



ARTÍCULO DE REVISIÓN

## Paraoxonasa: sus múltiples funciones y regulación farmacológica

Osvaldo Fridman,<sup>1,2,3</sup> Alicia Graciela Fuchs,<sup>1</sup> Rafael Porcile,<sup>4</sup> Analía Verónica Morales,<sup>4</sup> Luis Osvaldo Gariglio<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Centro de Altos Estudios en Ciencias Humanas y de la Salud. Universidad Abierta Interamericana.

<sup>2</sup>Área de Investigación. Instituto de Oncología Ángel H. Roffo. Universidad de Buenos Aires.

<sup>3</sup>Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Argentina.

<sup>4</sup>Hospital Universitario. Universidad Abierta Interamericana.

Recibido el 29 de octubre de 2010; aceptado 17 de marzo de 2011.

### PALABRAS CLAVE

Paraoxonasa; Homocisteína tiolactonasa; Actividad antioxidante; Aterosclerosis; Regulación farmacológica; Argentina.

### Resumen

La homocisteína, aminoácido no-proteico, es un importante factor de riesgo de aterosclerosis y trombosis, afecta la vasodilatación y la función normal del endotelio vascular, es pro-inflamatoria e induce estrés de retículo endoplásmico. Su conformación más reactiva, la homocisteína tiolactona, producto de la acción no específica de la metionil-t RNA sintetasa, se incorpora a proteínas mediante puentes disulfuro (*S*-homocisteinilación) o uniones amida (*N*-homocisteinilación) produciendo graves efectos sobre la estructura y función proteica conduciendo a toxicidad celular, respuestas autoinmunes y aterogénesis. La enzima paraoxonasa-1, integrante de la lipoproteína de alta densidad, fue inicialmente considerada por su capacidad de hidrolizar derivados organofosfato, pero luego se le atribuyó un importante papel protector contra la aterosclerosis por prevenir la oxidación de lipoproteínas e hidrolizar homocisteína tiolactona. Existen evidencias acerca del papel de paraoxonasa-1 en la enfermedad vascular. Los factores genéticos (polimorfismos de la paraoxonasa-1), ambientales y el estilo de vida influyen sobre su concentración y actividad biológica, pero distintos fármacos como hipolipemiantes o cardioprotectores y otros, como antibióticos y esteroides, son también importantes moduladores. En la presente revisión se actualiza la más destacada información sobre los estudios clínicos y experimentales que permiten entender el papel que cumple esta enzima en la protección ante el desarrollo de la aterosclerosis.

Correspondencia: Osvaldo Fridman. Av. Montes de Oca 745 (C1270AAH) Ciudad Autónoma de Buenos Aires, República Argentina. Teléfonos: (5411) 4301 5240 / 5323 / 5248. Correo electrónico: Osvaldo.Fridman@Vaneduc.edu.ar

**KEYWORDS**

Paraoxonase; Homocysteine thiolactonase; Antioxidant activity; Atherosclerosis; Pharmacological regulation; Argentina.

**Paraoxonase: its multiple functions and pharmacological regulation****Abstract**

*Homocysteine, a non-protein amino acid, important risk factor for atherosclerosis and thrombosis, causes dysfunction of vascular endothelial cells traduced in inadequate vasodilation mechanism, is pro-inflammatory and induces endoplasmic reticulum stress. The more reactive conformation is the homocysteine thiolactone (HcyT), product to the nonspecific action of methionyl-tRNA synthetase, which is incorporated into proteins by disulfide bonds (S-homocysteinilation) or amide bonds (N-homocysteinilation) affecting protein structure and function leading to cell toxicity, autoimmune responses and atherogenesis. The enzyme paraoxonase-1 (PON1), part of high density lipoprotein (HDL), had been studied only for its ability to hydrolyze organophosphate derivatives. But, more recently it has been attributed other important role. The enzyme activities are involving in protecting against the development of atherosclerosis, by preventing oxidation of lipoproteins and hydrolyze HcyT. There is growing evidence about the protective role of PON1 in vascular disease. Genetic factors (polymorphisms of the PON1), environmental and lifestyle influence their concentration and biological activity, but drugs used as cardioprotectives and lipid-lowering or others, such as antibiotics and steroids, are also important modulators. This review is an updated of the most prominent information on clinical and experimental studies for understanding the role of the PON-1 in the protection against development of atherosclerosis.*

**Introducción**

La hipertensión arterial, el tabaquismo, la diabetes mellitus y la dislipemia se consideran factores de riesgo de enfermedad cardiovascular (CAD), una de las principales causas de muerte; sin embargo, también ocurren eventos vasculares en personas con ausencia de estos factores. Numerosos estudios clínicos muestran que la homocisteína (tHcy) es un factor de riesgo independiente de CAD y de enfermedad cerebrovascular. Entre los mecanismos celulares por los que la Hcy puede contribuir al desarrollo de la CAD, se incluyen sus efectos sobre el normal plegamiento proteico, el estrés oxidativo y la inducción de factores pro-inflamatorios.<sup>1-3</sup> La Hcy adquiere mayor toxicidad al ciclarse y formar homocisteína tiolactona (HcyT) por la acción no específica de la enzima metionil-tRNA sintetasa (MetRS).<sup>4</sup> La HcyT se une por puentes disulfuro a grupos sulfhidrilos libres de las proteínas (S-homocisteinilación) o por acilación a grupos amino libres de residuos de lisina (N-homocisteinilación),<sup>5</sup> dañando la estructura proteica y afectando sus actividades fisiológicas.<sup>6</sup> Entre las proteínas S-homocisteiniladas se describieron: anexina, fibronectina, Factor Va; y entre las N-homocisteiniladas: albúmina, fibrinógeno, tripsina, γ-globulina, transferrina, lipoproteína de alta densidad (HDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL).<sup>7</sup> En particular, la homocisteinilación de las LDL incrementa su susceptibilidad frente a la oxidación y facilita su captación por los macrófagos. Además, las LDL homocisteiniladas provocan respuesta autoinmune e incrementan la inflamación vascular. Los coágulos formados a partir del fibrinógeno homocisteinilado tienen alta resistencia a la lisis, con lo que contribuye al desarrollo de CAD y enfermedad vascular.<sup>5</sup> También se ha comprobado la citotoxicidad de la HcyT sobre el endotelio vascular humano, de animales de experimentación<sup>8</sup> y células promieloideas,<sup>9</sup> además inhibe la señal insulínica en células de hepatoma de rata.<sup>10</sup> La magnitud de síntesis de HcyT y de homocisteinilación protéica en células endoteliales depende de los niveles de tHcy, metionina, folato y HDL.<sup>4,5</sup>

