KAROLLINE SANTANA DA SILVA

Estudo dos polimorfismos nos genes das paraoxonases 1 e 2 em pacientes com Linfoma Difuso de Grandes Células B

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de: Ciências Médicas
Área de Concentração: Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia
Orientador: Prof. Dr. Sergio Paulo Bydlowski

São Paulo
2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Karolline Santana da
Estudo dos polimorfismos nos genes das paraoxonases 1 e 2 em pacientes com linfoma difuso de grandes células B / Karolline Santana da Silva. -- São Paulo, 2012.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia.
Orientador: Sergio Paulo Bydlowski.

Descritores: 1.Polimorfismo genético 2.Linfoma difuso de grandes células B 3.Enzimas 4.Paraoxonases

USP/FM/DBD-033-/12

DEDICATÓRIA

Aos pacientes

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela minha Vida... pela luz que clareia os meus passos e me direciona, pelo amparo e força na minha caminhada. Por Seu infinito amor!

Aos meus pais, José Carlos e Veraildes, por idealizarem e acreditarem nos meus sonhos. Obrigada pelas melhores palavras e sorrisos, principalmente quando o cansaço falava mais alto que a minha coragem de prosseguir.

Aos meus queridos irmãos, Hugo e Vanessa, parte dos meus sonhos, por todo o carinho e compreensão nos vários momentos de ausência durante esses anos.

Às minhas felicidades Malu, Duda e Itainã Henrique. Escolheria, se assim fosse permitido, estar com vocês em todas as vidas.

Ao Prof. Dr. Sergio Paulo Bydlowski pela orientação neste trabalho, confiança depositada, oportunidade de aperfeiçoamento e maturidade profissional.

À Drª Luciana Morganti Ferreira Maselli, pelo primeiro contato, disponibilidade e dedicação prestadas desde o início do desenvolvimento desse trabalho até a sua conclusão.

À Profª. Drª Juliana Pereira, pela fundamental assistência na parte clínica e valiosas sugestões.

A todos os pacientes, pelo exemplo de força, que gentilmente contribuíram para o meu estudo.

À Equipe do Serviço de Hematologia do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) pela receptividade e colaboração.

Aos funcionários do Serviço de Coleta de Sangue do Hospital das Clínicas da FMUSP pelo apoio durante o período das coletas.

Às grandes amigas, Carol Macedo, Carol Romão e Vivi Dias, que vivenciaram o dia-a-dia desse trabalho e me apoiaram durante todo esse tempo. Serei eternamente grata!

À Srª Cleide Appolonio, ou simplesmente Cleidinha, pelas palavras de sabedoria e amizade.

À Srª Creusa Maria Raveri Dal Bó, pela disponibilidade e auxílio com as análises estatísticas deste estudo.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Genética e Hematologia Molecular (LIM31), agradeço pela convivência diária e aprendizado constante .

Às famílias Pinheiro, Ranal e Romão por me acolherem como membro da família e me oferecerem momentos descontraídos e tranquilos. Acredito que nos reencontramos!

Aos demais amigos, não mencionados, mas não esquecidos, e que com toda certeza também me ajudaram até aqui.

Meu muito obrigada!

“Interroga a beleza da terra,
interroga a beleza do mar,
interroga a beleza do ar amplo e difuso.

Interroga a beleza do céu,
interroga a ordem das estrelas,
interroga o sol, que com o seu esplendor ilumina o dia
interroga a lua, que com sua claridade modera as trevas da noite.

Interroga as feras que se movem na água, que caminham sobre a terra, que voam no ar, almas que se escondem, corpos que se mostram visíveis que se deixam guiar, invisível que guia.

Interroga-os!
Todos te responderão: Vê-nos, somos belos! Sua própria beleza se dá a conhecer.
Esta beleza mutável, quem a criou, senão a Beleza imutável?”
(Santo Agostinho)

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos
Lista de figuras
Lista de tabelas
Resumo
Summary

1. INTRODUÇÃO 1
1.1 Paraoxonase (PON) 2
2. OBJETIVOS 5
2.1 Objetivo geral 6
2.2 Objetivos específicos 6

3. REVISÃO DE LITERATURA 7
3.1. Paraoxonase 1 (PON1) 8
3.1.1 Polimorfismos genéticos na *PON1* 12
3.2 Paraoxonase 2 (PON2) 15
3.2.1 Polimorfismos genéticos na *PON2* 17
3.3 Paraoxonase 3 (*PON3*) 19
3.3.1 Polimorfismos genéticos na *PON3* 20
3.4 Linfomas 21
3.4.1 Definição, Incidência e Etiologia 21
3.4.2 Avaliação de Prognóstico dos Linfomas: Estadiamento 23
3.4.3 Linfoma Difuso de Grandes Células B (LDGCB) 24
3.5 Linfoma Não Hodgkin (LNH) e Paraoxonase (PON) 25

4. MÈTODOS 28

4.1 Delineamento do estudo 29
4.2 População e Local do Estudo 29
4.2.1 Pacientes 29
4.2.2 Indivíduos saudáveis 30
4.3 Critérios de seleção e exclusão 30
4.4 Reagentes 31
4.5 Amostras biológicas 32

4.6 Técnicas Moleculares 32
4.6.1 Extração do DNA genômico..... 32
4.6.2 Avaliação eletroforética e quantificação do DNA genômico 33
4.6.3 Análise dos polimorfismos 192QR e 55LM no gene da *PON1* 34
4.6.4 Análise do polimorfismo 148AG no gene da *PON2*..... 37
4.6.5 Análise do polimorfismo 311SC no gene da *PON2*..... 38
4.7 Determinações bioquímicas dos pacientes e indivíduos saudáveis 40
4.8 Atividade enzimática da Paraoxonase (PON)..... 41
4.8.1 Determinação da atividade arilesterase da PON1 sérica 41
4.8.2 Determinação da atividade paraoxonase da PON1 sérica ... 42
4.9 Pesquisa de autoanticorpos anti oxLDL 44
4.10 Análise estatística..... 46

5. RESULTADOS 47

5.1 Características clínicas e demográficas das populações do estudo 48
5.2 Distribuição dos genótipos e frequência alélica dos polimorfismos 192QR e 55LM, no gene da PON1, e 148AG e 311SC, no gene da PON2..... 50
5.3 Concentração sérica de lipídeos 53
5.4 Análise descritiva da atividade arilesterase (ARE) e paraoxonase (PON) 54
5.5 Detecção de autoanticorpos anti oxLDL..... 59

6. DISCUSSÃO 62

7. CONCLUSÕES 69

8. ANEXOS 71

9. REFERÊNCIA 112

RESUMO

SILVA KS. Estudo dos polimorfismos nos genes das paraoxonase 1 e 2 em pacientes com Linfoma Difuso de Grandes Células B [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

A família paraoxonase (PON1, PON2 e PON3) tem sido objeto de grande interesse por prevenir o estresse oxidativo e o processo inflamatório, condições importantes na carcinogênese. O Linfoma Difuso de Grandes Células B (LDGCB) consiste no subtipo histológico mais comum dentre os linfomas, doenças que se originam a partir das células do tecido linfoide e exibem distintos comportamentos clínicos, fatores patológicos e características epidemiológicas. Há escassez de dados sobre a atuação das paraoxonases na susceptibilidade diferencial ao risco de linfomas. Deste modo, o objetivo do presente estudo foi investigar a frequência alélica e genotípica dos polimorfismos 192QR e 55LM, no gene da *PON1*, e 148AG e 311SC, no gene da *PON2* e o efeito desses polimorfismos sobre as atividades da enzima PON e perfil lipídico em 182 indivíduos (78 pacientes com LDGCB e 104 indivíduos saudáveis). O sangue foi coletado, em 4 momentos, para a determinação do perfil lipídico e das atividades arilesterase e paraoxonase da PON. O DNA foi extraído de leucócitos do sangue periférico pelo método de extração salina. A análise dos polimorfismos foi realizada por PCR/RFLP. Não houve diferença estatística na distribuição de genótipos e frequência de alelos dos polimorfismos nos genes da *PON1* e *PON2*. A atividade sérica da arilesterase apresentou valores significativamente maiores apenas entre os indivíduos saudáveis (p=0,001). As variantes 55MM e 192QQ, do gene da *PON1,* influenciaram as atividades arilesterase (p=0,011) e paraoxonase (0,001). O polimorfismo *PON2* 311SS associou-se a atividade arilesterase (p=0,021). A concentração de autoanticorpos oxLDL foi alterada, pela presença do genótipo 55LM (p=0,037) nos indivíduos com LDGCB.

Descritores. Polimorfismos genéticos, Linfoma difuso de grandes células B, Enzimas, Paraoxonases

SUMMARY

SILVA KS. Study of polymorphisms in the paraoxonase 1 and 2 genes in patients with Diffuse Large B Cell Lymphoma [Dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2012.

The paraoxonase family (PON1, PON2 and PON3) have been the subject of great interest, since they are responsible for preventing oxidative stress and inflammation, conditions important in carcinogenesis. The Diffuse Large B Cell Lymphoma (DLBCL) is the most common histological subtype among lymphomas, diseases that originate from cells of the lymphoid tissue and exhibit clinically distinct behaviors and pathological and epidemiological factors. There are paucity of data on the activity of paraoxonase in the differential susceptibility to the risk of lymphoma. Thus, the objective of this study was to investigate the genotypic and allelic frequency of polymorphisms 192QR and 55LM, in the PON1 gene and 148AG and 311SC, in the PON2 gene and the effect of these polymorphisms on PON enzyme activities and lipid profile in 182 subjects (78 patients with DLBCL and 104 healthy subjects). Blood was collected in four moments for the determination of lipid profile and paraoxonase and arylesterase activities of PON. The DNA was extracted from peripheral blood leukocytes by salt extraction method. The analysis of polymorphisms was performed by PCR/RFLP. There was no statistical difference in the distribution of genotypes and allele frequencies of polymorphisms in the *PON1* and *PON2* genes. The serum arylesterase activity was significantly higher only among healthy subjects (p=0.001). 192QQ and 55MM variants of the *PON1* gene, influenced arylesterase (p=0.011) and paraoxonase (0.001) activities. The PON2 polymorphism was associated with 311SS arylesterase activity (p = 0.021). The concentration of oxLDL autoantibodies was altered by the presence of 55LM genotype (p = 0.037) in patients with DLBCL.

