

O SNP p.Q192R da *PON1* não Parece Associar-se a Fatores de Risco para a Aterosclerose Carotídea em Amostra de População Brasileira Normolipidêmica e Assintomática

p.Q192R SNP of PON1 seems not to be Associated with Carotid Atherosclerosis Risk Factors in an Asymptomatic and Normolipidemic Brazilian Population Sample

Daniel Zanetti Scherrer¹, Vanessa Helena de Souza Zago¹, Isabela Calanca Vieira¹, Eliane Soler Parra¹, Natália Baratella Panzoldo¹, Fernanda Alexandre¹, Rodrigo Secolin², Jamal Baracat³, Eder Carlos Rocha Quintão⁴, Eliana Cotta de Faria¹

Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas – Departamento de Patologia Clínica¹; Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas – Departamento de Genética Médica²; Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas – Departamento de Radiologia³; Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Médicas – Laboratório de Lipídeos (LIM10)⁴, São Paulo, SP – Brasil

Resumo

Fundamentos: Evidências sugerem que a paraoxonase 1 (*PON1*) confere importantes propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias quando associada à lipoproteína de alta densidade (HDL).

Objetivo: Investigar as relações entre o SNP p.Q192R da *PON1*, parâmetros bioquímicos e aterosclerose carotídea em uma amostra populacional brasileira assintomática e normolipidêmica.

Métodos: Foram estudados 584 voluntários (mulheres, n = 326; homens, n = 258; idade entre 19-75 anos). Foi extraído DNA genômico total e o SNP foi detectado na plataforma de genotipagem TaqMan® SNP OpenArray® (Applied Biosystems, Foster City, CA). Foram dosadas lipoproteínas e apolipoproteínas plasmáticas, e a atividade da *PON1* foi medida utilizando-se paraoxon como substrato. Foi utilizada ultrassonografia bidimensional de alta resolução para determinar a espessura íntimo-medial das artérias carótidas (EIMc) e a presença de placas ateroscleróticas carotídeas em um subgrupo de indivíduos (n = 317).

Resultados: A presença de p.192Q esteve associada a um aumento significativo da atividade da *PON1* (RR = 12,30 (11,38); RQ = 46,96 (22,35); QQ = 85,35 (24,83) μmol/min; p < 0,0001), HDL-C (RR = 45 (37); RQ = 62 (39); QQ = 69 (29) mg/dL; p < 0,001) e apo A-1 (RR = 140,76 ± 36,39; RQ = 147,62 ± 36,92; QQ = 147,49 ± 36,65 mg/dL; p = 0,019). A análise de regressão *stepwise* mostrou que heterozigotos e portadores de p.192Q influenciaram 58% da atividade da *PON1* em relação ao paraoxon. A análise de regressão linear univariada demonstrou que não houve associação entre o SNP p.Q192R e a EIMc média; como resultado, na análise de regressão múltipla nenhuma variável foi selecionada com 5% de significância. Os parâmetros estudados não se associaram à presença de placas carotídeas na análise de regressão logística.

Conclusão: Em indivíduos de baixo risco, a presença da variante p.192Q da *PON1* mostrou-se associada a um perfil lipídico plasmático benéfico e à ausência de aterosclerose de carótida. (Arq Bras Cardiol. 2015; 105(1):45-52)

Palavras-chave: Paraoxonase-1/genética; Polimorfismo Genético; Doenças das Artérias Carótidas/fisiopatologia; Lipoproteínas HDL.

Abstract

Background: Evidences suggest that paraoxonase 1 (*PON1*) confers important antioxidant and anti-inflammatory properties when associated with high-density lipoprotein (HDL).

Objective: To investigate the relationships between p.Q192R SNP of *PON1*, biochemical parameters and carotid atherosclerosis in an asymptomatic, normolipidemic Brazilian population sample.

Methods: We studied 584 volunteers (females n = 326, males n = 258; 19-75 years of age). Total genomic DNA was extracted and SNP was detected in the TaqMan® SNP OpenArray® genotyping platform (Applied Biosystems, Foster City, CA). Plasma lipoproteins and apolipoproteins were determined and *PON1* activity was measured using paraoxon as a substrate. High-resolution β-mode ultrasonography was used to measure cIMT and the presence of carotid atherosclerotic plaques in a subgroup of individuals (n = 317).

Results: The presence of p.192Q was associated with a significant increase in *PON1* activity (RR = 12.30 (11.38); RQ = 46.96 (22.35); QQ = 85.35 (24.83) μmol/min; p < 0.0001), HDL-C (RR = 45 (37); RQ = 62 (39); QQ = 69 (29) mg/dL; p < 0.001) and apo A-I (RR = 140.76 ± 36.39; RQ = 147.62 ± 36.92; QQ = 147.49 ± 36.65 mg/dL; p = 0.019). Stepwise regression analysis revealed that heterozygous and p.192Q carriers influenced by 58% *PON1* activity towards paraoxon. The univariate linear regression analysis demonstrated that p.Q192R SNP was not associated with mean cIMT; as a result, in the multiple regression analysis, no variables were selected with 5% significance. In logistic regression analysis, the studied parameters were not associated with the presence of carotid plaques.