**Paraoxonasa y su actividad de homocisteína tiolactonasa**

La PON1 (arildialquilfosfatasa, E.C.3.1.8.1), descrita en 1946 por A. Mazur,<sup>11</sup> es una enzima dependiente de calcio con actividades de esterasa y lactonasa. Aún sin conocerse su papel fisiológico, se la describió por su capacidad de hidrolizar derivados de compuestos organofosfato;<sup>11</sup> los mismos que inhiben la acción de la acetil colinesterasa,<sup>12</sup> causando síndrome colinérgico y polineuropatía crónica.<sup>13</sup> Los sustratos de paraoxonasa-1 (PON1) son tri-ésteres del ácido fosfórico<sup>14</sup> como paraoxón y diazoxón, metabolitos de los insecticidas altamente tóxicos paratión y diazinón, respectivamente. Esta enzima hidroliza también los agentes nerviosos sarín y somán y ésteres aromáticos como fenilacetato y naftilacetato.<sup>15</sup> En 1991 Mackness y colaboradores<sup>16</sup> sugirieron que la enzima podría ser capaz de impedir o limitar la oxidación de las LDL. Ese fue el primer informe que le adjudicó a la PON1 capacidad antioxidante, tornándose en un punto nodal para entender la importancia clínica de esta enzima, dada la relación entre el estrés oxidativo, la oxidación del LDL y la aterosclerosis. En la actualidad es creciente el interés en el conocimiento del papel que juega esta enzima en la protección del desarrollo de la aterosclerosis. Billecke y colaboradores<sup>17</sup> demostraron que el suero humano posee actividad de homocisteína tiolactonasa capaz de hidrolizar lactonas y ésteres de carbonatos cíclicos. Hidroliza HcyT para formar nuevamente Hcy en una reacción Ca<sup>2+</sup> dependiente, como las actividades paraoxonasa/arilesterasa de PON1. La HcyT resultó tener idéntica secuencia de aminoácidos que la PON1.<sup>18</sup> Estos descubrimientos sugirieron que la función anti-aterogénica de PON1 no se restringe solamente a la inhibición de la oxidación de las LDL. En humanos, la actividad de HcyT de la PON1 se correlaciona inversamente con la concentración de tHcy y es predictora de CAD.<sup>19</sup> Esta capacidad de hidrolizar HcyT es hoy considerada una de sus principales funciones.<sup>4,5</sup>

## Familia de tres genes paraoxonosas

Primo-Parmo y colaboradores<sup>20</sup> descubrieron que PON1 es miembro de una familia de tres genes: PON2, PON3 y PON1, localizados en este orden en el brazo largo del cromosoma siete (q21.22). Las tres PON comparten 70% de identidad en sus secuencias. PON1 es el miembro mejor estudiado y caracterizado de la familia que parece haber surgido de una duplicación de un gen común ancestral (probablemente PON2). Esto explicaría tanto la homología como la localización adyacente en el cromosoma siete. También se postula que esta familia habría evolucionado ligada a lactonasas, por la presencia de secuencias similares en ambos genes.<sup>21</sup> En los humanos, las PON se expresan en diferentes tejidos.<sup>20</sup> Los genes PON3 y PON1 se expresan y sintetizan exclusivamente en el hígado mientras que PON2 en cerebro, hígado, riñón y testículo.<sup>22</sup> PON1 y PON3 son secretadas por las células hepáticas y en circulación están unidas a las HDL, aunque en suero humano predomina PON1.<sup>23</sup> La enzima PON2 es de localización exclusivamente celular. Se encuentra en la membrana con su sitio activo hacia el exterior de la célula. PON1 también presenta la misma orientación en la membrana celular antes de ser excretada al suero.<sup>24</sup> PON2 y PON3 también exhiben propiedades antioxidantes y protegen o revierten la oxidación de HDL y LDL, pero no actúan contra los organofosforados como el paraoxón.

## Polimorfismos genéticos de la PON1

La clonación del gen en 1993 permitió la identificación de más de 200 polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en diferentes regiones del gen PON1.<sup>25</sup> La atención se focalizó en SNPs de la región codificante en las posiciones 192 y 55 y en la región promotora - 108. La sustitución de glutamina (Q) por arginina (R) en el codón 192 determina diferente actividad hidrolítica hacia varios sustratos.<sup>26</sup> El alelo Q es menos eficiente que el R para hidrolizar paraoxón, pero más eficiente frente a diazoxón, somán y sarín<sup>27</sup> y las lipoproteínas oxidadas: (ox-HDL y ox-LDL).<sup>28</sup> La modificación del ncleotido 192 no afecta la capacidad de hidrólisis del fenilacetato. Dado que la aloenzima Q resultó ser la más eficiente en la protección contra la oxidación de las lipoproteínas, las investigaciones se orientaron hacia la relación de los polimorfismos de PON1 con el riesgo de CAD. Los estudios resultaron ser discrepantes, unos mostraron que el polimorfismo Q192 está más asociado con menor riesgo de CAD que el polimorfismo R y otros, que no existe asociación con ninguno de los dos alelos PON1-192.<sup>29</sup> La sustitución de leucina (L) por metionina (M) en la posición 55 es determinante de diferentes concentraciones séricas de la proteína PON1. El alelo M está asociado con concentraciones más bajas. Se han descrito cinco polimorfismos en la región promotora. La sustitución C-108T parece tener una gran influencia sobre los niveles plasmáticos de la proteína PON1. De hecho, los bajos niveles en los PON1M55 parecen ser el resultado de un desequilibrio relacionado con el alelo C-108T. El alelo C-108C determina niveles de PON1 que son el doble de los que provee el alelo C-108T.<sup>30</sup> El polimorfismo L55M está asociado en forma independiente con la formación temprana de placas ateroscleróticas,<sup>31</sup> mientras que el

genotipo PON1 LL es un predictor significativo de CAD.<sup>32</sup> Otros estudios no encontraron una asociación entre este polimorfismo PON1 y el infarto de miocardio.<sup>33</sup>

## Características estructurales de la paraoxonasa

La PON1 humana es una glicoproteína compuesta por 354 aminoácidos y su peso molecular es de 43 kDa. Es una β-hélice de seis aspas y cada aspa contiene cuatro filamentos. En el túnel central de la hélice hay dos iones calcio separados por 7.4 Å uno del otro. El ion calcio en la sección central es considerado estructural. Su remoción de la PON1 la inactiva frente al paraoxón y al fenilacetato; sin embargo, la falta del Ca<sup>2+</sup> no afecta su capacidad antioxidante sobre LDL. La PON1 tendría dos sitios activos funcionales, uno para las actividades paraoxonasa/arilesterasa y el otro para la protección contra la oxidación de las LDL.<sup>34</sup> El grupo sulfhidrilo libre en posición 284 es esencial para las dos actividades enzimáticas descritas. Su bloqueo, así como el reemplazo de esa cisteína por Ala o por Ser en mutantes recombinantes para PON1 afecta las dos actividades anteriormente descritas.<sup>34</sup> El sitio activo contiene, además, la diada histidina formada por la His115 y la His134, que poseen la capacidad de actuar como base desprotonando una molécula de agua y generando un ion hidróxido que produce la hidrólisis del fenilacetato.<sup>25</sup> La actividad y estabilidad de la unión de la enzima a la partícula de HDL dependen de la composición de la partícula, especialmente de la presencia de apolipoproteína AI (apoAI) la cual aumenta la actividad de PON1.<sup>35</sup>

## Sustratos de la PON1

No se ha determinado con exactitud cuál es el sustrato biológico de la PON1. Posiblemente, la enzima cumpla varios papeles con más de un sustrato. La mayor parte de las evidencias acerca de que PON1 inhibe la oxidación lipídica que proviene de las mediciones de oxidaciones lipídicas generales, tales como formación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), lipoperoxidos y la formación de dienos conjugados.<sup>36</sup> Watson y colaboradores<sup>37</sup> publicaron que PON1 purificado de HDL humana cataliza la hidrólisis del 1-palmitoil-2-araquidonoil-sn-glicero-3-fosforilcolina oxidado (Ox-PAPC). Aviram y colaboradores<sup>38</sup> propusieron que el sustrato para PON1 es colesterol linoleato hidroperóxido, mientras que van Himbergen y colaboradores<sup>39</sup> postularon al ácido linoleico oxidado. Por último, Jakubowski y colaboradores<sup>4</sup> indicaron que otro sustrato para PON1 es la HcyT. Parecería que PON1 tiene un amplio rango de especificidades por sustratos biológicos. Sin embargo, la variedad de lípidos postulados como sustratos para PON1 pueden también estar originados en las dificultades técnicas en identificar y analizar los productos de la oxidación lipídica porque estos suelen ser inestables y dependientes del tipo y extensión del proceso de oxidación. En ausencia de un reconocido sustrato biológico para PON1, su actividad se mide a través de su función como degradante de los sustratos sintéticos, paraoxón y fenil acetato. Estudios más recientes indican que la

actividad de arilesterasa (hidrólisis del fenil acetato) es la que mejor refleja la actividad antioxidante de PON1, aunque no sea su responsable directo.<sup>40</sup> La medición de la actividad arilesterasa es la más utilizada porque se correlaciona con las concentraciones de PON1 sérico medida por ELISA.<sup>41</sup>