Descriptors. Genetics polymorphisms, paraoxonase, Diffuse large B Cell, Enzyme, Paraoxonase

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
Ala	Alanina
Apo	Apolipoproteína
ARE	Arilesterase
Arg	Arginina
Cys	Cisteína
CT	Colesterol total
DHL	Desidrogenase Láctea
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado (dATP, dCTP, dGTP, DTTP)
DP	Desvio padrão
EC	Estadio clínico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EL	Extralinfonodal
FNU4HI	Enzima de restrição Fnu4H I
FPS/HSP	Fundação Pró Sangue/Hemocentro de São Paulo
g	Unidade de medida da força centrífuga relativa
Gln	Glutamina
Gly	Glicina
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

HCl	Ácido clorídrico
HDL	Lipoproteína de alta densidade
Hinf I	Enzima de restrição originada de *Haemophilus influenzae*
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
Ig	Imunoglobulina
kDa	kilodaltons
LDGCB	Linfoma difuso de grande célula B
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
Leu	Leucina
LH	Linfoma de Hodgkin
LNH	Linfoma não Hodgkin
KCl	Cloreto de Potássio
LPL	Lipase Lipoprotéica Plasmática
mM	Milimolar
M	Molar
Met	Metionina
mg/dL	Miligramas/decilitro
$MgCl_2$	Cloreto de magnésio
mRNA	RNA mensageiro
NaCl	Cloreto de sódio
NK	*Natural killer*
ºC	Graus Celsius
OMS	Organização Mundial da Saúde

OPs	Organofosforados
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PON	Paraoxonase
Primer(s)	Sequência(s) de oligonucleotídeo(s) iniciadora(s)
QT	Quimioterapia
RFLP	Polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição
SDS	Sódio Dodecil Sulfato
Ser	Serina
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Simples
TAE	Tampão tris acetato
TBE	Tampão tris borato
TE	Tampão tris EDTA
TEN	Tampão tris EDTA NaCl
TG	Triglicérideos
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
U	Unidade internacional
U/L	Unidades por litro
W	Watts

Lista de Figuras

Figura 1. Mapa genético da família PON em humanos..... 3

Figura 2. Estrutura tridimensional da PON1 9

Figura 3. Esquema dos perfis eletroforéticos dos produtos amplificados dos polimorfismos 55LM e 192QR, no gene da *PON1* (multiplex) 36

Figura 4. Esquema dos perfis eletroforéticos dos produtos amplificados dos polimorfismos 148AG, no gene da *PON2* . 38

Figura 5. Esquema dos perfis eletroforéticos dos produtos amplificados dos polimorfismos 311SC, no gene da *PON2*.. 40

Figura 6. Distribuição da idade (anos) entre os grupos caso e controle 48

Figura 7. Distribuição dos pacientes com LDGCB (n=78) segundo sistema de classificação Ann Arbor 49

Figura 8. Associação do polimorfismo 55LM, no gene da *PON1,* com a idade (anos) em pacientes com LDGCB..... 52

Figura 9. ... Influência do polimorfismo 311, no gene da *PON2*, sobre os níveis de triglicérides (TG) em indivíduos portadores de LDGCB (n=78) 54

Figura 10. Atividade da enzima arilesterase (ARE) no grupo caso (n= 78) e grupo controle (n= 104). 55

Figura 11. Atividade da enzima paraoxonase (PON) no grupo caso (n= 78) e grupo controle (n= 104). 56

Figura 12. Influência do polimorfismo na posição 55, do gene da *PON1*, sobre a determinação da atividade arilesterase (ARE) nos grupos caso (n= 78) e controle (n=104) 57

Figura 13. Influência do polimorfismo na posição 192, do gene da *PON1*, sobre a determinação da atividade paraoxonase (PON) nos grupos caso (n= 78) e controle (n=104). 58

Figura 14. Concentração de autoanticorpos anti-oxLDL no soro de indivíduos com LDGCB em momentos distintos do tratamento quimioterápico 60

Figura 15. Influência do polimorfismo 55LM, no gene da *PON1,* sobre a concentração de autoanticorpos anti-oxLDL..... 61

Lista de Tabelas

Tabela 1. Sistema de estadiamento Ann Arbor 23

Tabela 2. Sequência 5'→3' de *primers* utilizada na determinação dos polimorfismos 55LM e 192QR, no gene da *PON1* 35

Tabela 3. Sequência 5'→3' de *primers* utilizada na determinação do polimorfismo 148AG, no gene da *PON2* 37

Tabela 4. Sequência 5'→3' de *primers* utilizada na determinação dos polimorfismo 311SC, no gene da *PON2* 39

Tabela 5. Valores de referência de lipídeos plasmáticos..... 41

Tabela 6. Distribuição genotípica e frequência de alelos dos polimorfismos 192QR e 55LM no gene da *PON1,* nos grupos caso (n=78) e controle (n=104) 50

Tabela 7. Distribuição genotípica e frequência de alelos dos polimorfismos 148AG e 311SC no gene da *PON2,* nos grupos caso (n=78) e controle (n=104) 51

Tabela 8. Influência do polimorfismo, na posição 55, do gene da *PON1* sobre a determinação da atividade paraoxonase (PON) nos indivíduos saudáveis (n=104) 57

Tabela 9. Influência do polimorfismo, na posição 311, do gene da *PON1* sobre a determinação das atividades arilesterase (ARE) e paraoxonase (PON), nos indivíduos com LDGCB (n=78). 59

Tabela 10. Concentração de oxLDL no soro de indivíduos com LDGCB em momentos distintos do tratamento quimioterápico..... 59

1. Introdução

1.1 Paraoxonase (PON)

A principal representante das esterases “A” é a enzima paraoxonase (PON) – hidrolase de ligações triésteres de ácido fosfórico com afinidade específica a compostos organofosforados (OPs) (Mackness et al., 1996; Costa et al., 2003).

O nome PON reflete a habilidade da enzima para hidrolisar o *paraoxon,* substrato mais comumente utilizado *in vitro* e metabólito tóxico do inseticida *parathion* (Costa et al, 2003; Khersonsky et al., 2005). No entanto, a PON hidrolisa uma variedade de substratos metabólitos de outros OPs, como oxon, diazoxon, “agentes nervosos” (sarin, soman), ésteres aromáticos (fenilacetato, tiofenilacetato e 2-naftilacetato) e lactonas aromáticas e alifáticas (dihidrocumarina, homocisteína tiolactana) (Costa et al., 2003; Draganov et al., 2004). Assim, estudos sugerem que a nomenclatura PON seja inadequada e sem qualquer associação com a atividade da paraoxonase (Draganov et al., 2004).

A atividade da enzima PON está presente no soro, podendo também ser encontrada em eritrócitos e cérebro. O tecido hepático, além de concentrar parte desta atividade, representa a fonte primária da enzima encontrada no plasma (Mackness, 1989; Costa et al., 2003; Draganov et al., 2005).

A PON pertence a uma família multigênica de enzimas (La Du, 1996), composta por três diferentes membros *PON1*, *PON2* e *PON3*, localizados adjacentemente no cromossomo 7 humano (7q21-23) e no cromossomo 6 de ratos (Primo-Parmo et al*.,* 1996; Hegele, 1999; Précourt et al., 2011).

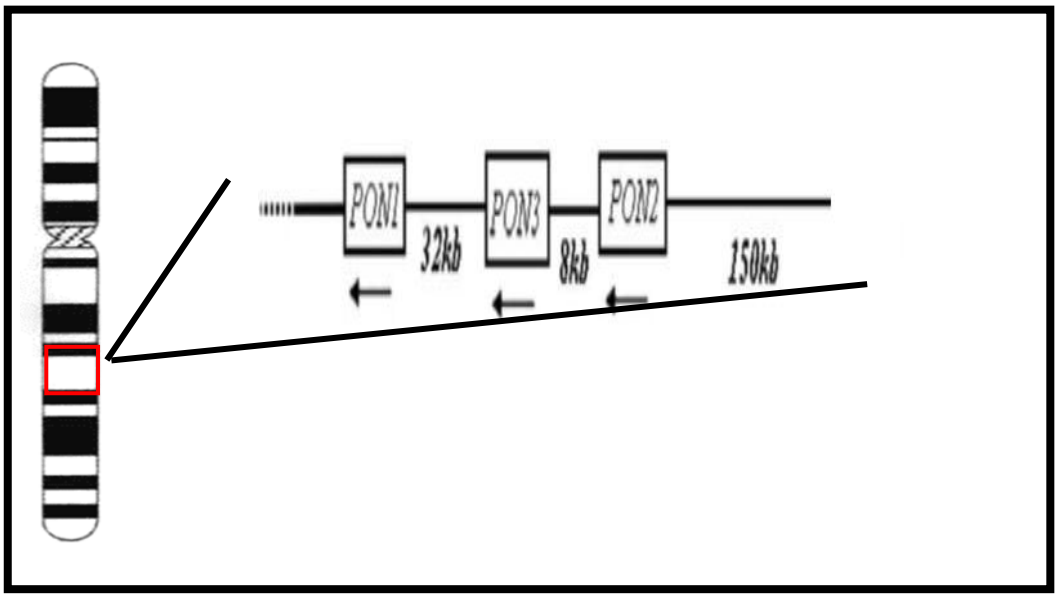

Figura 1. Mapa genético da família PON em humanos. FONTE: Li et al., 2003 (adaptado)

Nos humanos, os genes da PON compartilham 79 a 90% e 81 a 91% de similaridade em aminoácidos e em nucleotídeos, respectivamente (Primo-Parmo et al., 1996; Boright et al., 1998; Mackness et al., 2002) e possuem nove éxons, oito íntrons e uma sequência de promotores TATA-less (La Du et al., 1999; Campo et al., 2004). Estudos demonstram que a grande homologia estrutural destes genes esteja vinculada a existência de um precursor evolucionário comum (Hegele, 1999; Sorenson et al., 1999).