Conclusion: In low-risk individuals, the presence of the p.192Q variant of *PON1* is associated with a beneficial plasma lipid profile but not with carotid atherosclerosis. (Arq Bras Cardiol. 2015; 105(1):45-52)

Keywords: Paraoxonase-1/genetics; Polymorphism, genetic; Carotid Artery Diseases/physiopathology; Lipoproteins, HDL.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Daniel Zanetti Scherrer •

R. Tessália Vieira de Camargo, 126. Cidade Universitária "Zeferino Vaz" CEP 13083-887. Campinas, SP – Brasil.

E-mail: zanettis@hotmail.com

Artigo recebido em 16/10/14; revisado em 12/01/15; aceito em 19/01/15.

Introdução

A paraoxonase 1 (PON1-OMIM 168820) humana é uma esterase sérica cálcio-dependente composta de 354 aminoácidos, com peso molecular de 43kDa e codificada no cromossomo 7q21. A PON1 liga-se à lipoproteína de alta densidade (HDL) por meio da interação do N-terminal hidrofóbico com fosfolípidos e a apolipoproteína A-1 (apo A-1)¹, conferindo importantes propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias à HDL².

Estudos anteriores sugerem que a atividade da PON1 pode influenciar a concentração de HDL-C, provavelmente devido ao envolvimento da PON1 na proteção contra oxidação da HDL³. Além disso, a PON1 está presente em partículas de HDL pequenas e densas⁴, indicando que há uma relação entre a atividade de PON1 e o tamanho do HDL⁵.

A relação entre a atividade da PON1 e o risco de doença arterial coronariana (DAC) em humanos tem sido documentada entre várias etnias populacionais; assim, duas meta-análises confirmaram a associação de uma menor atividade da PON1 com aumento do risco de DAC, independentemente da idade e da etnia^{6,7}.

A atividade da PON1 está sob regulação genética e ambiental, havendo ampla variação entre indivíduos e populações⁸. O SNP rs662 encontrado na região codificadora leva a uma substituição da glutamina (CAA) por arginina (CGA) na posição 192 (p.Q192R)⁹. Além de seus efeitos sobre a atividade enzimática, foram realizados vários estudos para elucidar a relação entre SNP e doença cardiovascular (DCV) estabelecida em diferentes populações. A frequência da variante p.192R mostrou-se aumentada em grupos com DCV de populações de japoneses, brancos e asiáticos-indianos¹⁰⁻¹². No entanto, essas associações não foram encontradas em populações de turcos e finlandeses^{13,14}.

Na população brasileira, a distribuição do SNP p.Q192R varia entre grupos étnicos¹⁵; além disso, há controvérsias acerca do impacto da variante p.192R sobre DCV estabelecida¹⁶⁻¹⁸. Ademais, não há estudos em nossa população correlacionando SNP ao risco de DCV em indivíduos assintomáticos; de fato, são raros os estudos associando o polimorfismo a aterosclerose carotídea em indivíduos saudáveis¹⁹.

Frente aos resultados obtidos em estudos realizados em diferentes grupos étnicos e à escassez de estudos em populações de baixo risco, investigamos as relações do SNP p.Q192R da *PON1* com parâmetros bioquímicos e aterosclerose carotídea em uma população brasileira assintomática e normolipidêmica.

Métodos

População do estudo

Este estudo incluiu 584 indivíduos selecionados entre 1536 voluntários normolipidêmicos e assintomáticos de ambos os sexos, com idade de 19 a 75 anos que haviam sido submetidos a check-ups de saúde gratuitos em centros de atendimento primário à saúde entre 2008 e 2012 nas cidades de Campinas e Americana (Estado de São Paulo, Brasil), como anteriormente descrito por Parra e cols.²⁰.

À admissão, os indivíduos foram submetidos a uma avaliação clínica completa e responderam a um questionário detalhado para fornecer dados sobre antecedentes familiares de doença arterial coronariana precoce (definida como a ocorrência de eventos agudos e/ou óbito em parentes de primeiro grau), estado de saúde pregresso e atual, hábitos alimentares e de atividades físicas, consumo de álcool e cigarro, e medicações. Os hábitos de atividades físicas foram avaliados por meio de um questionário adaptado de Baecke e cols.²¹, consistindo de 16 perguntas que incluem 3 índices de atividades físicas habituais nos últimos 12 meses, definidas como (i) índice de atividade física ocupacional ou laboral; (ii) índice de exercício físico no tempo livre; e (iii) índice de atividade física no tempo livre e de locomoção. Além disso, os hábitos alimentares foram avaliados através de um questionário de frequência alimentar (classificada como diária, semanal ou mensal/nenhum consumo) adaptado de Furlan-Viebig e Pastor-Valero²², das 10 seguintes classes de alimentos: (i) leite e derivados; (ii) carne, peixe e ovos; (iii) legumes; (iv) frutas; (v) sucos naturais; (vi) pães, cereais e tuberosas; (vii) óleos e gorduras; (viii) doces, lanches e guloseimas; (ix) bebidas não alcoólicas e (x) preparações e outros.

Os critérios de exclusão foram o uso regular de medicamentos, especialmente aqueles que interferem com o metabolismo dos lipídeos, como as estatinas, terapia de reposição hormonal e contraceptivos. As medicações permitidas no protocolo incluíram: (1) vitaminas, suplementos nutricionais e homeopatia; (2) antidepressivos; (3) analgésicos (uso esporádico); (4) antialérgicos e inibidores de bomba de prótons e (5) duas ou mais das medicações mencionadas associadas. Foram também excluídos os voluntários portadores de disfunção de tireoide, dislipidemia, diabetes mellitus, síndrome metabólica, obesidade, gravidez, hipertensão arterial, doenças do fígado, pulmões ou rins, uso abusivo de álcool (> 14g/dia) e tabagistas.