### Efectos antiaterogénicos de la PON1 asociada a la HDL

Se estimó que la baja concentración plasmática de HDL-C es uno de los factores bioquímicos más correlacionados con el riesgo de padecer CAD.<sup>42</sup> La HDL asociada a PON1, como potencial factor protector frente al riesgo de CAD, no ha sido aún del todo evaluado. Se postula que ante la presencia de un aumento del estrés oxidativo, las HDL protegerían las LDL y las membranas celulares. Esta función de las HDL puede ser asignada a su composición química, a su asociación con antioxidantes liposolubles y a enzimas tales como el factor de activación de plaquetas acetilhidrolasa (PAF-AH), lecitina-colesterol aciltransferasa (LCAT) y PON1.<sup>43</sup> Estudios experimentales desarrollados sobre ratones transgénicos PON1-Knockout o con sobre-expresión de PON1 brindaron evidencias muy convincentes de que PON1 posee efectos antiinflamatorios inhibiendo la formación de la placa aterosclerótica.<sup>44,45</sup> Estudios clínicos encontraron en pacientes jóvenes con CAD menor actividad sérica de la PON1, respecto de los controles.<sup>46</sup> Sarkar y colaboradores<sup>47</sup> observaron una baja actividad de PON1 sin disminución de la concentración de HDL en una población india asiática con CAD prematuro. Sin embargo, Rahamani y colaboradores<sup>48</sup> no encontraron diferencias en la actividad de PON1 entre pacientes con CAD y sus controles. Estas divergencias pueden ser explicadas por la variabilidad en los polimorfismos de PON1. Finalmente, estudios prospectivos, mostraron fuertes evidencias de que los niveles de PON1 son un factor de riesgo independiente de aterosclerosis. El estudio prospectivo Caerphilly realizado sobre 1353 participantes durante 15 años logró determinar que el factor de riesgo predictivo de subsecuentes eventos de CAD era la reducida actividad de PON1 sobre el paraoxón y no así sobre el fenilacetato.<sup>49</sup> Tampoco la correlación entre HDL-C y PON1 fue lo suficientemente fuerte como para explicar la relación entre PON1 y CAD. La actividad de PON1 fue un fuerte predictor de un nuevo evento coronario en varones pertenecientes al quintilo superior medido por la ecuación de riesgo de Framingham y en aquellos que ya evidenciaban síntomas de CAD en el momento de la admisión al estudio. En forma similar, un estudio de Bhattacharyya y colaboradores<sup>50</sup> realizado sobre 1399 pacientes durante cuatro años, provee evidencias de una relación entre las actividades de paroxonasa y de arilesterasa, así como su polimorfismo funcional (Q192R) y el riesgo de desarrollo de CAD y sus complicaciones agudas. La mayoría de los estudios indican que es la actividad de PON1 y no así su genotipo, la que se correlaciona inversamente con riesgo de CAD. Sobre la participación de PON1 en la aterosclerosis se proponen dos posibles mecanismos: la protección antioxidante y la hidrólisis de la HcyT.

### Papel antioxidante de la PON1

PON1 puede proteger de la acumulación de lipoperóxidos sobre las LDL *in vitro* e *in vivo*.<sup>14</sup> Mediante la hidrólisis de los lipoperóxidos en las ox-LDL, PON1 las despojan de sus propiedades aterogénicas, ya que sólo las ox-LDL, y no las LDL nativas se unen a los receptores basureros y son tomados por los macrófagos conduciendo a la formación de células espumosas. Rozenberg y colaboradores<sup>51</sup> demostraron que PON1 inhibe la biosíntesis de colesterol en los macrófagos e hidroliza los ácidos grasos oxidados de fosfolípidos de membranas celulares, incluidos macrófagos. Se describió que PON1 protege a LDL y HDL de la oxidación preservando su participación en el transporte del colesterol hacia el hígado.<sup>38</sup> Los mecanismos por los cuales PON1 inhibe la oxidación de HDL incluyen la hidrólisis de los peróxido de fosfolípidos y de los hidroperóxido ésteres de colesterol (actividad de esterasa).<sup>28</sup> La enzima también reduce los hidroperóxido lipídicos a hidróxidos y presenta una actividad del tipo peroxidasa ya que PON1 degrada al peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), un ROS producido bajo el estrés oxidativo.<sup>38</sup> PON1 unido a HDL es capaz de generar lisofosfatidilcolina, que posee efecto inhibitorio sobre la biosíntesis del colesterol y además estimula la unión de HDL a los macrófagos y la salida del colesterol de las células, reduciendo las concentraciones intracelulares de colesterol, retardando así el proceso de formación de células espumosas. Algunos estudios clínicos evidencian que la función antioxidant de PON1 comienza por la protección de las lipoproteínas (LDL y HDL) contra las modificaciones oxidativas por especies reactivas de oxígeno.<sup>38</sup> Los sujetos con síndrome metabólico presentan menor actividad de PON1 y altas concentraciones de lipoperóxidos.<sup>52</sup> Navab y colaboradores<sup>53</sup> demostraron que las HDL con baja actividad de PON1 no protegen a las LDL de la oxidación.

### Moduladores de la actividad de PON1

Son numerosos los factores que afectan la actividad de PON1: los polimorfismos genéticos, la edad, el género, el nivel de estrés oxidativo, los fosfolípidos oxidados en LDL y HDL, el consumo de alcohol, el tabaquismo, la actividad física.<sup>54</sup> La actividad de PON1 varía con la edad, es más baja en niños,<sup>55</sup> alcanza su mayor nivel en adultos jóvenes y declina en adultos mayores y en mujeres después de la menopausia.<sup>56</sup> Goldhammer y colaboradores<sup>57</sup> observaron mayor actividad de PON1 en las mujeres. El estrés oxidativo ejerce un fuerte impacto, pudiendo conducir a la inactivación de la enzima.<sup>58</sup> Los fosfolípidos oxidados en las partículas de LDL y HDL reducen la actividad de PON1, siendo la isoforma PON1R más sensible a la oxidación que la isoforma PON1Q.<sup>59</sup> En ratones se vio que los factores que disminuyen el estrés oxidativo como los flavonoides antioxidantes presentes en el jugo de granada protegen a la PON1 de la oxidación inducida por  $Cu^{2+}$ .<sup>60</sup> La suplementación nutricional con jugo de granada a un grupo de pacientes con estenosis de arteria carótida durante un año, se tradujo en un incremento significativo (83%) en la actividad de PON1, acompañada de una también significativa reducción (90%) de la oxidación de LDL, tanto basal como inducida por  $Cu^{2+}$ .<sup>35</sup> El consumo de vino tinto o sus flavonoides querctetina o catequina por ratones