Desde a sua descoberta, a PON tem sido objeto de vários campos de pesquisa (Van Himbergen et al., 2006; Goswami et al., 2009). Deste modo, a família PON pode estar associada a eventos fisiopatológicos como doença aterosclerótica coronariana (Pérez-Herrera et al., 2008; Shin, 2009; Précourt et al., 2011), síndrome metabólica (Flekac et al., 2008; Kordi-Tamandani et al., 2011) e distúrbios neurológicos (Kucukali et al., 2008; Lawlor et al., 2007). Sabe-se também que o stress oxidativo e o processo inflamatório, mediados pela PON, são importantes na carcinogênese, embora poucos dados sobre a alteração da atividade da enzima e o

câncer estejam disponíveis (Hussein et al., 2011; Uyar et al., 2011; Witte et al., 2011).

Apesar dos 60 anos de pesquisa, o papel exato da PON1, PON2 e PON3, no corpo humano, permanece incerto (Van Himbergen et al., 2006; Précourt et al., 2011). A maioria dos nossos conhecimentos sobre a relação da PON com a doença cardiovascular e muitas outras doenças relacionadas ao estresse oxidativo é baseado em estudos de associação, onde são vistas diferenças entre as frequências de alelos, em uma amostra populacional constituída de um grupo com a doença e um grupo sadio (Burton et al., 2005). Deste modo, torna-se fundamental estabelecer a atuação de cada um dos membros da família PON nas fisiologias e patologias humanas, inclusive na população brasileira, visando esclarecer as funções bem como compreender sua modulação e implicações na saúde humana (Précourt et al., 2011).

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Investigar a frequência alélica e genotípica dos polimorfismos da família paraoxonase e o efeito desses polimorfismos sobre a atividade enzimática de PON1 e perfil lipídico de pacientes com Linfoma Difuso de Grandes Células B (LDGCB).

2.2 Objetivos específicos

a) Verificar a distribuição dos genótipos e frequência relativa de alelos dos polimorfismos nos genes de *PON1* (192QR e 55LM) e *PON2* (311SC e 148AG) em portadores de Linfoma Difuso de Grandes Células B (LDGCB) e em indivíduos saudáveis;

b) Avaliar o perfil lipídico dos participantes do estudo e a potencial associação com os polimorfismos nos genes de *PON1* (192QR e 55LM) e *PON2* (311SC e 148AG);

c) Determinar, no soro destas populações, a atividade da enzima PON1 e sua relação com os polimorfismos avaliados;

d) Avaliar a peroxidação lipídica, no plasma de indivíduos portadores de Linfoma Difuso de Grandes Células B (LDGCB).

3. Revisão da Literatura

3.1. Paraoxonase 1 (PON1)

Abraham Mazur, em 1946, foi o primeiro a descrever a hidrólise enzimática de compostos organofosforados (OPs) nos tecidos animais (Mazur, 1946; Costa et al., 2003). Este achado conduziu à descoberta da enzima sérica paraoxonase (PON1), no início dos anos 50 (Aldridge et al., 1953). No entanto, o interesse pela enzima aumentou somente em 1991, quando Mackness e colaboradores sugeriram que PON1 poderia prevenir o acúmulo de lipoperóxidos na lipoproteína de baixa densidade (LDL) e consequentemente desenvolvimento da doença cardiovascular (Mackness et al., 1991).

A PON 1 é uma esterase cálcio-dependente (Marsillach et al., 2008) sintetizada e secretada pelo fígado, na corrente sanguínea, onde se encontra associada com a apolipoproteína A1 (Apo A1) (Noto et al., 2001), indicando uma interação específica com a lipoproteína de alta densidade (HDL) (Durrington et al., 2001; Gupta et al., 2009). Constitui-se de 355 aminoácidos, com peso molecular de 43-45 kDa e possui três cadeias de carboidratos que correspondem a 15,8% do seu peso (La Du, 1996, Mackness et al., 1998, Lu et al., 2006; Marsillach et al., 2008).

A cristalografia de uma variante recombinante da PON foi determinada, permitindo-lhe ser a primeira proteína associada à HDL a ter o seu formato tridimensional elucidado (Figura 1) (Harel et al., 2004; Van Himbergen et al., 2006), auxiliando as análises de seu modo de ligação a esta lipoproteína e consequente papel fisiológico (Aviram et al., 2005). O centro da enzima apresenta dois íons de cálcio, necessários para a

estabilização da estrutura da molécula e atividade catalítica frente aos substratos (Harel et al., 2004). O modelo empregado indica que a PON1 seria uma enzima ativada de modo interfacial (Harel et al., 2004) e que partículas de HDL, possuidoras de apo-A1, ligam-se à PON1 com maior afinidade, promovendo melhor estabilização da enzima (mais de 100 vezes), além de estimularem sua atividade lipolactonase (Gaidukov et al., 2006).

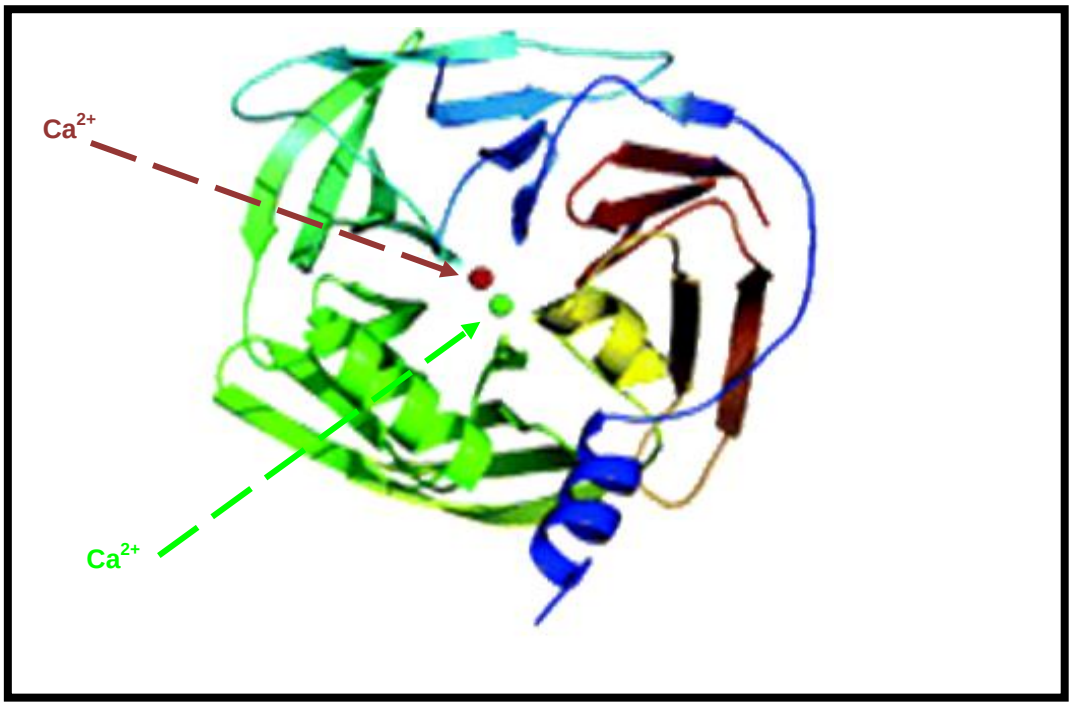

Figura 2. Estrutura da estrutura tridimensional da PON1. FONTE: Harel et al., 2004 (adaptado).

Empregando-se PON1 purificada foi ainda demonstrado que o cálcio seria desnecessário na prevenção do acúmulo de peróxidos lipídicos. Uma mutação no sítio ativo da enzima seria essencial para a proteção contra a oxidação da LDL, mas não para a hidrólise de OPs (Khersonsky et al., 2006). Tal fato sugere a possível existência de mudanças conformacionais no sítio ativo da PON1, que permitem alternar as funções, ou ainda, a

existência de 2 sítios ativos (1 sítio antioxidante e 1 sítio para a hidrólise de OPs) (Durrington et al., 2001). Assim, a função potencialmente antiaterogênica da PON1 encontra-se relacionada à sua localização nas partículas de HDL e é mediada pela atividade lipolactonase (Rosenblat et al., 2006; Rosenblat et al., 2011).

A atividade hidrolítica contra lactonas (ésteres cíclicos) constitui a atividade nativa de PON1 (Khersonsky et al., 2005). Mais ainda, todos os membros da família de enzimas PON apresentam atividade lactonase, implicando que esta atividade tenha sido conservada durante a evolução da enzima (Draganov et al., 2005). Assim, as atividades paraoxonase e arilesterase seriam meramente promíscuas e pouco afetadas pela ligação à HDL (Gaidukov et al., 2005).

A PON1 é expressa em mamíferos, tais como, ratos, coelhos, camundongos e seres humanos (Draganov et al., 2004), além de também ser encontrada em peixes, aves e invertebrados (La Du, 1996).

Em humanos, a PON1 sofre influência de muitos fatores que podem atuar de modo a inibir ou estimular a sua atividade e expressão. Em recém-nascidos, a atividade da PON1 sérica é relativamente baixa e aumenta até os 15-25 meses de vida (Holland et al., 2006; Marchegiani et al., 2008), quando alcança um nível pré-determinado pelo polimorfismo da região regulatória 5’ e por fatores ambientais como, substâncias químicas, indutores enzimáticos, estados patológicos e fisiológicos, dieta e estilo de vida (Costa et al., 2005; Goswami et al., 2009). Os níveis da enzima voltam a diminuir com o envelhecimento, possivelmente devido ao desenvolvimento

de condições relacionadas ao estresse oxidativo (Seres et al., 2004; Lescai et al., 2009). A atividade e expressão da PON também se distinguem entre os sexos, reafirmando a existência de uma relação sexo-dependente justificada por fatores hormonais (Rios et al., 2007; Costa et al., 2005). As mulheres apresentam níveis de atividade PON significativamente maiores quando comparadas às médias da mesma atividade nos homens (Faggioni, 2003, Costa et al., 2005; Sumegova et al., 2006).