Foram coletadas amostras de sangue venoso após um período de 12 horas de jejum para separação de soro e plasma EDTA por centrifugação (4°C, 1000 x g, 10 minutos), com posterior armazenamento a -80°C até a análise. Em outra consulta, os voluntários foram submetidos a ultrassonografia de carótidas.

O Comitê de Ética em Ciências Médicas da Universidade de Campinas aprovou o estudo e todos os voluntários assinaram o termo de consentimento.

Análise bioquímica

Foram analisadas amostras frescas de soro para colesterol total, HDL-C, triglicérides e glicose no aparelho Modular Analytics® EVO (Roche Diagnostics, Burgess Hill, West Sussex, Reino Unido) utilizando-se reagentes da Roche Diagnostics® (Mannheim, Alemanha). As apolipoproteínas A-1 e B foram dosadas por nefelometria no sistema automatizado BN II (Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Alemanha) por meio de ensaios disponíveis comercialmente (Dade-Boehringer®, Deerfield, Illinois, EUA). O colesterol lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) foi calculado pela fórmula de Friedewald²³, enquanto que o colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade foi calculado pela fórmula triglicérides/5²¹.

A proteína C reativa (PCR) por dosada por imunoturbidimetria com método ultrasensível (PCR-us), através do ensaio comercialmente disponível Tina-quant CRP (Látex) HS-Roche (Roche Diagnostics®, Mannheim, Alemanha).

O tamanho das partículas de HDL foi medido pela técnica de *dynamic light scattering* (DLS) após precipitação química das lipoproteínas contendo apo B em amostras de plasma, utilizando-se polietilenoglicol (PEG) 8000 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA)²⁴. As medidas foram feitas três vezes no equipamento Nanotrak Particle Size Analyzer (Microtrak, North Largo, Florida, EUA), sendo utilizada como padrão uma nanopartícula polimérica de 100nm; uma amostra controle obtida do mesmo indivíduo foi utilizada em todas as medidas.

Foi determinada a atividade plasmática da proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP) e da proteína de transferência de fosfolipídios (PLTP) por ensaios radiométricos utilizando substratos exógenos^{25,26}. Além disso, mediu-se a atividade da PON-1 usando o paraoxon (dietyl-p-nitrofenilfosfato, Sigma, St. Louis, MO, EUA) como substrato²⁷.

Genotipagem do SNP

Foi extraído o DNA genômico total de células mononucleares de sangue periférico, de acordo com a técnica padrão fenol/clorofórmio. Foram analisadas a qualidade, integridade e concentração das amostras de DNA, tendo sido essas amostras armazenadas a -20 °C antes de serem utilizadas.

Foi feita análise genotípica para SNP p.Q192R da *PON1* na plataforma OpenArray® Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA), conforme o protocolo padrão do fabricante. Os genótipos foram determinados através do software TaqMan® Genotyper 1.0.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os indivíduos com genótipo GG foram designados como RR (homozigotos p.192R), enquanto os com genótipo AA foram denominados QQ (homozigotos p.192Q), e os com genótipo GA (heterozigotos) foram chamados de RQ.

Medidas da espessura íntimo-medial das artérias carótidas (EIMc)

Todos os voluntários foram convidados a serem submetidos a medidas da “espessura da íntimo-medial das artérias carótidas, tendo o exame sido realizado em um subgrupo de 316 indivíduos. A ultrassonografia de carótida foi realizada por apenas um ultrassonografista treinado, que desconhecia os sujeitos do estudo. Foi realizada ultrassonografia bidimensional de alta resolução através de um sistema de imagens de ultrassom com matriz linear de 6-9 MHz (Sistema de Ultrassom ATL HDI 1500 e 3500, Advanced Technology Laboratories Ultrasound, Bothell, EUA) sendo feitas medidas longitudinais de segmentos das artérias carótidas comuns na parede distal e a 1 cm da bifurcação. A EIMc média foi calculada com base na média de 5 medidas dos lados direito e esquerdo e expressa em milímetros (mm), sendo também determinada a presença de placas nas carótidas.

Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas nos softwares SPSS 16.0 (SPSS Inc., EUA) e R (R Development Core Team, Viena,

Áustria). Determinou-se a normalidade de distribuição das variáveis pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados normais foram representados como média \pm desvio padrão e, os não-normais, como mediana (intervalo interquartil).

As comparações entre os genótipos foram realizadas através da ANOVA ou do teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Bonferroni para dados normais e não normais, respectivamente. Além disso, foi realizado o teste do qui quadrado para variáveis categóricas. Quando necessário, as comparações foram ajustadas para idade, sexo e índice de massa corpórea (IMC) através da ANCOVA.

Foram feitas análises de regressão *stepwise* para verificar os principais determinantes da atividade da *PON1*, tendo sido incluídas as variáveis idade, sexo, IMC, tamanho da partícula do HDL, CETP, PLTP e SNP p.Q192R da *PON1*.