deficientes en apolipoproteína E, reduce el estrés oxidativo y contribuye a la actividad hidrolítica de la PON1 sobre el ox-LDL y en la lesión aterosclerótica.<sup>61,62</sup> Nguyen y Sok<sup>63</sup> describieron un efecto benéfico de los ácidos monoenoicos, especialmente el ácido oleico, y sus derivados fosfolípidicos sobre la PON1. Ratas a las que se les administraron ácidos grasos monoinsaturados, presentaron mayor actividad de PON1 que los que recibieron ácidos grasos saturados o altamente poliinsaturados.<sup>64</sup> La hipertrigliceridemia posprandial modula la actividad y concentración de PON1.<sup>65</sup> El consumo moderado de alcohol<sup>66</sup> causa 395% de incremento de la actividad de PON1, mientras que el suero de los alcohólicos presenta 45% menos de actividad que los no alcohólicos. La ingesta leve de alcohol estimula la PON1 mediante la regulación positiva de su mRNA hepático en ratas y humanos. Sin embargo, el alto consumo de alcohol inhibe la actividad y expresión de la PON1, independientemente de sus polimorfismos.<sup>67</sup> Senti y colaboradores<sup>52</sup> mostraron que la actividad de PON1 fue menor en fumadores que en no fumadores y ex fumadores como consecuencia del mayor estrés oxidativo y de la modificación en la actividad de la enzima. Las partículas de LDL de los fumadores son más susceptibles a la oxidación y a su metabolismo por macrófagos que las de no fumadores.<sup>68</sup> James y colaboradores<sup>69</sup> publicaron que el tabaquismo está asociado con una reducción de la actividad y concentración de PON1 sérica en pacientes con CAD.

## Regulación farmacológica de la PON1

En los últimos años, el uso de drogas hipolipemiantes se ha incrementado sustancialmente. Aunque el principal objetivo del uso de estas drogas es la reducción de los niveles de LDL-C, también se sumó su capacidad de afectar otros aspectos del metabolismo lipídico, como la elevación de los niveles de HDL-C. Dado que PON1, junto con la subpoblación apoAI se encuentra enteramente ligada a las partículas de HDL<sup>23</sup> y existe una positiva, aunque débil, correlación entre las concentraciones de HDL-C séricas y de PON1,<sup>70</sup> se postuló que los factores que aumentan HDL deberían influir también sobre PON1. Gran número de trabajos se han realizados para examinar los efectos de estas drogas, particularmente fibratos y estatinas sobre la actividad y concentración de PON1. Incluso se llevaron a cabo estudios más detallados sobre su potencial papel como reguladoras de la expresión del gen PON1.

### Estatinas

Las estatinas, inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa, son ampliamente utilizadas para reducir el colesterol plasmático total y las LDL-C en pacientes con hiperlipidemia.<sup>71</sup> En muchos estudios se ha podido comprobar su efectividad para reducir la morbilidad por complicaciones ateroscleróticas.<sup>72</sup> Los mecanismos por los que se alcanzan sus efectos benéficos se extienden más allá de sus propiedades como reductores del colesterol. Estas drogas reducen las reacciones antiinflamatorias vasculares,<sup>73</sup> estabilizan la placa aterosclerótica,<sup>74</sup> inhiben la proliferación de las células musculares lisas,<sup>75</sup> desplazan favorablemente el balance entre coagulación y fibrinolisis<sup>76</sup> y estimulan la producción

de óxido nítrico vascular.<sup>77</sup> Estos efectos pleiotrópicos de las estatinas no son atribuibles a sus propiedades lípido-reductoras, sino a sus efectos supresores de la síntesis de isoprenoides no esteroides los cuales, al igual que el colesterol, son productos de la cascada del mevalonato. Las estatinas reducen los niveles de farnesil y de geranilgeranil pirofosfato lo que conduce a una disminución de la isoprenilación proteica, modulando los mecanismos de trasducción intracelular en los que intervienen proteínas ligadoras de GTP.<sup>74</sup> No todos los pacientes responden a las estatinas con un aumento de la concentración de HDL-C.<sup>78</sup> Los efectos de las estatinas sobre HDL-C podrían depender de sus concentraciones basales, del género, o de los niveles basales de triglicéridos.<sup>79-81</sup> pero además existen diferentes resultados con distintas estatinas. En algunos estudios, simvastatina resultó más efectiva en incrementar HDL-C que atorvastatina.<sup>82,83</sup> Las modificaciones oxidativas de las LDL son un evento clave en la formación de la lesión aterosclerótica.<sup>84</sup> En las últimas décadas, se hizo evidente que las HDL poseen propiedades antioxidantes que protegen a las partículas de LDL y de la propia HDL de la oxidación. Durante este proceso, PON 1 asociada a las HDL ha sido postulada como la posible causante de este fenómeno.<sup>38</sup> Los efectos antioxidantes de la atorvastatina fueron atribuidos a su papel como inductora de la actividad de PON1.<sup>85,86</sup> También simvastatina eleva PON1 en pacientes con hipercolesterolemia familiar sin afectar la HDL-C.<sup>87</sup> Sin embargo, dado que la hipercolesterolemia per se reduce la actividad de PON1,<sup>29,87</sup> se pensó que el efecto de simvastatina podría ser secundario a la reducción de la colesterolemia. Otro estudio<sup>88</sup> mostró un incremento significativo (20%) en la actividad y concentración de PON1 en pacientes tratados con simvastatina durante seis semanas. El tratamiento con 20 mg de atorvastatina durante un mes resultó en un incremento de 53% en la actividad de PON1,<sup>89</sup> por lo contrario, otro estudio realizado sobre una mayor cantidad de pacientes con dislipidemia de tipos IIA y IIB, no mostraron ningún efecto luego de cuatro meses de tratamiento.<sup>90</sup> En estudios *in vitro*, la simvastatina aumentó hasta 2,5 veces la actividad del promotor del gen PON1 en forma dosis dependiente en células HepG2 derivadas de un carcinoma hepatocelular humano. La activación ocurrió en una región de 127pb en el extremo proximal del promotor que contenía el polimorfismo C(-108)T.<sup>88</sup> Esta región fue también necesaria para la regulación positiva del promotor PON1 por el factor de transcripción SREBP2 (factor de transcripción llamado proteína que liga al elemento regulado por esterol). SREBP2 está íntimamente ligada al metabolismo del colesterol y se conoce que está estimulada en células HepG2 tratadas con las estatinas atorvastatina, lovastatina o simvastatina. Las tres mostraron la misma respuesta.<sup>91</sup> Contrariamente a estos hallazgos, Gouédard y colaboradores<sup>92</sup> vieron que el tratamiento de células del hepatoma humano HuH-7 con simvastatina, pravastatina o fluvastatina produce una inhibición de hasta 40% de la actividad del promotor. Los niveles del mRNA de la PON1 también fueron reducidos. Ese estudio identificó una región regulatoria cercana al -550 pb que responde a estatinas, en contradicción con los estudios de Deakin y colaboradores<sup>88</sup> en los que se limita este efecto a la región más proximal -200pb. Estas diferencias podrían deberse a que esos

trabajos se realizaron con distintas líneas celulares, aunque los datos de Gouédard y colaboradores<sup>92</sup> además contradicen resultados de estudios clínicos acerca de los efectos de las estatinas sobre PON1. Sin embargo, existen al menos dos estudios en rata que muestran una disminución de la actividad de PON1 como respuesta al tratamiento con estatinas.<sup>93,94</sup> Esta disparidad en los resultados podría ser debida a diferencias en las líneas celulares utilizadas o a la versión del promotor de PON1 estudiado. Evidentemente, se requieren más estudios para clarificar los efectos de las estatinas sobre la expresión del gen PON1.