A atividade enzimática da PON1 ainda exibe uma variação entre os indivíduos de diferentes etnias, de aproximadamente 10 a 40 vezes (Cataño et al., 2006; Elkiran et al., 2007; Eng et al., 2009; Eom et al., 2011). Alterações na circulação dos níveis de PON1 podem também ser encontradas numa variedade de doenças que envolvem o estresse oxidativo, incluindo doença cardiovascular (Mackness et al., 2004; Gupta et al., 2011), diabetes (Iborra, 2006; Flekac et al., 2008), cânceres (Stevens et al., 2006; Elkiran et al., 2007; Camuzcuoglu et al., 2009), ou mesmo entre indivíduos saudáveis (Ferreira, 2007; Parra et al., 2010; Singh et al., 2011).

Apesar dos dados ainda conflitantes, a atividade da PON1 também pode estar alterada no tabagismo, na gravidez, na menopausa e nas dietas aterogênicas (Faggioni, 2003; Holland et al., 2006; Prakash et al., 2007, Tsakaris et al., 2009).

3.1.1 Polimorfismos genéticos na PON1

A atividade da PON1 é influenciada parcialmente por polimorfismos genéticos (Mohamed Ali et al., 2008). Mais de 200 polimorfismos já foram descritos neste gene, sendo alguns localizados em regiões codificadoras e outros em regiões intrônicas e reguladoras (La Du et al., 2003; Costa et al., 2011). Alguns polimorfismos, ainda não caracterizados e situados na região promotora do gene, fazem parte desse número (Cataño et al., 2006; Furlong et al., 2006).

Os polimorfismos da região codificadora do gene *PON1* tem sido investigados quanto aos seus efeitos sobre a eficiência de hidrólise a substratos específicos e constitui a base molecular da variabilidade interindividual, sugerindo que estes polimorfismos afetam a expressão dos níveis de PON1 (Agachan et al., 2004; Costa et al., 2011). Além disso, ambos os polimorfismos tem sido associados com um vasto número de condições patofisiológicas (Goswami et al., 2009; Hussein et al., 2011; Rajkovic et al., 2011).

Duas isoformas comuns de *PON1* foram estudadas devido à substituição dos aminoácidos Glutamina (Gln) por Arginina (Arg) (Q→R), na posição 192, e Leucina (Leu) por Metionina (Met) (L→M), na posição 55 (Ng et al., 2005; Mohamed Ali et al., 2008).

Nos humanos, o polimorfismo *PON1* 192QR não afeta a concentração da proteína PON1 (Costa et al., 2003), entretanto influencia a atividade da PON1 por estar associada com a eficiência catalítica diante de alguns substratos (Rainwater et al., 2009; Richter et al., 2009). O *paraoxon* é

hidrolisado eficientemente pela isoforma 192R e os substratos *diazoxon, somam* e *sarin* são mais rapidamente hidrolisados pela isoforma 192Q (Furlong et al., 2006; Richter et al., 2009). Tanto a isoforma 192R quanto a 192Q hidrolisam igualmente o fenilacetato (Furlong et al., 2006). As capacidades de hidrólise do *paraoxon* (atividade paraoxonase) e do fenilacetato (atividade arilesterase) são frequentemente utilizadas como marcadores da atividade enzimática da PON1 (Goswami et al., 2009).

O polimorfismo 192QR altera *in vitro* a capacidade da enzima de proteger a LDL contra a oxidação. A aloenzima 192Q promove melhor proteção da LDL contra o acúmulo de peróxidos lipídicos (Mackness et al., 2003; Sepahvand et al., 2007); já o alelo R parece constituir fator de risco independente para doença coronariana justamente por sua menor capacidade antioxidativa (Pérez et al., 2008; Vaisi-Raygani et al., 2011).

O segundo polimorfismo exônico no gene da *PON1*, ocorre na posição 55 e não parece afetar a interação da enzima com os substratos, devido à ligação com polimorfismos na região promotora do gene (Costa et al., 2003; Mackness et al., 2003). No entanto, afeta menos intensamente e de modo independente quanto ao polimorfismo *PON1* 192QR, os níveis plasmáticos de PON1 (Mackness et al., 2003; Oliveira et al., 2004).

A presença do alelo 55M está associada com a alteração nas concentrações séricas e à baixa eficiência da PON1 plasmática, provavelmente pelo fato do aminoácido Leucina ocupar um ponto estratégico da enzima (Harel et al., 2004; Costa et al., 2005; Sephavand et al., 2007).

As primeiras investigações da distribuição dos polimorfismos genéticos de PON1 entre as populações foram realizadas, através da determinação da atividade enzimática, tendo como substrato o *paraoxon*, e os fenótipos e as frequências alélicas foram deduzidos através da quantificação de valores (La Du et al., 1986; Geldmacher et al. 1988; Roy et al., 1991). Atualmente, esses estudos são realizados através da amplificação do DNA e subsequente digestão do produto da PCR por enzimas de restrição (Gupta et al., 2011; Yldrim et al., 2011; Vaisi-Raygani et al., 2011).

Diferenças marcantes na distribuição polimórfica da *PON1* são observadas em populações humanas e relacionadas à origem étnica dos indivíduos (Allebrandt et al., 2002, Scacchi et al., 2003; Santos et al., 2005; Ferreira, 2007; Mohamed Ali et al., 2008). O alelo Q no gene da *PON1* parece ser mais frequente, na população asiática, quando comparado ao alelo R (Phuntuwate et al., 2005; Sephavand et al., 2007; Ozturk et al., 2009; Vaisi-Raygani et al., 2011), assim como em regiões temperadas da Europa e da América do Norte (Deakin et al., 2003; Hernandez et al., 2003). Achados similares foram encontrados em alguns estudos realizados na América do Sul (Gamboa et al., 2006; Santos et al., 2005; Maselli, 2007; Pérez-Herrera et al., 2008). Em outros estudos, no entanto, inexiste ou há pouca diferença na distribuição desses alelos (Acuña et al., 2004; Rojas-Garcia et al., 2005; Cataño et al., 2006).

Em relação ao polimorfismo 55LM, a distribuição alélica também diverge entre as populações no mundo. Estudos indicaram que o alelo L parece ser mais frequente quando comparado ao alelo M, (Brophy et al.,

2001; Wang et al., 2003; Santos et al., 2005; Rios et al., 2007; Sephavand et al., 2007) e, segundo Draganov e colaboradores, maiores estudos seriam necessários para determinar se esta distribuição estaria relacionada com migrações populacionais, influências climáticas, bem como com fatores ambientais (Draganov et al., 2000).

3.2 Paraoxonase 2 (PON2)

A PON2 é um dos três membros, altamente conservados, da família de enzimas paraoxonase (Witte et al., 2011). Do ponto de vista evolutivo, a PON2 corresponde ao membro mais antigo, seguido por PON3 e PON1 (Primo-Parmo et al., 1996).

Em contraste com a PON1, a PON2 não se encontra circulante associada às frações séricas lipoprotéicas, embora esteja expressa em uma variedade de tecidos que incluem cérebro, coração, fígado, pâncreas, pulmão, rim e testículos (Mochizuki et al., 1998; Ng et al., 2001; Costa et al., 2003). Ainda, com localização primária na membrana plasmática e região perinuclear, a PON2 é também encontrada em organelas celulares tais como, retículo endoplasmático, lisossomos e mitocôndrias (Horke et al., 2008; Rothem et al., 2007; Witte et al., 2011).

Estudos recentes indicam que a atividade nativa da PON2 seja lactonase (Draganov et al., 2005; Camps et al., 2009). A PON2 parece estar associada à capacidade de degradar e inativar compostos presentes em bactérias envolvidas nos processos infecciosos (Stoltz et al., 2007; Dasgupta

et al., 2011). No entanto, seus substratos naturais *in vivo* ainda permanecem desconhecidos (Stoltz et al., 2007; Witte et al., 2011).

Embora o papel fisiológico da PON2 seja parcialmente desconhecido, a sua distribuição nos tecidos sugere um papel exclusivo e que a distingue da PON1 e PON3 (Ng et al., 2001; Witte et al., 2011). Além disso, a PON2 possui propriedades antioxidantes semelhantes a PON1, mesmo que seja ausente no plasma (Maselli, 2007; Primo-Parmo et al., 1996).

A PON2 é modulada por processos patofisiológicos relacionados ao status oxidativo e inflamação como, doenças cardiovasculares, diabetes, câncer e outras doenças que envolvem o sistema imunológico (Camps et al., 2009; Shih et al., 2009). De modo consistente, estudos demonstraram que a superexpressão da PON2 atuaria na redução do estresse oxidativo intracelular ao proteger as células do dano oxidativo, principalmente quando expostas a peróxido de hidrogênio e fosfolípides oxidados (Ng et al., 2001; Horke et al., 2007), além de atenuarem o desenvolvimento de complicações cardiovasculares em portadores de diabetes (Meilin et al., 2010; Rosenblat et al., 2009).

Somado ao papel antiaterosclerótico, quando superexpressa a PON2 exibe potencial citoprotetor (Witte et al., 2011), ao estabilizar as células tumorais, conferir resistência a apoptose induzida pelo estresse oxidativo (Witte et al., 2011) e resistência frente aos tratamentos quimioterápicos. No entanto, faz-se necessário obter mais informações sobre tais funções (Précourt et al., 2011; Witte et al., 2011).

3.2.1 Polimorfismos genéticos na PON2

Mochizuki e colaboradores (1998) identificaram diversas formas de RNA mensageiro do gene da *PON2* produzidas por *splicing* alternativo ou pelo uso de um segundo sítio de início de transcrição (Mochizuki et al., 1998). O gene da *PON2* expressa uma proteína intracelular, com peso molecular entre 40-43 kDa (Ng et al., 2001; Horke et al., 2007), distribuída por 9 éxons, 8 íntrons e 355 aminoácidos (Li et al., 2003).