Análises de regressão linear univariada e multivariada controladas para idade, sexo e IMC foram feitas para avaliar a influência do HDL-C, apo A-1, tamanho da partícula do HDL, PCR-us, atividade da *PON1* e do SNP p.Q192R sobre a EIMc média. Além disso, a análise de regressão logística determinou a razão das chances (RC) para a presença de placas carótídeas de acordo com HDL-C, apo A-1, tamanho da partícula de HDL, PCR-us, atividade da *PON1* e SNP p.Q192R, também controlada por idade, sexo e IMC. Foi utilizado o software G*Power para avaliar se a amostra tinha poder estatístico para detectar associações, de acordo com os seguintes parâmetros: RC = 1,5; nível de significância α = 0,008 (ajustado para múltiplas comparações); bicaudal; poder estatístico $1-\beta$ = 80%. Desta forma, a amostra apresentou, respectivamente, 99,9% e 54,98% de poder estatístico para regressão linear múltipla e análise de regressão logística.

Valores de $p < 0,05$ (corrigidos por Bonferroni para testes múltiplos) foram considerados estatisticamente significantes.

Resultados

A população do estudo foi composta de 56% de mulheres e 44% de homens, e a frequência genotípica foi de 37%, 45% e 19% para os grupos RR, RQ e QQ, respectivamente. O SNP p.Q192R mostrou-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Ademais, todos os voluntários eram assintomáticos, não fumantes, sem relatos atuais ou progressos de disfunção de tireoide, dislipidemias, diabetes mellitus ou outras endocrinopatias; não apresentavam gravidez, obesidade, síndrome metabólica, hipertensão arterial, nem doenças do fígado, pulmões ou rins.

As características clínicas e bioquímicas foram descritas e comparadas entre os genótipos, como mostrado na Tabela 1. Os voluntários do grupo QQ apresentaram aumento importante da atividade da *PON1*, do colesterol total, HDL-C e apo A-1 em comparação com os dos grupos RQ e RR. Não foram observadas diferenças significativas em relação a todos os outros parâmetros bioquímicos, EIMc média, presença de placas, antecedente familiar de DAC precoce, consumo de álcool, uso de medicações e índices de atividade física. Além disso, as frequências (diária, semanal e mensal/nenhum consumo) das 10 classes de alimentos estudadas não foram significativamente diferentes entre os genótipos, como mostram os dados a seguir: leite e derivados ($p = 0,716$);

Tabela 1 – Análises descritiva e comparativa dos parâmetros clínicos, antropométricos e bioquímicos entre os genótipos da p.Q192R da PON1

Parâmetros	RR (n = 215)	RQ (n = 260)	QQ (n = 109)	p
Sexo (Feminino/Masculino)	112/103	153/107	61/48	-
Idade (anos)	45 (23)	44 (27)	46 (17)	-
IMC (kg/m ²)	23,6 ± 2,8	23,4 ± 2,9	24,5 ± 2,9	-
Circunferência da cintura (cm)	78 (15)	76 (13)	74 (10)	0,413
PAS (mmHg)	120 (15)	120 (20)	120 (20)	0,334
PAD (mmHg)	80 (10)	80 (14)	80 (8)	0,260
Colesterol total (mg/dL)	170 ± 32	174 ± 29	176 ± 30	0,044†
HDL-C (mg/dL)	45 (37)	62 (39)	69 (29)	< 0,001†‡
Tamanho do HDL (nm)	7,85 (0,91)	8,00 (1,02)	8,06 (0,88)	0,467
Triglicérides (mg/dL)	77 (43)	74 (45)	64 (33)	0,054
LDL-C (mg/dL)	100 ± 26	101 ± 23	101 ± 22	0,550
VLDL-C (mg/dL)	15 (8)	15 (9)	13 (7)	0,069
Apo A-1 (mg/dL)	140,76 ± 36,39	147,62 ± 36,92	147,49 ± 36,65	0,019†
Apo B (mg/dL)	76,37 ± 19,64	76,80 ± 17,11	75,54 ± 18,72	0,472
CETP (%)	13,55 ± 5,45	13,38 ± 5,92	13,20 ± 5,24	0,616
PLTP (nmolesCL/mL/h)	6321 (3074)	6086 (2253)	6088 (2393)	0,414
PON1 (µmol/min)	12,30 (5,90)	46,95 (22,35)	85,35 (21,18)	< 0,001†‡
Glicose (mg/dL)	84 (12)	83 (10)	84 (9)	0,499
PCR-us (mg/L)	0,80 (1,00)	0,80 (1,13)	0,90 (1,65)	0,231
EIMc média (mm)	0,60 (0,20)	0,60 (0,30)	0,58 (0,15)	0,207
Placas carotídeas (Sim/Não, %)	19/81	18/82	11/89	0,712
Antecedente familiar de DAC precoce (Sim/Não, %)	7/30	6/39	6/15	0,659
Consumo de álcool (Moderado/Nenhum, %)	7/31	9/36	3/14	0,503
Medicações (Sim/Não, %)	5/31	8/37	3/16	0,903
Índice de atividade física ocupacional ou laboral	2,75 (1,00)	2,75 (0,87)	2,87 (0,62)	0,493
Índice de atividade física no tempo livre	2,00 (1,00)	2,00 (1,25)	2,00 (1,50)	0,913
Índice de atividade no tempo livre e locomoção	2,50 (1,00)	2,50 (1,00)	2,50 (1,00)	0,998

(n): número de indivíduos ou como mostrado abaixo; IMC: índice de massa corpórea; PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-C: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade; Apo: apolipoproteína; PCRus: proteína C reativa ultrasensível; CETP: proteína de transferência de colesterol esterificado; PLTP: proteína de transferência de fosfolípidios; CL: colesterol livre; PON1: paraoxonase 1; DAC: doença arterial coronariana; EIMc: espessura íntimo-medial de artérias carótidas; RR (119), RQ (132), QQ (66). Dados normais e não normais são apresentados como média ± desvio padrão e mediana (intervalo interquartil), respectivamente. Valores de p - ANOVA ou Kruskal-Wallis, ajustados por ANCOVA para idade, sexo e IMC; diferenças significantes ($p \leq 0,05$) por teste de Bonferroni foram marcadas com *RR≠RQ; †RR≠QQ; ‡QQ≠RQ.

carne, peixe e ovos ($p = 0,269$); legumes ($p = 0,766$); frutas ($p = 0,198$); sucos naturais (0,412); pães, cereais e tuberosas (0,136); óleos e gorduras ($p = 0,435$); doces, lanches e guloseimas ($p = 0,545$); bebidas não alcoólicas ($p = 0,454$) e preparações e outros ($p = 0,874$).