## Fibratos

Las otras drogas también ampliamente usadas como hipolipemiantes son los fibratos, que han demostrado tener acción sobre triglicéridos y partículas ricas en colesterol. Sus efectos más importantes en la clínica son una significativa reducción de los triglicéridos y un aumento en el HDL-C.<sup>95</sup> Actúan a través de la reducción de la concentración de ácidos grasos libres como sustratos de la formación de triglicéridos y del incremento de la lipólisis de lipoproteínas ricas en triglicéridos.<sup>71</sup> Los efectos de los fibratos sobre la actividad de PON1 son ambiguos. Durrington y colaboradores<sup>96</sup> publicaron que ocho semanas de terapia con bezafibrato y gemfibrozil no modificaron la actividad de paraoxonasa en pacientes con hiperlipidemia del tipo IIb y Tsimihodimos y colaboradores<sup>97</sup> demostraron que tres meses de tratamiento con fenofibrato micronizado no tiene efecto sobre las actividades de paraoxona y arilesterasa en pacientes con dislipemias de los tipos IIa, IIb y IV. Sin embargo, Yesilbursa y colaboradores<sup>98</sup> en pacientes con hiperlipidemia y enfermedad coronaria que fueron evaluados después de dos meses de tratamiento con 250 mg por día de fenofibrato, observaron un incremento significativo de la actividad de paraoxonasa (16%). Turay y colaboradores<sup>99</sup> investigaron el efecto de ciprofibrato sobre la actividad de PON1 en pacientes con hiperlipoproteinemia familiar combinada y encontraron una disminución no significativa en la actividad de PON1. Contrariamente, Paragh y colaboradores<sup>100</sup> previamente habían observado que luego de tres meses de tratamiento con gemfibrozil se aumentaba la actividad de paraoxonasa en pacientes con hipertrigliceridemia y en otro estudio, tres meses de tratamiento con gemfibrozil resultaron en un incremento de la actividad de PON1 en pacientes diabéticos del Tipo 2 con hipertrigliceridemia asociada.<sup>101</sup> Paragh y colaboradores<sup>102</sup> en pacientes con síndrome metabólico, después de tratamiento con ciprofibrato no observaron cambios en la concentración sérica de PON1, pero si en la actividad específica que aumentó significativamente. Además observaron incrementos en las concentraciones de HDL-C y de apoAI. Esta respuesta favorable en la actividad de la enzima al ciprofibrato, también fue observada luego de tratamiento con fenofibrato micronizado y gemfibrozil.<sup>103</sup> Aunque el uso tanto de gemfibrozil como de fenofibrato micronizado, además de producir un favorable perfil lipídico, tienen efectos ventajosos sobre la actividad antioxidante de la PON1 asociada a la HDL.<sup>100,104</sup> Paragh y colaboradores<sup>102</sup> encontraron que el tratamiento con ciprofibrato aumenta

la actividad específica del antioxidante PON1 unida a las HDL, lo que favorece una disminución de las concentraciones de ox-LDL. El tratamiento con fenofibrato microcubierto en pacientes con bajos niveles de HDL-C no solo redujo los lípidos aterogénicos (colesterol total, trigliceridos, ox-LDL-C y lipoproteína y apolipoproteína-B) e incrementó los lípidos ateroprotectores, sino que también aumentó la concentración y actividad de PON1.<sup>105</sup> Gouédard y colaboradores<sup>92</sup> observaron en un estudio *in vitro* en células de un hepatoma humano HuH7 que el ácido fenofíbrico, la forma activa del fenofibrato, incrementó la actividad de arilesterasa de la PON1 y los niveles de su mRNA, duplicando la actividad del promotor del gen. Otros compuestos que como el fenofibrato estimulan la actividad de PPARα,<sup>106</sup> resultaron ser entre pobres e inefficientes inductores, por lo que en la inducción del gen PON1 por fenofibrato no parece intervenir este receptor.<sup>92</sup> Por ejemplo, en un estudio clínico, el gemfibrozil indujo un leve incremento en la actividad de PON1,<sup>101</sup> pero en células HuH7 no mostró ningún efecto sobre el promotor del gen. Por otro lado, el tratamiento de pacientes con fenofibrato micronizado normaliza el perfil lipídico y mejora el estatus antioxidante a través del aumento de la actividad de paraoxonasa<sup>104</sup> mientras que en ratas por el contrario, disminuye la actividad de PON1 plasmática.<sup>107</sup> En ratas con hígado graso, inducido por una dieta rica en fructosa, en las que la actividad de PON1 se encuentra reducida, el tratamiento con bezafibrato produjo un aumento de la actividad de PON1.<sup>108</sup> Regulaciones opuestas en humanos y roedores ya han sido descritas para otros genes como transaminasa<sup>109</sup> y ApoAI<sup>110</sup> y en algunos casos se demostró que estaba relacionado con diferencias en las secuencias de los promotores.

## Otros fármacos

Otros fármacos usados como tratamientos en la aterosclerosis o cardioprotectores, en recientes estudios *in vitro* han mostrado poseer acción inhibitoria de la actividad de PON1. Entre ellos se encuentra digoxina, glucósido cardiotónico inhibidor de la bomba Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> ATPasa en el corazón, el tartrato de metoprolol, bloqueador selectivo del receptor β<sub>1</sub>, verapamilo y diltiazem, bloqueadores de canales de calcio, amiodarona, agente antiarrítmico y metilprednisolona, esteroide sintético, del grupo de los glucocorticoides con propiedades inmunosupresoras y anti-inflamatorias.<sup>111</sup> Además, los antibióticos teicoplanina, rifamicina, tobramicina, ceftriaxona, cefuroxima, ceftazidima, ornidazol y amikacina, también inhiben a la enzima, incluso algunas a muy bajas dosis, por lo que los autores destacan las precauciones que se deben tomar con el uso de estos tratamientos.<sup>112</sup> Y por último también se estudiaron algunos contraceptivos a base de etinil estradiol, desogestrol y levonorgestrel sobre la actividad de PON1 en ratones y se observó que son efectivos en la inhibición de la actividad de PON1 hepático, pero por el contrario aumentan la actividad de PON sérico *in vivo*.<sup>113</sup>

## Conclusiones

PON1 ejerce una fuerte protección frente a las modificaciones oxidativas, que se consideran causantes de las lesiones ateroscleróticas. Además, por su actividad de tiolactonasa detoxifica a la HcyT protegiendo a las

proteínas de la homocisteinilación, factor de riesgo de lesiones vasculares. En consecuencia, las terapéuticas dirigidas a modificar tanto su concentración sérica, como su actividad constituyen una potente herramienta para combatir esta importante enfermedad. En este marco se encuadran las estatinas ya que el aumento del PON1 sérico es uno de sus varios efectos. El incremento de las concentraciones séricas de HDL es también un importante objetivo terapéutico, por su función en el transporte reverso del colesterol, pero también por su asociación física con la PON1, que le aporta su papel como antioxidante. En este punto cumplen una importante función los fibratos ya que aumentan las concentraciones séricas de HDL. Pero otras drogas también han mostrado muy recientemente producir efectos sobre la actividad de esta enzima, uno de los mayores protectores naturales contra las enfermedades vasculares. Entre ellas resultaron ser estimuladoras de su actividad los anticonceptivos esteroideos e inhibidoras algunos antibióticos y cardioprotectores. En todos los casos aún resta aclarar cuáles son sus mecanismos de acción, incluso los relacionados con los de fibratos y estatinas, de los que sólo han sido estudiados algunos aspectos. No debemos olvidar que las modificaciones en el estilo de vida también contribuyen a mejorar PON1 y así disminuir el riesgo de enfermedad vascular. Tabaquismo, falta de actividad física, alimentación pobre en verduras y frutas y alcoholismo, son todos conocidos factores de riesgo de aterosclerosis, que actúan negativamente sobre la concentración y actividad de PON1 sérico. Aún son necesarios más esfuerzos en estudios clínicos prospectivos y experimentales para establecer más y mejores herramientas terapéuticas que actúen sobre esta enzima. Pero también resta responder cuál es el exacto papel biológico que cumple PON1 y establecer si su principal mecanismo de acción es sobre el metabolismo lipídico o su capacidad de hidrolizar HcyT o ambos.

