanian VS, Goyal J, Miwa M, Sugatami J, Akiyama M, Liu M, et al. Role of lecithin-cholesterol acyltransferase in the metabolism of oxidized phospholipids in plasma: studies with platelet-activating factor-acetyl hydrolase-deficient plasma. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1439:95-109.
76. Ahmed Z, Ravandi A, Maguire GF, Emili A, Draganov D, La Du BN, et al. Multiple substrates for paraoxonase-1 during oxidation of phosphatidylcholine by peroxynitrite. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;290:391-6.
77. Aviram M, Billecke S, Sorenson R, Bisgaier C, Newton R, Rosenblat M, et al. Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraoxonase activities: selective action of human paraoxonase allozymes Q and R. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18:1617-24.
78. Aviram M, Hardak E, Vaya J, Mahmood S, Milo S, Hoffman A, et al. 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*. 2000;101:2510-7.
79. Rozenberg O, Shih DM, Aviram M. Human serum paraoxonase 1 decreases macrophage cholesterol biosynthesis: possible role for its phospholipase-A2-like activity and lysophosphatidylcholine formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:461-67.
80. Draganov DI, Teiber JF, Speelman A, Osawa Y, Sunahara R, La Du BN. Enzymatic characterization of recombinant human paraoxonases (PON1, PON2 and PON3) - lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. *J Lipid Res*. 2005;46:1239-47.
81. Teiber JF, Draganov DI, La Du BN. Purified human serum PON1 does not protect LDL against oxidation in the in vitro assays initiated with copper or AAPH. *J Lipid Res*. 2004;45:2260-8.
82. Connelly PW, Draganov D, Maguire GF. Paraoxonase-1 does not reduce or modify oxidation of phospholipids by peroxynitrite. *Free Radic Biol Med*. 2005;38:164-174.
83. Rosenblat M, Vaya J, Shih D, Aviram M. Paraoxonase 1 (PON1) enhances HDL-mediated macrophage cholesterol efflux via the ABCA1 transporter in association with increased HDL binding to the cells: a possible role for lysophosphatidylcholine. *Atherosclerosis*. 2005;179:69-77.
84. Ribas V, Sanchez-Quesada JL, Anton R, Camacho M, Julve J, Escola-Gil JC, et al. Human apolipoprotein A-II enrichment displaces paraoxonase from HDL and impairs its antioxidant properties: a new mechanism linking HDL protein composition and antiatherogenic potential. *Circ Res*. 2004;95:789-97.
85. Clarke R, Daly L, Robinson K, Naughten E, Cahalane S, Fowler B, et al. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med*. 1991;324:1149-55.
86. Stampfer MJ, Malinow MR, Willett WC, Newcomer LM, Upson B, Ullmann D, et al. A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of myocardial infarction in US physicians. *JAMA*. 1992;268:877-81.
87. Anderson JL, Muhlestein JB, Horne BD, Carlquist JF, Bair TL, Madsen TE, et al. Plasma homocysteine predicts mortality independently of traditional risk factors and C-reactive protein in patients with angiographically defined. *Circulation*. 2000;102:1227-32.
88. Nygard O, Vollset SE, Refsum H, Stensvold I, Tverdal A, Nordrehaug JE, et al. Total plasma homocysteine and cardiovascular risk profile. The Hordaland Homocysteine Study. *JAMA*. 1995;274:1526-33.
89. Nygard O, Vollset SE, Refsum H, Brattstrom L, Ueland PM. Total homocysteine and cardiovascular disease. *J Intern Med*. 1999;246:425-54.
90. Cortese C, Motti C. MTHFR gene polymorphism, homocysteine and cardiovascular disease. *Public Health Nutr*. 2001;4:493-7.
91. Sengupta S, Wehbe C, Majors AK, Ketterer ME, DiBello PM, Jacobsen DW. Relative roles of albumin and ceruloplasmin in the formation of homocystine, homocysteine-cysteine-mixed disulfide, and cystine in circulation. *J Biol Chem*. 2001;276:46896-904.
92. Stanger O, Weger M. Interactions of homocysteine, nitric oxide, folate and radicals in the progressively damaged endothelium. *Clin Chem Lab Med*. 2003;41:1444-54.
93. Starkebaum G, Harlan JM. Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine. *J Clin Invest*. 1986;77:1370-6.
94. Weiss N, Heydrick SJ, Postea O, Keller C, Keaney JF Jr., Loscalzo J. Influence of hyperhomocysteinemia on the cellular redox state: impact on homocysteine-induced endothelial dysfunction. *Clin Chem Lab Med*. 2003;41:1455-61.
95. Liu L, Yan Y, Zeng M, Zhang J, Hanes MA, Ahearn G, et al. Essential roles of S-nitrosothiols in vascular homeostasis and endotoxic shock. *Cell*. 2004;116:617-28.
96. Upchurch GR, Jr, Welch GN, Fabian AJ, Pigazzi A, Keaney JF, Jr., Loscalzo J. Stimulation of endothelial nitric oxide production by homocyst(e)ine. *Atherosclerosis*. 1997;132:177-85.
97. Jakubowski H. Molecular basis of homocysteine toxicity in humans. *Cell Mol Life Sci*. 2004;61:470-87.
98. Jakubowski H. Homocysteine-thiolactone and S-nitroso-homocysteine mediate incorporation of homocysteine into protein in humans. *Clin Chem Lab Med*. 2003;41:1462-6.
99. Jakubowski H. Calcium-dependent human serum homocysteine thiolactone hydrolase. A protective mechanism against protein N-homocysteinylolation. *J Biol Chem*. 2000;275:3957-62.