A atividade da PON1 plasmática foi influenciada apenas pelos genótipos QQ ($R^2 = 39\%$) e RQ ($R^2 = 19\%$), como mostra a Tabela 2. Portanto, outros fatores não estudados têm uma influência de 42%.

A análise de regressão linear univariada demonstrou que os parâmetros estudados, incluindo o SNP p.Q192R, não se associaram à EIMc média, como mostra a Tabela 3. Assim, não foram selecionadas variáveis com 5% de significância na análise de regressão múltipla. Ademais, os parâmetros estudados não

se associaram à presença de placas pela análise de regressão logística, como mostra a Tabela 4.

Discussão

Estudos realizados em diferentes grupos étnicos têm relatado diferentes distribuições das variantes p.192Q e p.192R. A variante p.192Q tem sido descrita com maior frequência em brancos²⁸ e a p.192R, em populações de japoneses, chineses e hispânicos²⁹⁻³¹. Além disso, as frequências já foram exploradas anteriormente em uma amostra populacional brasileira na qual foram demonstradas diferenças significantes entre os genótipos relacionados a descendentes de europeus e afro-brasileiros¹⁵. Em nosso

Tabela 2 – Análise de regressão stepwise para atividade de PON1 na população do estudo

Parâmetros	R ²	R ² acumulado	F	p
QQ	0,3876	0,3876	193,7	< 0,0001
RQ	0,1918	0,5794	210,1	< 0,0001
Fatores não estudados	0,4206			

R²: coeficiente de determinação. As variáveis analisadas seguindo os critérios stepwise são idade, sexo (feminino x masculino), índice de massa corpórea, colesterol total, HDL-C, tamanho da partícula de HDL, CETP, PLTP e SNP p.Q192R. O genótipo RR foi usado como grupo de referência.

Tabela 3 – Análise de regressão múltipla univariada para EIMc na população do estudo

Regressão linear univariada (n = 310)				
Parâmetros	Estimativa	EP	p	R ²
p.Q192R (RR x QQ)	0,55	8,86	0,951	0,001
p.Q192R (QQ x RQ)	-17,26	10,57	0,104	0,005
HDL-C	0,04	0,21	0,845	< 0,0001
Apo A-1	0,08	0,12	0,482	< 0,0001
Tamanho da partícula de HDL	0,92	6,96	0,895	< 0,0001
PCRus	0,52	0,87	0,554	< 0,0001
Atividade da PON1	-0,08	0,14	0,548	< 0,0001
Análise de regressão linear múltipla (n = 310)				
Variável independente	Variável dependente	Estimativa	p	R ²
EIMc média	-	-	-	-

As variáveis foram transformadas em ranks, devido à ausência de distribuição normal e as análises foram controladas para idade, sexo e IMC. EP: erro padrão; R²: coeficiente de determinação; HDL-C: colesterol lipoproteína de alta densidade; apo: apolipoproteína; PCRus: proteína C reativa ultrasensível; PON1: paraoxonase 1; EIMc: espessura íntimo-medial de artérias carótidas.

Tabela 4 – Análise de regressão logística para a presença de placas ateroscleróticas carotídeas na população do estudo

Regressão logística univariada (n = 308)					
Parâmetros	Estimativa	EP	p	RC	IC 95%
p.Q192R (RR x QQ)	0,270	0,471	0,567	1,310	0,520; 3,303
p.Q192R (QQ x RQ)	0,266	0,464	0,566	1,305	0,526; 3,241
HDL-C	-0,002	0,009	0,777	0,997	0,980; 1,015
Apo A-1	0,003	0,004	0,486	1,003	0,994; 1,012
Tamanho da partícula de HDL	-0,370	0,299	0,216	0,691	0,384; 1,241
PCRus	-0,032	0,040	0,418	0,968	0,895; 1,047
Atividade da PON1	-0,005	0,005	0,334	0,994	0,983; 1,006
Análises logísticas múltiplas (n = 308)					IC 95%
Variável independente	Variável dependente	Estimativa	p	RC	IC 95%
Placas de carótida	-	-	-	-	-

As variáveis foram transformadas em ranks devido à ausência de distribuição normal e as análises foram controladas para idade, sexo e IMC. EP: erro padrão; RC: razão das chances; IC: intervalo de confiança; HDL-C: colesterol lipoproteína de alta densidade; apo: apolipoproteína; PCRus: proteína C reativa ultrasensível; PON1: paraoxonase 1.

estudo, a variante p.192R representa 59% do total da amostra e a p.192Q, 41%, semelhante às frequências observadas na população afro-brasileira¹⁵.