Foram caracterizados, na sequência codificadora do gene, dois polimorfismos comuns que levam à substituição de aminoácidos Arginina (Arg) por Glicina (Gly) (A→G), na posição 148, e Cisteína (Cys) por Serina (Ser)(C→S), na posição 311 do gene (Wang et al., 2003). Similarmente a *PON1*, estudos populacionais tem associado os polimorfismos da *PON2* às complicações cardiovasculares (Martinelli et al., 2004; Pasdar et al., 2006; Saeed et al., 2007), variações no metabolismo de lipoproteínas plasmáticas (Boright et al., 1998; Leus et al., 2001), doenças autoimune (Dasgupta et al., 2011), dentre outras.

O polimorfismo localizado na posição 148 do gene da *PON2* encontra-se associado às variações de lipoproteínas (Boright et al. 1998; Li et al., 2003) e níveis de glicose basal, no plasma, em portadores de *diabetes mellitus* não dependente de insulina (tipo 2) (Hegele et al., 1997; Beer et al., 2006). A homozigose 148GG parece acelerar a hiperglicemia em portadores de diabetes (Calle et al., 2006).

Existem evidências de que alterações na glicose plasmática sejam fator predisponente para diversas anormalidades associadas ao aumento da

oxidação lipídica como, elevação de triglicérideos plasmáticos, decréscimo da concentração de HDL, aumento da pressão sanguínea e redução da densidade das partículas de LDL, os quais constituem fatores de risco para aterosclerose e doença coronariana (Li et al., 2003; Calle et al., 2006).

Outro polimorfismo, na posição 311 do gene *PON2*, também tem sido relacionado às patologias como, doença arterial coronariana, Alzheimer, infarto isquêmico em pacientes com *diabetes mellitus* tipo 2 e redução de massa óssea em mulheres pós-menopausa (Chen et al., 2003; Janka et al., 2002; Kao et al., 2002; Shi et al., 2004; Yamada et al., 2003). Ainda é sabido que a substituição de uma Cys por Ser, na posição 311, altera a glicosilação da enzima e diminui a atividade lactonase exercida pela mesma (Stoltz et al., 2009).

O polimorfismo *PON2* 311SC parece interagir com o alelo 192R, do gene *PON1*, sendo considerado fator de risco para a doença coronariana (Sanghera et al, 1998). Por outro lado, estudos observaram que o risco para tal doença estaria limitada aos indivíduos portadores dos genótipos 55LL/ 192QQ/ 311SS (Mackness et al., 2001; Rios et al., 2007; Taskiran et al., 2009).

Ainda são poucas as informações sobre a distribuição alélica dos polimorfismos da *PON2* (Acuña, 2004; Ferreira, 2007). No entanto, os resultados demonstram que há uma maior frequência dos alelos 148A e 311S entre as populações (Maselli 2007; Oliveira et al., 2004; Zhang et al., 2006).

3.3 Paraoxonase 3 (PON3)

A PON 3 corresponde ao terceiro membro da família paraoxonase, interpondo-se entre a PON1 e PON2 (Figura 2) (Précourt et al., 2011). Sintetizada e secretada pelo fígado, em sua maior totalidade, a PON3 tem sido observada nos rins, pâncreas e intestino de camundongos (Campo et al., 2004; Marsillach et al., 2008; Shih et al., 2010).

Identificada recentemente, a PON3 assume em termos de expressão, função e localização, algumas características semelhantes a PON1 e PON2 (Draganov et al., 2000; Sanghera et al., 2008; Précourt et al., 2011). Destacam-se as propriedades antioxidativas e antiaterogênicas, frente ao estresse oxidativo, demonstradas por meio de estudos *in vitro* (Reddy et al., 2001; Shih et al., 2007).

Similar a PON1, a PON3 é uma esterase cálcio dependente que se encontra associada a frações de HDL, no plasma (Gupta et al., 2009). Contrastando, a PON3 expressa atividade arilesterase limitada, ausência da atividade paraoxonase e potencial para hidrolisar lactonas com maior rapidez (Reddy et al., 2001; Campo et al., 2004; Gupta et al., 2009).

A enzima PON3 não foi completamente caracterizada em tecido humano, no entanto novos dados indicam que em bebês prematuros e em recém-nascidos, os níveis desta glicoproteína encontram-se aumentados (Li et al., 2003; Shih et al., 2007; Beltek et al., 2010).

3.3.1 Polimorfismos genéticos na *PON3*

O gene da *PON3* expressa uma glicoproteína de 40 kDa e distribui-se por nove éxons e oito íntrons (Gupta et al., 2009). Mutações na sequência codificadora do gene da *PON3* foram descritas em 2004, por Campos e colaboradores, que identificaram, no éxon 9, a substituição de aminoácidos Serina por Treonina (S→T), no códon 311, e Glicina por Ácido Aspártico (G→D), no códon 324, numa população do sul da Itália (Campo et al., 2004). Os resultados demonstram que as mutações *missense* de *PON3* são muito baixas com relação às frequências de *PON1* e *PON2*, obtidas dos polimorfismos de regiões codificatórias (Wang et al., 2003). As consequências funcionais desses dois polimorfismos ainda permanecem desconhecidas (Ng et al., 2005, Précourt et al. 2011).

Estudo realizado por Sanghera e colaboradores (2008) propôs a existência de outras variantes genéticas no gene *PON3*, em portadores de doença autoimune (Sanghera et al., 2008). Os 6 SNPs (polimorfismos de um único nucleotídeo), distribuídos pelas regiões promotora (*PON3* 2115), intrônica (*PON3* 10340), codificatória (*PON3* 30588), de *splicing* (*PON3* 40512) e 3' UTR - região não traduzida - (*PON3* 45486 e *PON3* 55146) foram analisados e considerados responsáveis por afetar a atividade sérica de PON1, independente do conhecimento das variações genéticas de PON1 (Sanghera et al., 2008). Embora a PON1 e PON3 exerçam suas funções fisiológicas frente a distintos substratos, ambas podem contribuir sinergisticamente na prevenção de doenças cardiovasculares, como exemplo (Sanghera et al., 2008; Précourt et al., 2011).

3.4 Linfomas

3.4.1 Definição, Incidência e Etiologia

Entende-se por linfomas, todas as doenças originadas a partir de células do tecido linfoide e que exibem distintos comportamentos clínicos, fatores patológicos e características epidemiológicas (Mesquita et al., 2002; Akanjii, 2006; Hjalgrim, 2008). Desde a observação por Thomas Hodgkin, em 1832, tais distúrbios proliferativos têm sido estudados no tocante a sua natureza inflamatória, infecciosa e neoplásica (Akanjii, 2006; Stone et al., 2005).

Morfológica e fenotipicamente são divididos em linfomas de Hodgkin (LH) e não Hodgkin (LNH), sendo que em ambos os casos há substituição do tecido linfático normal por uma aglomeração de células linfáticas anormais (Silva, 2009). Os LH são compostos por células gigantes multinucleadas (células de Reed-Sternberg), apresentam crescimento ordenado, por contiguidade, e com frequente localização nos linfonodos central e axial e rara localização extranodal (Schwering et al., 2003; Swerdlow et al., 2008). Por sua vez, os LNH são expansões de células originadas de populações de células B, T ou *Natural Killer* (NK) (Van Der Waal et al., 2005), apresentando crescimento não contíguo, com padrão de circulação similar a dos linfócitos não neoplásicos e podem exibir apresentação extralinfonodal (Armitage et al., 2005; Harris et al., 2000).

A partir do reconhecimento de que alguns subtipos destes tumores apresentavam patogênese, aspectos imunofenotípicos e genéticos particulares, nas últimas décadas houve significativo avanço na

compreensão tanto dos LH quanto dos LNH (Jack et al., 2004; Jaffe et al., 2001; Swerdlow et al., 2008). Face às divergências dos sistemas de classificação, atualmente a maioria da comunidade científica nacional e internacional utiliza a Classificação de Tumores Hematológicos e de Tecidos Linfoides da Organização Mundial de Saúde (OMS), aceita não só pela sua reprodutibilidade histopatológica, mas também por ter representado grande relevância clínica (Jack et al., 2004; Swerdlow, 2008).

Enquanto que a incidência e mortalidade têm diminuído na maioria dos cânceres, a incidência mundial de linfomas tem aumentado, sendo mais comum entre indivíduos com idade mais avançada, caucasianos e do sexo masculino (Müller et al., 2005; Said et al., 2009). As diferenças nas taxas de incidência tendem a ser marcantes, principalmente em regiões menos desenvolvidas (Jemal et al., 2005; Roman et al., 2011). No Brasil, dados revelam que, no período de janeiro de 2008 a agosto de 2009, o LNH foi responsável por 1667 óbitos (1033 em 2008 e 664 de janeiro a agosto de 2009), sendo 963 homens e 704 mulheres (DATASUS, 2009).

A maioria dos casos de linfomas não tem etiologia definida, sugerindo que fatores hereditários, ambientais, infecciosos (virais e bacterianos), riscos ocupaconais e dietéticos, somados possam estar envolvidos no aumento da incidência destas doenças (Muller et al., 2005; Roman et al., 2011; Kristinsson et al., 2009).

3.4.2 Avaliação de Prognóstico dos Linfomas: Estadiamento

O estadiamento de neoplasias consiste na avaliação da extensão da doença no sítio primário e na pesquisa de metástases regionais ou à distância (Carbone et al., 1971), além de permitir a obtenção de informações quanto ao prognóstico da doença, terapêutica a ser adotada e resposta frente ao tratamento (Veloso et al., 2007).

O sistema de classificação Ann Arbor, desenvolvido em 1971 originalmente para os LH, tem sido utilizado para categorizar os pacientes diagnosticados com LNH em quatro estadios, segundo a distribuição anatômica da doença e a presença ou ausência de sintomas (Tabela 1) (Carbone et al., 1971; Armitage et al., 2005).