## Referencias

- Fridman O, D'Eramo JL, Finkelstein AE. Homocysteina plasmática: Factor de riesgo independiente de afecciones vasculares oclusivas. Revista Argentina de Cardiología 1997;65:571-581.
- Fridman O. Hiperhomocisteinemia: aterotrombosis y neurotoxicidad. Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam 1999;49:21-30.
- Lawrence de Konig AB, Werstuck GH, Zhou J, et al. Hyperhomocysteinemia and its role in the development of atherosclerosis. Clin Biochem 2003;36:431-441.
- Jakubowski H. Calcium-dependent human serum homocysteine thiolactone hydrolase. A protective mechanism against protein N-homocysteinylation. J Biol Chem 2000;275:3957-3962.
- Jakubowski H. The pathophysiological hypothesis of homocysteine thiolactone-mediated vascular disease. J Physiol Pharmacol 2008;59:155-167.
- Bettowski J. Protein homocysteination: a new mechanism of atherogenesis? Post Hig Med Dosw 2005;59:392-404.
- Perla-Kaján J, Jakubowski H. Paraoxonase 1 protects against protein N-homocysteinylation in humans. FASEB J 2010;24:931-936.
- Mercie P, Garmier O, Lascoste L, et al. Homocysteine thiolactone induces caspase-independent vascular endothelial cell death with apoptotic features. Apoptosis 2000;5:403-411.
- Huang RF, Huang SM, Lin BS, et al. Homocysteine thiolactone induces apoptotic DNA damage mediated by increased intracellular hydrogen peroxide and caspase 3 activation in HL60 cells. Life Sci 2001;68:2799-2811.
- Najib S, Sanchez-Margalef V. Homocysteine thiolactone inhibits insulin signaling and glutathione has a protective effect. J Mol Endocrinol 2001;27:85-91.
- Mazur A. An enzyme in animal tissues capable of hydrolyzing the phosphorus-fluorine bond of alkyl fluorophosphates. J Biol Chem 1946;164:271-289.
- Mackness MI, Mackness B, Durrington PN, et al. Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. Curr Opin Lipidol 1996;7:69-76.
- Lotti M. The pathogenesis of organophosphate polyneuropathy. Crit Rev Toxicol 1991;21:465-487.
- Costa LG, Cole TB, Jarvik GP, et al. Functional genomic of the paraoxonase (PON1) polymorphisms: effects on pesticide sensitivity, cardiovascular disease, and drug metabolism. Annu Rev Med 2003;54:371-392.
- La Du BN. Human serum paraoxonase/arylesterase. In: Pharmacogenetics of drug metabolism, ed. W. Kalow. Pergamon Press, New York; 1992. pp. 51-91.
- Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. FEBS Lett 1991;286:152-154.
- Billecke S, Dragano D, Counsell R, et al. Human serum paraoxonase (PON1) isozymes Q and R hydrolyze lactones and cyclic carbonate esters. Drug Metab Dispos 2000;28:1335-1342.
- Każmierski R, Laciński M. Progress in the research on the genetic factors influencing the development of carotid and cerebral atherosclerosis. Aktualności Neurologiczne 2002;2:8-16.
- Domagala TB, Lacinski M, Trzeciak WH, et al. The correlation of homocysteine-thiolactonase activity of the paraoxonase (PON1) protein with coronary heart disease status. Cell Mol Biol 2006;52:4-10.
- Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, et al. The human serum paraoxonase / arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. Genomics 1996; 33:498-507.
- Kobayashi M, Shinohara M, Sakoh C, et al. Lactone-ring-cleaving enzyme: genetic analysis, novel RNA editing, and evolutionary implications. Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:12787-12792.
- Ng CJ, Wadleigh DJ, Gangopadhyay A, et al. Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. J Biol Chem 2001;276:44444-9.
- Blatter MC, James RW, Messmer S, et al. Identification of a distinct human high-density lipoprotein subspecies defined by a lipoprotein-associated protein, K-45. Identity of K-45 with paraoxonase. Eur J Biochem 1993;211:871-879.
- Deakin S, Leviev I, Gomaraschi M, et al. Enzymatically active paraoxonase-1 is located at the external membrane of producing cells and released by a high affinity, saturable, desorption mechanism. J Biol Chem 2002;277:4301-4308.
- Harel M, Aharoni A, Gaidukov L, et al. Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. Nat Struct Mol Biol 2004;11:412-419.
- Humbert R, Adler DA, Disteche CM, et al. The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. Nat Genet 1993;3:73-76.
- Davies HG, Richter RJ, Keifer M, et al. The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin. Nat Genet 1996;14:334-336.
- Aviram M, Hardak E, Vaya J, et al. Human serum paraoxonase (PON) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions: PON1 esterase and peroxidase-like activities. Circulation 2000;101:2510-2517.
- Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. Paraoxonase and atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2001;21:473-480.
- Brophy VH, Jampska RL, Clendenning JB, et al. Effects of 5' regulatory-region polymorphisms on paraoxonase-gene (PON1) expression. Am J Hum Genet 2001;68:1428-1436.