Foram identificados vários SNPs em diferentes regiões da *PON1*, incluindo o aminoácido 192, que é um dos mais frequentemente estudados para identificar a influência sobre a atividade enzimática e doença cardiovascular³². No presente estudo, demonstramos que a variante p.192Q modula significativamente a atividade da *PON1* e os níveis de apo A-1, colesterol e HDL-C.

Variações genéticas causam impacto importante na atividade catalítica da *PON1*. De fato, o aminoácido 192 é um sítio ativo importante da enzima, constituindo parte da superfície de ancoragem à HDL³³. Estudos sobre o impacto de p.Q192R na atividade hidrolítica demonstraram que a variante p.192R tem maior atividade em relação ao paraoxon e ao fenilacetato em comparação com p.192Q⁸. Apesar disso, neste estudo, a p.192Q mostrou-se associada à atividade aumentada em relação ao paraoxon, sendo que a análise de regressão *stepwise* sugere que 58% da atividade da *PON1* foi determinada por esta variante.

Há evidências da associação de maior atividade da *PON1* com níveis aumentados de HDL-C³. De fato, Blatter Garin e cols.³⁴ observaram correlações positivas entre a atividade da *PON1* e níveis de HDL-C e apo A-1 em uma população com doença arterial coronariana confirmada e em indivíduos controles. No entanto, o SNP p.Q192R da *PON1* não se associou às concentrações apo A-1 e HDL-C nos dois grupos. Por outro lado, nosso estudo mostrou que a variante p.192Q é um fator preditivo significativo de níveis aumentados de apo A-1 e HDL-C em indivíduos assintomáticos e normolipidêmicos.

Atividade de *PON1* plasmática diminuída tem sido positivamente associada a um risco aumentado de DCV, independentemente da idade e etnia, como relatado por vários estudos, incluindo meta-análises^{6,7}. Neste contexto, vários relatos clínicos se concentraram no papel dos polimorfismos da *PON1* que afetam diretamente a atividade da *PON1* nas DCV³⁵⁻³⁷. Em uma meta-análise incluindo 88 estudos, Wang e cols.³⁵ demonstraram que indivíduos portadores da variante p.192R apresentavam um risco de DCV maior do que aqueles portadores da variante p.192Q da *PON1*; no entanto, outros estudos ainda mostram controvérsias sobre o papel desses alelos. De fato, houve uma forte associação entre a variante p.192R e acidente vascular cerebral isquêmico, mas o risco se restringiu aos indivíduos da cor branca³⁶; além disso, Birjmohun e cols.³⁷ demonstraram que o SNP p.Q192R da *PON1* não previu o risco de DCV em indivíduos do estudo de coorte EPIC-Norfolk.

O impacto do SNP p.Q192R também foi investigado em amostras populacionais brasileiras. Rios e cols.¹⁶ estudaram ambos os SNPs p.Q192R e p.M55L da *PON1* em 712 pacientes, sendo 437 brancos e 275 afro-brasileiros com DAC estabelecida (lesões obstrutivas maiores que 50%). O SNP p.Q192R não se associou à DAC; no entanto, apenas em homens brancos o genótipo RR levou a uma queda nos níveis de HDL-C. Oliveira e cols.¹⁷ também determinaram a influência dos SNPs p.Q192R e p.M55L em 352 pacientes

com DAC definida angiograficamente e em 380 controles com alto risco de DAC pareados por idade e sexo. De forma semelhante, não foram encontradas associações significantes entre o SNP p.Q192R e DAC. Além disso, Voetsh e cols.¹⁸ avaliaram a associação dos SNPs p.Q192R e p.M55L com o risco de acidente vascular cerebral (AVC) isquêmico em 118 pacientes (com um primeiro AVC não fatal ocorrendo antes dos 45 anos de idade) e 118 controles pareados por idade e sexo. O genótipo RR foi mais frequente nos pacientes com AVC isquêmico e mostrou-se independentemente associado ao risco da doença. Neste contexto, a população brasileira apresenta relações controversas relacionadas ao SNP p.Q192R e doença cardiovascular.

Além dos relatos envolvendo o papel da p.Q192R da *PON1* na doença cardiovascular, estudos anteriores realizados em estados patológicos (especialmente diabetes e/ou hipercolesterolemia) mostraram resultados inconsistentes em relação às associações entre SNP p.Q192R e EIMc³⁸⁻⁴⁰, um marcador substituto de aterosclerose coronariana⁴¹.

Em relação à associação da EIMc com p.Q192R em indivíduos hígidos, Dessi e cols.¹⁹ observaram um aumento da EIMc na variante p.192R, embora não significativo entre os genótipos. Ademais, Karvonen e cols.⁴² não observaram diferenças significativas em relação à EIMc em uma grande coorte de indivíduos hipertensos e controles. De forma análoga, em nosso estudo, há uma falta de associações de p.Q192R com EIMc e placas ateroscleróticas de carótida, o que sugere fortemente que este SNP, em indivíduos de baixo risco, não é um parâmetro importante associado à aterosclerose de carótidas.

Os resultados devem ser interpretados com cautela, uma vez que há limitações a serem abordadas, tais como o tamanho amostral relativamente pequeno devido ao desenho do estudo, especialmente em relação aos rigorosos critérios de inclusão e exclusão. Além disso, o número de voluntários que compareceram ao exame de EIM da carótida não foi suficiente para atingir um poder estatístico mínimo (80%) para a análise de regressão logística, uma vez que o tamanho amostral previsto para atender a esta condição era de 480 indivíduos. Ademais, a baixa adesão à segunda consulta para as medidas de EIMc limitou nossas conclusões e a análise de regressão não pode fornecer evidências de uma relação causal entre o polimorfismo da *PON1* e placas carotídeas.