Tabela 1. Sistema de estadiamento Ann Arbor

Estadio	Características
I	Envolvimento de uma região linfonodal ou estrutura linfoide
II	Envolvimento de duas ou mais regiões linfonodais do mesmo lado do diafragma
III	Envolvimento de regiões linfonodais ou estruturas em ambos os lados do diafragma
IV	Envolvimento de órgão extranodal

O acometimento de sítios extranodais localizados é reconhecido pela letra E. Por convenção, o envolvimento do fígado, medula, pleura, liquor e envolvimento nodular dos pulmões são sempre considerados estadio IV. A presença de sintomas tais como, febre >38ºC, perda ponderal superior a 10% da massa corpórea nos últimos 6 meses e sudorese noturna é

designada pela letra ‘B’ e a ausência de sintomas pela letra ‘A’ (Armitage et al., 2005).

O sistema de estadiamento Ann Arbor apresenta limitações para os LNH quanto à estratificação do prognóstico, uma vez que tal grupo não possui padrão de disseminação por contiguidade e frequentemente envolvem sítios extranodais (Armitage et al., 2005; Mota, 2006).

3.4.3 Linfoma Difuso de Grandes Células B (LDGCB)

O Linfoma Difuso de Grandes Células B (LDGCB) consiste no subtipo histológico mais comum entre os LNH (Gatter et al., 2009), caracterizado de acordo com o comportamento clínico e tamanho das suas células (Said et al., 2009). Tal categoria é formada pela fusão de vários subtipos histológicos, reconhecidos pela alta reprodutibilidade e relevância clínica (Gatter et al., 2009; Hunt et al., 2008).

Apesar da heterogeneidade clínica e biológica, os LDGCB apresentam características específicas, incluindo a proliferação difusa e rápida de células B periféricas maduras (Hunt et al., 2008; Nogai et al., 2011), as quais possuem tamanho nuclear duas vezes maior que o núcleo de um linfócito ou macrófago não-neoplásico (Gatter et al., 2009; Said et al., 2009). Ainda, morfologicamente, os LDGCB são representados por células arredondadas, irregulares, lobuladas ou clivadas, com cromatina frouxa, presença de nucléolos, citoplasma abundante e basofílico (Swerdlow et al., 2008).

Embora o LDGCB ocorra em qualquer idade, incluindo as crianças, a maior frequência desta doença é encontrada a partir da sétima década de vida (mediana de 64 anos) e é ligeiramente mais comum no sexo masculino (Said et al., 2009). Cerca de metade dos indivíduos apresentam-se em estadio I ou II. Até 40% destes linfomas são primariamente extranodais, sendo o trato gastrointestinal, pele, ossos, mama, cérebro, baço, glândulas salivares, tireoide, fígado, rins, ovários ou testículos os locais mais afetados (Coiffier, 2007; Said et al., 2009).

A etiologia dos LDGCB ainda permanece desconhecida. A maioria dos casos origina-se *"de novo"* (lesão primária), situação onde a doença não resulta da transformação de um linfoma indolente com baixa taxa de proliferação (Fisher et al., 2004; Yamaguchi et al., 2008; Said et al., 2009). Em outros casos, o LDGCB pode representar a progressão (lesão secundária) de uma neoplasia do tecido linfoide, tendo habitualmente um pior prognóstico (Said et al., 2009; Zainuddim, 2010). Um significante fator de risco para o desenvolvimento dos LDGCB é a imunodeficiência, comumente associada a infecções virais (Ferreri et al., 2009) e doenças autoimunes (Zintzaras et al., 2005).

3.5 Linfoma Não Hodgkin (LNH) e Paraoxonase (PON)

O estresse oxidativo é um importante fator etiológico para a carcinogênese (Goswami et al., 2009), a qual resulta de uma série de eventos mutacionais que se acumulam ao longo do tempo (Lerario, 2008). O processo de disseminação de uma neoplasia é complexo e envolve uma

ação coordenada de um grande número de genes e respectivas vias de sinalização (Ramaswany et al., 2003; Witte et al., 2011).

A associação entre os polimorfismos no gene da *PON1* com o risco de desenvolvimento de câncer foi demonstrado por Kerridge e colaboradores. Indivíduos que sofreram exposição a pesticidas e apresentavam mutações no gene da *PON1* 192QR, desenvolveram LNH (Kerridge et al., 2002). No entanto, dados contraditórios foram obtidos por De Ross e colaboradores (2006), sugerindo mais estudos para caracterizar o papel dessas variantes na gênese dos linfomas (De Ross et al., 2006). Uma modesta associação entre a diminuição da atividade da enzima PON1 e o risco de LNH também foi observada ao avaliar o polimorfismo *PON1* 55LM (Agachan et al., 2005; De Ross et al., 2006).

Assim como a PON1, a expressão da PON2 também se encontra associada ao risco de desenvolvimento de LNH (Witte et al., 2011). Atuando intracelularmente, sugere-se que a superexpressão da PON2 contribua para o escape apoptótico das células tumorais e esteja relacionada ao mau prognóstico diante dos atuais regimes terapêuticos (Kang et al., 2010; Pise-Masison et al., 2002; Ross et al., 2003). Em contrapartida, a deficiência da PON2 é responsável pela desestabilização dessas mesmas células, contribuindo no mecanismo antitumoral (Witte et al., 2011).

Os genes relacionados ao metabolismo de OPs e a prevenção dos quadros de inflamação mediados pelo estresse oxidativo têm mostrado distribuição diferencial nas populações investigadas (Rossit et al., 2000; Kerridge et al., 2002). O conhecimento de tal distribuição permite minimizar o

efeito das variáveis ambientais e genéticas que interagem com as doenças, principalmente com os linfomas (Rossit et al., 2000; Skibola et al., 2007). Como demonstrado, é plausível que os polimorfismos no gene da *PON* sejam fatores chave na determinação de susceptibilidade ao câncer (Hussein et al., 2011). No entanto, o conjunto de resultados contraditórios demonstra a complexidade da questão, uma vez que a identificação de um genótipo desfavorável pode ser mascarada pela presença de outro gene não considerado (Rossit et al., 2000; Souza et al., 2011).

4. Métodos

4.1 Delineamento do Estudo

Foram incluídos 205 indivíduos, distribuídos em dois grupos: 101 pacientes portadores de Linfoma Difuso de Grandes Células B (LDGCB) e 104 indivíduos saudáveis.

A coleta de dados iniciou-se após a aprovação da pesquisa pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), em 18 de Fevereiro de 2009 (nº 0058/09).

4.2 População e Local do Estudo

4.2.1 Pacientes

No período de fevereiro de 2009 a abril de 2011 foram considerados elegíveis 101 pacientes consecutivos do Serviço de Hematologia e Hemoterapia do HCFMUSP, com diagnóstico recente de LDGCB. Desses pacientes, em 11 (10,9%) o diagnóstico não foi confirmado; 10 (9,9%) não puderam ser acompanhados devido à perda do seguimento ambulatorial e; 2 (1,9%) eram portadores do vírus HIV.

Neste sentido, a população do estudo foi constituída por 78 pacientes, os quais tiveram suas amostras de sangue colhidas em quatro momentos: T0) após diagnóstico e antes do primeiro ciclo de quimioterapia (QT); T1) entre o primeiro e segundo ciclo de QT; T2) após o quarto ciclo de QT e; T3) ao término do último ciclo de QT.

Este grupo, que se encontrava em jejum de 8-12 horas, ao momento da coleta de amostras, foi composto por 38 homens (48,7%) e 40 mulheres

(51,3%), com idade variando entre 18 e 85 anos (mediana de 60 anos; média ± desvio padrão: 57,5 ± 15,9 anos).

4.2.2 Indivíduos Saudáveis

O grupo controle foi constituído por 104 indivíduos saudáveis, doadores de sangue na Fundação Pró-Sangue / Hemocentro de São Paulo (FPS/HSP). Este grupo foi composto por 64 homens (61,5%) e 40 mulheres (38,5%), com idade variando entre 20 e 65 anos (mediana de 40 anos; média ± desvio padrão: 41,8 ± 9,8 anos).

4.3 Critérios de Seleção e Exclusão

Participaram do estudo indivíduos de ambos os sexos, diagnosticados com LDGCB, comprovado por exame anátomo patológico, realizado pelo Serviço de Hematologia e Hemoterapia do HCFMUSP, em conformidade com os critérios da Organização Mundial de Saúde (Jaffe et al., 2001).

Os critérios de exclusão englobaram indivíduos que apresentaram um dos seguintes perfis clínicos: história de transformação de linfoma indolente prévio, submetidos a algum tratamento quimioterápico anterior e portadores do vírus HIV.

Uma vez selecionados, todos os participantes obtiveram explicações acerca das etapas da pesquisa e foram orientados a ler e assinar o termo de consentimento livre e informado (ANEXO 1).

4.4 Reagentes

Reagentes utilizados na extração do DNA genômico: sacarose e Tris (Sigma Chemical CO – St. Louis, EUA), EDTA e proteinase K (Gibco/ BRL – Grand Island, NY, USA), etanol P.A. (Merck – Darmstadt, Germany).

Reagentes utilizados na PCR: *primers* obtidos da Operon Biotechnologies (Cologne, Germany); Taq DNA polimerase, dNTPs e tampão de PCR, marcadores de peso molecular de 50 pb adquirido da Invitrogen (Carlsbad - CA, EUA). As enzimas de restrição *Hinf I* e *Fnu4HI* foram adquiridas da Pharmacia Biotech (Uppsala, Suécia) e da New England Biolabs (Beverly – Ma, EUA), respectivamente. Os materiais utilizados para eletroforese e todos os outros reagentes empregados eram puros para análise.

Reagentes utilizados na determinação da atividade da PON1: *paraoxon*, acetato de fenila, cloreto de cálcio e Tris (Sigma Chemical CO – St. Louis, EUA), HCl (Merck – Darmstadt, Germany).