31. Fortunato G, Rubba P, Panico S, et al. A paraoxonase gene polymorphism, PON 1 (55), as an independent risk factor for increased carotid intima-media thickness in middle-aged women. *Atherosclerosis* 2003;167:141-148.
32. Watzinger N, Schmidt H, Schumacher M, et al. Human paraoxonase 1 gene polymorphisms and the risk of coronary heart disease: a community-based study. *Cardiology* 2002;98:116-122.
33. Martinelli N, Girelli D, Olivieri O, et al. Interaction between smoking and PON2 Ser311Cys polymorphism as a determinant of the risk of myocardial infarction. *Eur J Clin Invest* 2004;34:14-20.
34. Aviram M, Billecke S, Sorenson R, et al. Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulphydryl 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;18:1617-1624.
35. Deakin SP, James RW. Genetic and environmental factors modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase-1. *Clin Sci* 2004;107:435-447.
36. Puhl H, Waeg G, Esterbauer H. Methods to determine oxidation of low-density lipoproteins. *Methods Enzymol* 1994;233:425-441.
37. Watson AD, Berliner JA, Hama SY, et al. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest* 1995;96:2882-2891.
38. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, et al. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest* 1998;101:1581-1590.
39. van Himbergen TM, van Tits LJ, Hectors MP, et al. Paraoxonase-1 and linoleic acid oxidation in familial hypercholesterolemia. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;333:787-793.
40. Rosenblat M, Gaidukov L, Khersonsky O, et al. The catalytic histidine dyad of high density lipoprotein-associated serum paraoxonase-1(PON1) is essential for PON1-mediated inhibition of low density lipoprotein oxidation and stimulation of macrophage cholesterol efflux. *J Biol Chem* 2006;281:7657-7665.
41. Roest M, van Himbergen TM, Barendrecht AB, et al. Genetic and environmental determinants of the PON-1 phenotype. *Eur J Clin Invest* 2007;37:187-196.
42. Miller GJ, Miller NE. Plasma-high-density-lipoprotein concentration and development of ischaemic heart-disease. *Lancet* 1975;1:16-19.
43. Brites F, Zago V, Verona J, et al. HDL capacity to inhibit LDL oxidation in well-trained triathletes. *Life Sci* 2006;78:3074-3081.
44. Shih DM, Gu L, Hama S, et al. Genetic-dietary regulation of serum paraoxonase expression and its role in atherogenesis in a mouse model. *J Clin Invest* 1996;97:1630-1639.
45. Tward A, Xia YR, Wang XP, et al. Decreased atherosclerotic lesion formation in human serum paraoxonase transgenic mice. *Circulation* 2002;106:484-490.
46. Mackness B, Davies GK, Turkie W, et al. Paraoxonase status in coronary heart disease: are activity and concentration more important than genotype? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1451-1457.
47. Sarkar PD, Shivaprakash TM, Madhusudhan B. Association between paraoxonase activity and lipid levels in patients with premature coronary artery disease. *Clin Chim Acta* 2006;373:77-81.
48. Rahmani M, Raiszadeh F, Allahverdian S, et al. Coronary artery disease is associated with the ratio of apolipoprotein A-1/B and serum concentration of apolipoprotein B, but not with paraoxonase enzyme activity in Iranian subjects. *Atherosclerosis* 2002;162:381-9.
49. Mackness B, Durrington P, McElduff P, et al. Low paraoxonase activity predicts coronary events in the Caerphilly Prospective Study. *Circulation* 2003;107:2775-2779.
50. Bhattacharyya T, Nicholls SJ, Topol EJ, et al. Relationship of paraoxonase 1 (PON1) gene polymorphisms and functional activity with systemic oxidative stress and cardiovascular risk. *JAMA* 2008;299:1265-1276.
51. 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;23:461-467.
52. Senti M, Tomás M, Fitó M, et al. Antioxidant paraoxonase 1 activity in the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:5422-5426.
53. Navab M, Hama-Levy S, Van Lenten BJ, et al. Mildly oxidized LDL induces an increased apolipoprotein J/paraoxonase ratio. *J Clin Invest* 1997;99:2005-2019.
54. Otocka-Kmiecik A, Orłowska-Majdak M. The role of genetic (PON1 polymorphism) and environmental factors, especially physical activity, in antioxidant function of paraoxonase. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2009;63:668-677.
55. Cole TB, Jampska RL, Walter BJ, et al. Expression of human paraoxonase (PON1) during development. *Pharmacogenetics* 2003;13:357-364.
56. Senti M, Tomás M, Vila J, et al. Relationship of age-related myocardial infarction risk and Gln/Arg 192 variants of the human paraoxonase1 gene: the REGICOR study. *Atherosclerosis* 2001;156:443-449.
57. Goldhammer E, Ben-Sira D, Zaid G, et al. Paraoxonase activity following exercise-based cardiac rehabilitation program. *J Cardiopulm Rehabil Prev* 2007;27:151-154.
58. Aviram M, Rosenblat M, Billecke S, et al. Human serum paraoxonase (PON1) is inactivated by oxidised low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Radic Biol Med* 1999;26:892-904.
59. Jaouad L, Milochevitch C, Khalil A, et al. PON1 paraoxonase activity is reduced during HDL oxidation and is an indicator of HDL antioxidant capacity. *Free Radic Res* 2003;37:77-83.
60. Aviram M, Dornfeld L, Rosenblat M, et al. Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modification of LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Clin Nutr* 2000;71:1062-1076.
61. Fuhrman B, Aviram M. Preservation of paraoxonase activity by wine flavonoids: possible role in protection of LDL from lipid peroxidation. *Ann NY Acad Sci* 2002;957:321-324.
62. Hayek T, Fuhrman B, Vaya J, et al. Reduced progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice following consumption of red wine, or its polyphenols quercetin or catechin, is associated with reduced susceptibility of LDL to oxidation and aggregation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2744-2752.
63. Nguyen SD, Sok DE. Beneficial effect of oleoylated lipids on paraoxonase 1: protection against oxidative inactivation and stabilization. *Biochem J* 2003;375:275-285.
64. Kudchodkar BJ, Lacko AG, Dory L, et al. Dietary fat modulates serum paraoxonase 1 activity in rats. *J Nutr* 2000;130:2427-2433.
65. Beer S, Moren X, Ruiz J, et al. Postprandial modulation of serum paraoxonase activity and concentration in diabetic and non-diabetic subjects. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2006;16:457-465.
66. Sorenson RC, Bisgaier CL, Aviram M, et al. Human serum Paraoxonase/Arylesterase's retained hydrophobic N-terminal leader sequence associates with HDLs by binding phospholipids: apolipoprotein A-I stabilizes activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:2214-2225.
67. Rao MN, Marmillot P, Gong M, et al. Light, but not heavy alcohol drinking stimulates paraoxonase by upregulating liver mRNA in rats and humans. *Metabolism* 2003;52:1287-1294.
68. Harats D, Ben-Naim M, Dabach Y, et al. Cigarette smoking renders LDL susceptible to peroxidative modification and enhanced metabolism by macrophages. *Atherosclerosis* 1989;79:245-252.