Conclusão

Apesar da ausência de associações do SNP p.Q192R com EIMc e placas carotídeas, há evidências em nosso estudo de que a variante p.192Q exerça influências benéficas importantes no perfil lipídico plasmático. No entanto, estudos maiores são necessários para estabelecer a associação entre o SNP p.Q192R e DCV em indivíduos com baixo risco cardiovascular.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), bolsa número 159980/2012-7, e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp), bolsa número 471380/2008-13.

Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa: Scherrer DZ, Quintão ECR, Faria EC. Obtenção de dados: Scherrer DZ, Zago VHS, Vieira IC, Parra ES, Panzoldo NB, Alexandre F, Baracat J. Análise e interpretação dos dados: Scherrer DZ, Zago VHS, Vieira IC, Secolin R, Baracat J, Faria EC. Análise estatística: Scherrer DZ, Zago VHS, Secolin R. Obtenção de financiamento: Quintão ECR, Faria EC. Redação do manuscrito: Scherrer DZ, Zago VHS, Faria EC. Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Scherrer DZ, Zago VHS, Vieira IC, Parra ES, Panzoldo NB, Alexandre F, Secolin R, Quintão ECR, Faria EC.

Potencial Conflito de Interesse

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de Financiamento

O presente estudo foi financiado por CNPq (processo 159980/2012-7) e FAPESP (processo 471380/2008-13).

Vinculação Acadêmica

Não há vinculação deste estudo a programas de pós-graduação.

Referências

1. Sorenson RC, Bisgaier CL, Aviram M, Hsu C, Billecke S, La Du BN. 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(9):2214-25.
2. Aviram M, Kaplan M, Rosenblat M, Fuhrman B. Dietary antioxidants and paraoxonases against LDL oxidation and atherosclerosis development. *Handb Exp Pharmacol.* 2005;170:263-300.
3. van Himbergen TM, Roest M, de Graaf J, Jansen EH, Hattori H, Kastelein JJ, et al. Indications that paraoxonase-1 contributes to plasma high density lipoprotein levels in familial hypercholesterolemia. *J Lipid Res.* 2005;46(3):445-51.
4. Kontush A, Chantepie S, Chapman MJ. Small, dense HDL particles exert potent protection of atherogenic LDL against oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(10):1881-8.
5. Razavi AE, Ani M, Pourfarzam M, Naderi GA. Associations between high density lipoprotein mean particle size and serum paraoxonase-1 activity. *J Res Med Sci.* 2012;17(11):1020-6.
6. Wang M, Lang X, Cui S, Zou L, Cao J, Wang S, et al. Quantitative assessment of the influence of paraoxonase 1 activity and coronary heart disease risk. *DNA Cell Biol.* 2012;31(6):975-82.
7. Zhao Y, Ma Y, Fang Y, Liu L, Wu S, Fu D, et al. Association between PON1 activity and coronary heart disease risk: a meta-analysis based on 43 studies. *Mol Genet Metab.* 2012;105(1):141-8.
8. Schrader C, Rimbach G. Determinants of paraoxonase 1 status: genes, drugs and nutrition. *Curr Med Chem.* 2011;18(36):5624-43.
9. Humbert R, Adler DA, Distechi CM, Hassett C, Omiecinski CJ, Furlong CE. The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nat Genet.* 1993;3(1):73-6.
10. Imai Y, Morita H, Kurihara H, Sugiyama T, Kato N, Ebihara A, et al. Evidence for association between paraoxonase gene polymorphisms and atherosclerotic diseases. *Atherosclerosis.* 2000;149(2):435-42.
11. Zama T, Murata M, Matsubara Y, Kawano K, Aoki N, Yoshino H, et al. A 192Arg variant of the human paraoxonase (HUMPONA) gene polymorphism is associated with an increased risk for coronary artery disease in the Japanese. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17(12):3565-9.
12. Pfohl M, Koch M, Enderle MD, Kuhn R, Fullhase J, Karsch KR, et al. Paraoxonase 192 Gln/Arg gene polymorphism, coronary artery disease, and myocardial infarction in type 2 diabetes. *Diabetes.* 1999;48(3):623-7.
13. Bayrak A, Bayrak T, Tokgozoglu SL, Volkan-Salanci B, Deniz A, Yavuz B, et al. Serum PON-1 activity but not Q192R polymorphism is related to the extent of atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb.* 2012;19(4):376-84.
14. 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(4):883-5.
15. Allebrandt KV, Souza RL, Chautard-Freire-Maia EA. Variability of the paraoxonase gene (PON1) in Euro- and Afro-Brazilians. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2002;180(3):151-6.
16. Rios DL, D'Onofrio LO, Cerqueira CC, Bonfim-Silva R, Carvalho HG, Santos-Filho A, et al. Paraoxonase 1 gene polymorphisms in angiographically assessed coronary artery disease: evidence for gender interaction among Brazilians. *Clin Chem Lab Med.* 2007;45(7):874-8.
17. Oliveira SA, Mansur AP, Ribeiro CC, Ramires JA, Annichino-Bizzacchi JM. PON1 M/L55 mutation protects high-risk patients against coronary artery disease. *Int J Cardiol.* 2004;94(1):73-7.
18. Voetsch B, Benke KS, Damasceno BP, Siqueira LH, Loscalzo J. Paraoxonase 192 Gln-->Arg polymorphism: an independent risk factor for nonfatal arterial ischemic stroke among young adults. *Stroke.* 2002;33(6):1459-64.
19. Dessi M, Gnasso A, Motti C, Pujia A, Irace C, Casciani S, et al. Influence of the human paraoxonase polymorphism (PON1 192) on the carotid-wall thickening in a healthy population. *Coron Artery Dis.* 1999;10(8):595-9.
20. Parra ES, Zago VH, Panzoldo NB, Alexandre F, Vendrame F, Virginio VW, et al. Development of a clinical laboratory data base of hyper and hypo alpha lipoproteins in Campinas-SP and neighboring region. *J Bras Patol Med Lab.* 2013;49(1):26-33.
21. Baecke JA, Burema J, Frijters JE. A short questionnaire for the measurement of habitual physical activity in epidemiological studies. *Am J Clin Nutr.* 1982;36(5):936-42.
22. Furlan-Viebig R, Pastor-Valero M. [Development of a food frequency questionnaire to study diet and non-communicable diseases in adult population]. *Rev Saude Publica.* 2004;38(4):581-4.
23. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972;18(6):499-502.
24. Lima ES, Maranhao RC. Rapid, simple laser-light-scattering method for HDL particle sizing in whole plasma. *Clin Chem.* 2004;50(6):1086-8.
25. Lagrost L. Determination of the mass concentration and the activity of the plasma cholesteryl ester transfer protein (CETP). *Methods Mol Biol.* 1998;110:231-41.
26. Jauhiainen M, Ehnholm C. Determination of human plasma phospholipid transfer protein mass and activity. *Methods.* 2005;36(2):97-101.