Reagentes utilizados na pesquisa de anticorpos anti-LDL oxidada: tampão fosfato salino, sulfato de cobre, gelatina e EDTA (Gibco/ BRL – Grand Island, NY, USA), IgG (Thermo Scientific, Rockfordm IL), 3-3’-5-5’ tetrametilbenzidina (Sigma Chemical CO –St. Louis, EUA), Ácido Sulfúrico (Merck – Darmstadt, Germany).

4 .5 Amostras biológicas

As amostras de sangue (15 mL) dos pacientes e indivíduos saudáveis foram coletadas de veia periférica, após jejum de 8-12 horas, em tubos com e sem anticoagulante EDTA, por meio de sistema a vácuo (Vaccutainer ®). Após a coleta, os tubos foram mantidos no gelo, a 0ºC, sendo centrifugados a 420 g por 15 minutos a 8ºC, para a obtenção do soro e do plasma (armazenados a -80ºC, até o uso). O sangue colhido com EDTA foi utilizado para a extração do DNA genômico a partir dos leucócitos.

4.6 Técnicas Moleculares

4.6.1 Extração do DNA genômico

O DNA genômico foi extraído pelo método de precipitação salina, modificado por Miller e colaboradores (Miller et al., 1998). A separação dos leucócitos e purificação do DNA genômico foi realizada em duplicata para cada amostra.

As amostras de sangue (750 μL) foram submetidas à lise celular com 1 ml de tampão de lise (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, sacarose 34 mM, MgCl2 10 mM, Triton X-100 1%). Após a centrifugação por 10 minutos a 1.700 g, a temperatura de 4ºC, obteve-se o sedimento de leucócitos. Os leucócitos foram novamente ressuspensos em tampão de lise e centrifugados por 5 minutos a 960 g a temperatura ambiente.

Após a remoção do sobrenadante, o sedimento foi ressuspenso em 500 μL de tampão TEN (Tris-HCl 10 mM, pH 8,2, EDTA 2 mM, NaCl 400

mM), mais 5 μL de SDS 10% e 3 μL de proteinase K (2 mg/ml), homogeneizando-se e incubando-se a mistura por 1 hora a 56ºC, visando a completa digestão das células. Adicionou-se, 150 μL de NaCl saturado, agitando-se vigorosamente por 15 segundos e sedimentando-se as proteínas celulares, através da centrifugação por 10 minutos a 960 g.

O DNA presente no sobrenadante foi isolado e purificado, por precipitação, em 600 μL de álcool isopropílico, seguido da centrifugação por 5 minutos a 960 g. Em seguida, o DNA foi lavado com etanol 70%, a fim de remover o excesso de sal e submetido à secagem por 10 minutos em centrífuga à vácuo modelo Speed Vac AES1010 (Savant Instruments - Farmingdale, NY, EUA). Finalmente reidratado e ressuspenso em 100 μL de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8, EDTA 1 mM).

4.6.2 Avaliação eletroforética e quantificação do DNA genômico

A integridade das amostras do DNA genômico foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1%. O gel com 5 mm de espessura e medindo 7 x 15 cm continha brometo de etídeo (0,5 μg/ml), que se intercala entre os nucleotídeos formando um complexo fluorescente mediante exposição à luz ultravioleta. O tampão utilizado, durante a eletroforese, foi o TAE (Tris 40 mM, acetato de sódio 5 mM e EDTA 1 mM). A separação eletroforética foi realizada a 100 V, por 40 minutos, utilizando fonte modelo PowerPac P300 (Bio-Rad, USA). Após eletroforese, as bandas de DNA foram visualizadas em sistema de documentação de géis VDS Image Master, Pharmacia Biotech (Uppsala, Suécia).

A quantificação do DNA genômico e a análise do grau de pureza, avaliada pela relação $A_{260/280}$, foram estimadas a partir da leitura da densidade óptica por espectrofotometria (Spectrophotometer ND1000 - Thermo Scientific - Wilmington DE, USA). As amostras foram estocadas em alíquotas de 100 μl à -20ºC até o uso.

4.6.3 Análise dos polimorfismos 192QR e 55LM no gene da *PON1*

A genotipagem dos polimorfismos foi realizada por meio da amplificação de fragmentos específicos, para cada região pesquisada, seguida da digestão por enzimas de restrição adequadas, permitindo a diferenciação dos possíveis genótipos de cada polimorfismo estudado (análise do polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição - RFLP).

Conforme metodologia descrita por Motti e colaboradores (2001), modificada, foi possível analisar os polimorfismos *PON1 (*192QR e 55LM).

A PCR multiplex utilizou *primers* desenhados de modo a introduzir um sítio de reconhecimento para *Hinf I*, em um alelo de cada produto da PCR. Esta estratégia permitiu a identificação simultânea dos dois polimorfismos da *PON1* em um único ensaio de amplificação seguido da análise de restrição (Motti et al., 2001).

Os produtos amplificados possuíam 111 pb e 144 pb, para os polimorfismos *PON1* 192 e *PON1* 55, respectivamente. Após a digestão com *Hinf I*, o fragmento de 111 pb gerou os fragmentos de 77 pb e 34 pb, representado pelo alelo R; o fragmento de 144 pb apresentou os fragmentos

de 122 pb e 22 pb, representado pelo alelo L. As sequências de *primers* (Motti et al., 2001) utilizadas encontram-se na tabela 2.

Tabela 2. Sequências 5'→3' de *primers* utilizadas na determinação dos polimorfismos 55LM e 192QR, no gene da *PON1*

***PON1* 55F**	GAG TGA TGT ATA GCC CCA GTT TC
***PON1* 55R**	AGT CCA TTA GGC AGT ATC TCCg*;
***PON1* 192F**	TTG AAT GAT ATT GTT GCT GTG GGA CCT GAG
***PON1* 192R**	CGA CCA CGC TAA ACC CAA ATA CAT CTC CCA GaA;
***PON2* 311**	GGT TCT CCG CAT CCA GAA CAT TgaA;
***PON2* 311**	TGT TAA GaT ATC GCA CTa TCA TGC C.

*Letras minúsculas representam nucleotídeos despareados.

As amostras de DNA genômico de cada indivíduo foram submetidas à PCR em uma reação feita em volume de amplificação de 25 μl contendo Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, pH 8,3; $MgCl_2$ 7 mM; 600 μM de cada nucleotídeo trifosfato; 0,16 μM de cada *primer PON1* 192; 0,16 μM de cada *primer PON1* 55, 1 U de Taq polimerase e 1 μg de DNA genômico. A amplificação envolveu a desnaturação inicial das amostras (95ºC por 5 minutos), seguida de 40 ciclos que incluem a desnaturação (94ºC por 1 minuto), anelamento (61ºC por 45 segundos) e extensão (72ºC por 45 segundos). O termociclador empregado foi um Thermocycler T3000 – Biometra (Alemanha).

Os produtos da PCR foram digeridos por 16 horas a 37ºC com 2 U de enzima Hinf I, preparada em tampão Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, NaCl 60 mM, MgCl2 10 mM, β-mercapto etanol 1mM.

Após amplificação e digestão das amostras, as mesmas foram avaliadas em gel de agarose a 4% (contendo agarose em tampão TBE 0,5x), aplicando-se 5 μL de cada amostra nos poços do gel. Foram também aplicados no gel, 5 μL de marcador de peso molecular de 50 pb e amostras amplificadas com genótipo conhecido. A separação foi realizada empregando-se uma corrida de 60 minutos a 60 W constantes.

A posterior observação das bandas foi obtida por meio do sistema de documentação de géis VDS Image Master, Pharmacia Biotech (Uppsala, Suécia). A figura 3 mostra esquematicamente os possíveis perfis eletroforéticos de produtos amplificados.

Produto Amplificado *PON1* 55 (144 pb)	**Genótipos**		
Fragmento digerido	**LL**	**LM**	**MM**
144 pb		▬	▬
122 pb	▬	▬	
22 pb			
Produto Amplificado *PON1* 192 (111 pb)	**Genótipos**		
Fragmento digerido	**QQ**	**QR**	**RR**
111 pb		▬	
77 pb	▬	▬	▬
34 pb			

Figura 3. Esquema dos perfis eletroforéticos dos produtos amplificados dos polimorfismos 55LM e 192QR, no gene da *PON1* (multiplex). Os fragmentos obtidos após digestão com *Hinf I*, 144 pb e 111 pb, referem-se aos genótipos normais; os fragmentos 122pb e 77 pb correspondem ao genótipo mutado. Os fragmentos 34 pb e 22pb não são visíveis no gel.

4.6.4 Análise do polimorfismo 148AG no gene da *PON2*

A genotipagem do códon 148 da *PON2* foi realizada por PCR, conforme descrito por Hegele e colaboradores (1997). As sequências de *primers* empregadas encontram-se na tabela 3.

Tabela 3. Sequências 5'→3' de *primers* utilizadas na determinação do polimorfismo 148AG, no gene da *PON2*

***PON2* 148F**	AGT GGA AAT TTT TAA ATT TGA AGC AG
***PON2* 148R**	TTG TTT GCA AAT GCT GGG GAT

Amostras de DNA genômico foram submetidas à PCR em uma reação feita em volume de amplificação de 25 μl, contendo Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, pH 8,3; $MgCl_2$ 7 mM; 600 μM de cada nucleotídeo trifosfato; 0,16 μM de cada *primer* de *PON2* 148; 1 U de Taq polimerase e 1 μg de DNA genômico. A amplificação envolveu uma desnaturação inicial das amostras à 95ºC por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de 94ºC por 1 minuto (desnaturação), 61ºC por 45 segundos (anelamento) e 72ºC por 45 segundos (extensão) por 45 segundos (anelamento) e 72ºC por 45 segundos (extensão). O termociclador empregado foi um Thermocycler T3000 – Biometra (Alemanha).

Os produtos da PCR foram então digeridos por 16 horas a 37ºC com 1U de enzima Fnu4H I, preparada em tampão Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, NaCl 60 mM, MgCl2 10 mM, β-mercapto etanol 1mM.