69. James RW, Leviev I, Righetti A. Smoking is associated with reduced serum paraoxonase activity and concentration in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2000;101:2252-2257.
70. Abbott CA, Mackness MI, Kumar S, et al. Serum paraoxonase activity, concentration, and phenotype distribution in diabetes mellitus and its relationship to serum lipids and lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:1812-1818.
71. Grundy SM, Vega GL. Fibrin acids: effects on lipids and lipoprotein metabolism. *Am J Med* 1987;83:9-20.
72. Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, et al. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med* 1995;333:1301-1307.
73. Bellosta S, Via D, Canavesi M, et al. HMG-CoA reductase inhibitors reduce MMP-9 secretion by macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1671-1678.
74. Takemoto M, Liao JK. Pleiotropic effects of 3-hydroxy- 3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1712-1719.
75. Negre-Aminou P, van Vliet AK, van Erck M, et al. Inhibition of proliferation of human smooth muscle cells by various HMG-CoA reductase inhibitors; comparison with other human cell types. *Biochim Biophys Acta* 1997;1345:259-268.
76. Szczeklik A, Undas A, Musial J, et al. Antithrombotic actions of statins. *Med Sci Monit* 2001;7:1381-1385.
77. Dobrucki LW, Kalinowski L, Dobrucki IT, et al. Statin-stimulated nitric oxide release from endothelium. *Med Sci Monit* 2001;7:622-627.
78. Maron DJ, Fazio S, Linton MF. Current perspectives on statins. *Circulation* 2000;101:207-213.
79. Narita Y, Kitazoe Y, Kurihara Y, et al. Increase or decrease of HDL-cholesterol concentrations during pravastatin treatment depending on the pretreatment HDL cholesterol levels. *Eur J Clin Pharmacol* 1997;52:461-463.
80. Stein EA, Lane M, Laskarzewski P. Comparison of statins in hypertriglyceridemia. *Am J Cardiol* 1998;81:66-69.
81. Hoogerbrugge N, Jansen H. Atorvastatin increases low-density lipoprotein size and enhances high-density lipoprotein cholesterol concentration in male, but not in female patients with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 1999;146:167-174.
82. Crouse JR III, Frohlich J, Ose L, et al. Effects of high doses of simvastatin and atorvastatin on high-density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein A-I. *Am J Cardiol* 1999;83:1476-1477.
83. Wierzbicki AS, Lumb PJ, Chik G, et al. Comparison of therapy with simvastatin 80 mg and atorvastatin 80 mg in patients with familial hypercholesterolemia. *Int J Clin Pract* 1999;53:609-611.
84. Ronald S, Keany JF: Role of oxidative modification in atherosclerosis. *Physiol Res* 2004;84:1381-1478.
85. Harangi M, Seres I, Varga Z, et al. Atorvastatin effect on high-density lipoprotein-associated paraoxonase activity and oxidative DNA damage. *Eur J Clin Pharmacol* 2004;60:685-691.
86. Kissai A, Illyés L, Mirdamadi HZ, et al. The effect of atorvastatin therapy on lecithin: cholesterol acyltransferase, cholesteryl ester transfer protein and the antioxidant paraoxonase. *Clin Biochem* 2007;40:1-5.
87. Tomas M, Senti M, Garcia-Faria F, et al. Effect of simvastatin therapy on paraoxonase activity and related lipoproteins in familial hypercholesterolemic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2113-2119.
88. Deakin S, Leviev I, Guernier S, et al. Simvastatin modulates expression of the PON1 gene and increases serum paraoxonase: a role for sterol regulatory element-binding protein-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:2083-2089.
89. Fuhrman B, Koren L, Volkova N, et al. Atorvastatin therapy in hypercholesterolemic patients suppresses cellular uptake of oxidized-LDL by differentiating monocytes. *Atherosclerosis*, 2002;164:179-185.
90. Tsimihodimos V, Karabina SA, Tambaki AP, et al. Atorvastatin preferentially reduces LDL-associated platelet-activating factor acetylhydrolase activity in dyslipidemias of type IIA and type IIB. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:306-311.
91. Scharnagl H, Schinker R, Gierens H, et al. Effect of atorvastatin, simvastatin and lovastatin on the metabolism of cholesterol and triacylglycerides in HepG2 cells. *Biochem Pharmacol* 2001;62:1545-1555.
92. Gouedard C, Koum-Besson N, Barouki R, et al. Opposite regulation of the human paraoxonase-1 gene PON-1 by fenofibrate and statins. *Mol Pharmacol* 2003;63:945-956.
93. Beltowski J, Wojcicka G, Mydlarczyk M, et al. Cerivastatin modulates plasma paraoxonase/arylesterase activity and oxidant-antioxidant balance in the rat. *Pol J Pharmacol* 2002;54:143-150.
94. Beltowski J, Wojcicka G, Jamroz A. Differential effect of 3-hydroxy-3-methylglutarylcoenzyme A reductase inhibitors on plasma paraoxonase 1 activity in the rat. *Pol J Pharmacol* 2002;54:661-671.
95. Guichard JP, Prades Sauron RL. A comparison of the bioavailability of standard or micronized formulations of fenofibrate. *Curr Ther Res* 1993;54:610 (una sola página).
96. Durrington PN, Mackness MI, Bhatnagar D, et al. Effects of two different fibrin acid derivatives on lipoproteins, cholesteryl ester transfer, fibrinogen, plasminogen activator inhibitor and paraoxonase activity in type IIb hyperlipoproteinemia. *Atherosclerosis* 1998;138:217-225.
97. Tsimihodimos V, Kakafika A, Tambaki AP, et al. Fenofibrate induces HDL-associated PAF-AH but attenuates enzyme activity associated with apoB-containing lipoproteins. *J Lipid Res* 2003;44:927-934.
98. Yesilbursa D, Serdar A, Saltan Y, et al. The effect of fenofibrate on serum paraoxonase activity and inflammatory markers in patients with combined hyperlipidemia. *Kardiol Pol* 2005;62:526-530.
99. Turay J, Grnaková V, Valka J. Changes in paraoxonase and apolipoprotein A-I, B, C-III and E in subjects with combined familial hyperlipoproteinemia treated with ciprofibrate. *Drug Exp Clin Res* 2000;26:83-88.
100. Paragh G, Balogh Z, Seres I, et al. Effect of gemfibrozil on HDL-associated serum paraoxonase activity and lipoprotein profile in patients with hyperlipidaemia. *Clin Drug Invest* 2000;19:277-282.
101. Balogh Z, Seres I, Harangi M, Kovacs et al. Gemfibrozil increases paraoxonase activity in type 2 diabetic patients: a new hypothesis of the beneficial action of fibrates? *Diabetes Metab* 2001;27:604-610.
102. Paragh G, Seres I, Harangi M, et al. Ciprofibrate increases paraoxonase activity in patients with metabolic syndrome. *Br J Clin Pharmacol* 2006; 61:6:694-701.
103. Schierf G, Shwat M, Feuerborn E. Biliary and plasma lipids and lipid-lowering chemotherapy. Studies with clofibrate, fenofibrate and etofibrate in healthy volunteers. *Atherosclerosis* 1980; 36:323-329.
104. Paragh G, Seres I, Harangi M, et al. The effect of micronised fenofibrate on paraoxonase activity in patients with coronary heart disease. *Diabetes Metab* 2003;29:613-618.
105. Phuntuwate W, Suthisang C, Koanantakul B, et al. Effect of fenofibrate therapy on paraoxonase1 status in patients with low HDL-C levels. *Atherosclerosis* 2008;196:122-128.
106. Staels B, Dallongeville J, Auwerx J, et al. Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. *Circulation* 1998;98:2088-2093.
107. Beltowski J, Wojcicka G, Mydlarczyk M, et al. The effect of peroxisome proliferator-activated receptors α (PPAR $\alpha$ ) agonist, fenofibrate, on lipid peroxidation, total antioxidant capacity, and plasma paraoxonase 1 (PON 1) activity. *J Physiol Pharmacol* 2002;53:463-475.

108. Ackerman Z, Oron-Herman M, Rosenthal T, et al. Effects of amlodipine, captopril, and bezafibrate on oxidative milieu in rats with fatty liver. *Dig Dis Sci* 2008;53:777-784.
109. Edgar AD, Tomkiewicz C, Costet P, et al. Fenofibrate modifies transaminase gene expression via a peroxisome proliferator activated receptor alpha-dependent pathway. *Toxicol Lett* 1998;98:13-23.
110. Vu-Dac N, Chopin-Delannoy S, Gervois P, et al. The nuclear receptors peroxisome proliferators activated receptor and Rev-erb mediate the species-specific regulation of apolipo protein A-I expression by fibrates. *J Biol Chem* 1998;273:25713-25720.
111. İşgör MM, Beydemir S. Some cardiovascular therapeutics inhibit paraoxonase 1 (PON1) from human serum. *Eur J Pharmacol* 2010;645:135-142.
112. Ekinci D, Beydemir S. Evaluation of the impacts of antibiotic drugs on PON 1; a major bioscavenger against cardiovascular diseases. *Eur J Pharmacol* 2009;617:84-89.
113. Kiranoglu S, Sinan S, Gencer N, et al. In vivo effects of oral contraceptives on paraoxonase, catalase and carbonic anhydrase enzyme activities on mouse. *Biol Pharm Bull* 2007;30:1048-1051.