100. Jakubowski H. Translational accuracy of aminoacyl-tRNA synthetases: implications for atherosclerosis. *J Nutr*. 2001;131:S2983-7.
101. Jakubowski H, Ambrosius WT, Pratt JH. Genetic determinants of homocysteine thiolactonase activity in humans: implications for atherosclerosis. *FEBS Lett*. 2001;491:35-9.
102. Billecke S, Draganov D, Counsell R, Stetson P, Watson C, Hsu C, et al. Human serum paraoxonase (PON1) isozymes Q and R hydrolyze lactones and cyclic carbonate esters. *Drug Metab Dispos*. 2000;28:1335-42.
103. Balogh Z, Seres I, Harangi M, Kovacs P, Kakuk G, Paragh G. Gemfibrozil increases paraoxonase activity in type 2 diabetic patients. A new hypothesis of the beneficial action of fibrates? *Diabetes Metab*. 2001;27:604-10.
104. Davignon J, Jacob RF, Mason RP. The antioxidant effects of statins. *Coron Artery Dis*. 2004;15:251-8.

105. Paragh G, Asztalos L, Seres I, Balogh Z, Locsey L, Karpati I, et al. Serum paraoxonase activity changes in uremic and kidney-transplanted patients. *Nephron*. 1999;83:126-31.
106. Tomas M, Senti M, García-Faría F, Vila J, Torrents A, Covas M, et al. Effect of simvastatin therapy on paraoxonase activity and related lipoproteins in familial hypercholesterolemic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:2113-9.
107. Rodríguez FJ, Rodríguez JC, Macías A, Hernández Y, Losada A, Caballero A. Las isoformas de la paraoxonasa-1 difieren en su capacidad de hidrólisis frente a fármacos antihipertensivos e hipolipemiantes. *Nefrología*. 2004;24 Supl 5:2.
108. Rodríguez FJ, Rodríguez JC, Macías A, Hernández Y, Losada A, Caballero A. Paraoxonase isoforms differ regarding to its hydrolytic activity against statin and antihypertensive drugs. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15:645A.
109. Glass C, Pittman RC, Civen M, Steinberg D. Uptake of high-density lipoprotein-associated apoprotein A-I and cholesterol esters by 16 tissues of the rat in vivo and by adrenal cells and hepatocytes in vitro. *J Biol Chem*. 1985;260:744-50.
110. Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science*. 1996;271:518-20.
111. Acton SL, Scherer PE, Lodish HF, Krieger M. Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor. *J Biol Chem*. 1994;269:21003-9.
112. Calvo D, Vega MA. Identification, primary structure, and distribution of CLA-1, a novel member of the CD36/LIMPII gene family. *J Biol Chem*. 1993;268:18929-35.
113. Muraio K, Terpstra V, Green SR, Kondratenko N, Steinberg D, Quehenberger O. Characterization of CLA-1, a human homologue of rodent scavenger receptor BI, as a receptor for high density lipoprotein and apoptotic thymocytes. *J Biol Chem*. 1997;272:17551-7.
114. Varban ML, Rinninger F, Wang N, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, et al. Targeted mutation reveals a central role for SR-BI in hepatic selective uptake of high density lipoprotein cholesterol. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:4619-24.
115. Ji Y, Wang N, Ramakrishnan R, Sehayek E, Huszar D, Breslow JL, et al. Hepatic scavenger receptor BI promotes rapid clearance of high density lipoprotein free cholesterol and its transport into bile. *J Biol Chem*. 1999;274:33398-402.
116. Sehayek E, Ono JG, Shefer S, Nguyen LB, Wang N, Batta AK, et al. Biliary cholesterol excretion: a novel mechanism that regulates dietary cholesterol absorption. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:10194-99.
117. Kozarsky KF, Donahee MH, Rigotti A, Iqbal SN, Edelman ER, Krieger M. Overexpression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels. *Nature*. 1997;387:414-17.
118. Ueda Y, Royer L, Gong E, Zhang J, Cooper PN, Francone O, et al. Lower plasma levels and accelerated clearance of high density lipoprotein (HDL) and non-HDL cholesterol in scavenger receptor class B type I transgenic mice. *J Biol Chem*. 1999;274:7165-71.
119. Wang N, Arai T, Ji Y, Rinninger F, Tall AR. Liver-specific overexpression of scavenger receptor BI decreases levels of very low density lipoprotein ApoB, low density lipoprotein ApoB, and high density lipoprotein in transgenic mice. *J Biol Chem*. 1998;273:32920-6.
120. Pussinen PJ, Karten B, Wintersperger A, Reicher H, McLean M, Malle E, et al. The human breast carcinoma cell line HBL-100 acquires exogenous cholesterol from high-density lipoprotein via CLA-1 (CD-36 and LIMPII analogous 1)-mediated selective cholesteryl ester uptake. *Biochem J*. 2000;349:559-66.
121. Fluiter K, Sattler W, De Beer MC, Connell PM, Van der Westhuyzen DR, Van Berkel TJ. Scavenger receptor BI mediates the selective uptake of oxidized cholesterol esters by rat liver. *J Biol Chem*. 1999;274:8893-9.
122. Han J, Hajjar DP, Zhou X, Gotto AM Jr, Nicholson AC. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-mediated gene expression. A new mechanism of action for high density lipoprotein. *J Biol Chem*. 2002;277:23582-6.
123. Rodríguez-Esparragón F, Rodríguez-Pérez JC, Hernández-Trujillo Y, Macías-Reyes A, Medina A, Caballero A, et al. Allelic Variants of the Human Scavenger Receptor Class B Type 1 and Paraoxonase 1 on Coronary Heart Disease. Genotype-Phenotype Correlations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:854-60.