27. Kleemola P, Freese R, Jauhiainen M, Pahlman R, Alftan G, Mutanen M. Dietary determinants of serum paraoxonase activity in healthy humans. *Atherosclerosis*. 2002;160(2):425-32.
28. Chen J, Kumar M, Chan W, Berkowitz G, Wetmur JG. Increased influence of genetic variation on PON1 activity in neonates. *Environ Health Perspect*. 2003;111(11):1403-9.
29. Rojas-Garcia AE, Solis-Heredia MJ, Pina-Guzman B, Vega L, Lopez-Carrillo L, Quintanilla-Vega B. Genetic polymorphisms and activity of PON1 in a Mexican population. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005;205(3):282-9.
30. Wang X, Fan Z, Huang J, Su S, Yu Q, Zhao J, et al. Extensive association analysis between polymorphisms of PON gene cluster with coronary heart disease in Chinese Han population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(2):328-34.
31. Suehiro T, Nakamura T, Inoue M, Shiinoki T, Ikeda Y, Kumon Y, et al. A polymorphism upstream from the human paraoxonase (PON1) gene and its association with PON1 expression. *Atherosclerosis*. 2000;150(2):295-8.
32. 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.
33. Gaidukov L, Rosenblat M, Aviram M, Tawfik DS. The 192R/Q polymorphisms of serum paraoxonase PON1 differ in HDL binding, lipolactonase stimulation, and cholesterol efflux. *J Lipid Res*. 2006;47(11):2492-502.
34. Blatter Garin MC, Moren X, James RW. Paraoxonase-1 and serum concentrations of HDL-cholesterol and apoA-I. *J Lipid Res*. 2006;47(3):515-20.
35. Wang M, Lang X, Zou L, Huang S, Xu Z. Four genetic polymorphisms of paraoxonase gene and risk of coronary heart disease: a meta-analysis based on 88 case-control studies. *Atherosclerosis*. 2011;214(2):377-85.
36. Dahabreh IJ, Kitsios GD, Kent DM, Trikalinos TA. Paraoxonase 1 polymorphisms and ischemic stroke risk: a systematic review and meta-analysis. *Genet Med*. 2010;12(10):606-15.
37. Birjmohun RS, Vergeer M, Stroes ES, Sandhu MS, Ricketts SL, Tanck MW, et al. Both paraoxonase-1 genotype and activity do not predict the risk of future coronary artery disease; the EPIC-Norfolk Prospective Population Study. *PLoS One*. 2009;4(8):e6809.
38. Gnasso A, Motti C, Irace C, Di Gennaro I, Pujia A, Leto E, et al. The Arg allele in position 192 of PON1 is associated with carotid atherosclerosis in subjects with elevated HDLs. *Atherosclerosis*. 2002;164(2):289-95.
39. Cao H, Girard-Globa A, Serusclat A, Bernard S, Bondon P, Picard S, et al. Lack of association between carotid intima-media thickness and paraoxonase gene polymorphism in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis*. 1998;138(2):361-6.
40. Leus FR, Wittekoek ME, Prins J, Kastelein JJ, Voorbij HA. Paraoxonase gene polymorphisms are associated with carotid arterial wall thickness in subjects with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 2000;149(2):371-7.
41. Hodis HN, Mack WJ, LaBree L, Selzer RH, Liu CR, Liu CH, et al. The role of carotid arterial intima-media thickness in predicting clinical coronary events. *Ann Intern Med*. 1998;128(4):262-9.
42. Karvonen J, Kauma H, Paivansalo M, Kesaniemi YA. Paraoxonase-1 gene Leu-Met55 and Gln-Arg192 polymorphisms are not associated with carotid artery atherosclerosis in a population-based cohort. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2004;11(6):511-2.