O produto amplificado possuía 130 pb. Assim, o fragmento digerido com a enzima, apresentou dois fragmentos menores que codificaram o alelo

PON2 148A, e um único fragmento para o amplicon codificando para o alelo 148G (Hegele et al.,1997).

As amostras amplificadas e digeridas foram avaliadas em gel de agarose a 4% (contendo agarose em tampão TBE 0,5x), aplicando-se 5 μL de cada amostra nos poços do gel. Foram também aplicados no gel, 5 μL de marcador de peso molecular de 50 pb e amostras amplificadas com genótipo conhecido para esta alteração.

A figura 4 representa os possíveis genótipos para o polimorfismo *PON2* 148AG.

Produto Amplificado *PON2* 148 (130 pb)	**Genótipos**		
Fragmento digerido	**AA**	**AG**	**GG**
Fragmento maior		▬	▬
Fragmento maior	▬		▬

Figura 4. Esquema do perfil eletroforético do produto amplificado do polimorfismo 148AG, no gene da *PON2*

4.6.5 Análise do polimorfismo 311SC no gene da *PON2*

Segundo metodologia descrita por Motti e colaboradores (2001), modificada, o polimorfismo *PON2* 311 foi determinado. As sequências de *primers* (Motti et al., 2001) utilizadas encontram-se na tabela 4.

Tabela 4. Sequências 5'→3' de *primers* utilizadas na determinação do polimorfismo 311SC, no gene da *PON2*

***PON2* 311F**	GGT TCT CCG CAT CCA GAA CAT TgaA
***PON2* 311R**	TGT TAA GaT ATC GCA TCA TGC C

*Letras minúsculas representam nucleotídeos despareados

Amostras de DNA genômico foram submetidas à PCR em uma reação feita em volume de amplificação de 25 μl contendo Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, pH 8,3; $MgCl_2$ 7 mM; 600 μM de cada nucleotídeo trifosfato; 0,16 μM de cada *primer* da *PON2* 311; 1 U de Taq polimerase e 1 μg de DNA genômico. A amplificação envolveu a desnaturação inicial das amostras (95ºC por 5 minutos), seguida de 40 ciclos: desnaturação (94ºC por 1 minuto), anelamento (61ºC por 45 segundos) e extensão (72ºC por 45 segundos). O termociclador empregado foi um Thermocycler T3000 – Biometra (Alemanha).

Os produtos da PCR foram digeridos por 16 horas a 37ºC com 2 U de enzima *Hinf I*, preparada em tampão Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, NaCl 60 mM, MgCl2 10 mM, β-mercapto etanol 1mM. O produto amplificado possuía 196 pb. Após a digestão com *Hinf I*, os fragmentos originados foram 173 pb e 23 pb, representado pelo alelo S.

Após amplificação e digestão das amostras, as mesmas foram avaliadas em gel de poliacrilamida não desnaturante (Bassam et al., 1991), aplicando-se 10 μL de cada amostra nos poços do gel e 5 μL de marcador de peso molecular de 50 pb. A separação foi realizada empregando-se uma corrida de 50 minutos a 120 W constantes.

A figura 5 demonstra os possíveis genótipos para o polimorfismo da *PON2* 311SC.

Produto Amplificado *PON2* 311 (196 pb)	**Genótipos**		
Fragmento digerido	**SS**	**SC**	**CC**
196pb		▬	▬
173 pb	▬	▬	
23 pb			

Figura 5. Esquema do perfil eletroforético do produto amplificado do polimorfismo 311 SC, no gene da *PON2*

4.7 Determinações bioquímicas dos pacientes e indivíduos saudáveis

Determinaram-se as concentrações séricas de colesterol total (CT), as frações de HDL e LDL, triglicérideos (TG) e apolipoproteínas (Apo) A1, A2, B e E. Estes exames foram realizados no Serviço de Bioquímica Clínica da Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da FMUSP, empregando-se um analisador automático Modular Analytics P-800 (Roche/Hitachi) e kits compatíveis (CHOL, HDL-C Plus e TG 2ª geração).

O método empregado para as determinações de TG, CT, frações de HDL e VLDL foi o enzimático colorimétrico automatizado. Para a determinação da LDL, o método utilizado foi o cinético automatizado. As Apo (A1 e B) e Apo (A2 e E) foram mensuradas por Turbidimetria e Nefelometria, respectivamente. Os materiais analisados tiveram seus resultados expressos em mg/dL. A tabela 5 apresenta os valores de referência para estes analitos.

Tabela 5. Valores de referência de lipídeos plasmáticos

Valores de Referência (mg/dL)			
Colesterol Total (CT)	< 200		Desejável
	200-239		Limítrofe
	≥ 240		Elevado
HDL	> 55		Desejável
LDL	< 130		Desejável
	130-159		Limítrofe
	≥ 159		Elevado
VLDL	< 40		Desejável
Triglicérides (TG)	< 150		Desejável
	150-200		Limítrofe
	200-499		Elevado
	> 500		Alto Risco
	Homens	**Mulheres**	
Apolipoproteína (Apo)			
A1	115-190	115-220	
A2	26-51	26-51	
B	70-160	60-150	
E	2,3-6,3	2,3-6,3	

FONTE: Serviço de Bioquímica Clínica da Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da FMUSP

4.8 Atividade Enzimática da Paraoxonase (PON)

4.8.1 Determinação da atividade arilesterase (ARE) da PON1 sérica

A determinação da atividade arilesterase da PON1 foi realizada, conforme método de Eckerson (1983) modificado, que utilizou como substrato o acetato de fenila no meio reacional (Sigma-Aldrich Chemical CO–St. Louis, EUA). A hidrólise enzimática do acetato de fenila libera fenol,

cuja taxa de formação foi determinada por espectrofotometria, modo comumente empregado para avaliar a atividade arilesterase da PON1.

O ensaio, realizado em duplicata para cada amostra avaliada, iniciou-se com a adição de 100 μL de soro (diluição 1:3) em 3 mL da mistura tampão/substrato [(acetato de fenila (1,0 mmol/l) com tampão Tris-HCL (20 mmol/L) contendo $CaCl_2$ (2,0 mmol/L), pH 8,0]. O substrato foi adicionado ao tampão previamente ao início da reação e a cinética aferida em cubetas de quartzo (1 cm). Para a correção da hidrólise espontânea do acetato de fenila inclui-se um branco constituído pelo tampão Tris-HCL/$CaCl_2$/acetato de fenila sem o soro.

A cinética da reação de formação do fenol foi monitorada em espectrofotômetro de modelo DU-70 (Beckman Instruments Inc-Palo Alto, CA, USA). As leituras da absorbância utilizavam comprimento de onda igual a 270nm, ocorriam a 25 ºC em intervalos de 30 segundos, durante 5 minutos, Para o cálculo da atividade considerou-se o coeficiente de extinção molar (Δ) de 1,31 x 10^3 $M^{-1}.cm^{-1}$. O resultado foi expresso em U/mL, sendo que 1 unidade da arilesterase corresponde a 1 μmol de acetato de fenila hidrolisado por minuto, por mL de soro.

Cálculo do Fator:

$$FATOR = \frac{VTR(mL)}{\varepsilon_{270} \times VA(mL) \times E(cm)}$$

ε_{270} = 1,31 x 103 $M^{-1}.cm^{-1}$
VTR (volume total da reação) = 3 mL
VA (volume da amostra) = 0,005 mL
E (espessura da cubeta) = 1 cm

Substituindo os valores e ajustando para as unidades internacionais temos:

Fator = 458

Cálculo da atividade:

Atividade arilesterase = Fator x Δabs/min = 1310 x diluição, onde Δabs é igual a média da variação das absorbâncias medidas a cada 30 segundos.

4.8.2 Determinação da atividade paraoxonase da PON1 sérica

A atividade basal da PON1 sérica foi determinada conforme métodos de Senti e colaboradores (2003) e Agachan e colaboradores (2004), modificados, empregando-se, como substrato o *paraoxon* (O,O dietil – O – paranitrofenol fosfato) (Sigma-Aldrich Chemical CO – St. Louis, EUA). A hidrólise enzimática do paraoixon libera *p*-nitrofenol, cuja taxa de formação foi avaliada por espectrofotometria.

O ensaio foi realizado em duplicata para cada amostra avaliada, inicou-se pela adição de 25 μL (diluição 1:3) de soro em 500 μL da mistura tampão/substrato (Tris-HCl 0,1M, pH 8,05, contendo $CaCl_2$ e *paraoxon* 5,5 mmol/L) seguida da transferência de 320 μL da solução, com o soro, para um poço de microplaca de 96 poços (Costar, EUA).

A velocidade de formação do *p*-nitrofenol foi monitorada através das leituras da absorbância em 405nm, a 37 ºC, durante 10 minutos, em leitor de microplacas (Microplate Reader, Benchmark, Bio-RAD, Hercules – Ca, EUA). O resultado foi expresso em U/L (onde 1U/L é definida como 1 μLmol de *p*-nitrofenol formada por minuto por litro de soro), empregando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar do *p*-nitrofenol (18,05 x 10^3). As

equações abaixo detalham os cálculos do fator e da atividade da PON1 sérica.

Cálculo do Fator:

$$FATOR = \frac{VTR(mL)}{\varepsilon_{405} \times VA(mL) \times E(cm)}$$

ε_{405}= 18,050L $M^{-1}.cm^{-1}$

VTR (volume total da reação) = 525μL

VA (volume da amostra) = 25μL

E (espessura da cubeta) = 1 cm

Substituindo os valores e ajustando para as unidades internacionais temos:

Fator = 1163,43 nMol mL^{-1}

Cálculo da atividade:

Atividade paraoxonase = Fator x Δabs/min = 1163,43 x Δabs nMol mL^{-1}, onde Δabs é igual a média da variação das absorbâncias medidas a cada 1 minuto.

4.9 Pesquisa de autoanticorpos anti-oxLDL

Conforme metodologia previamente descrita por Fernvik et al (2004) e Brandão et al (2010) detectou-se a presença de autoanticorpos anti-oxLDL por meio da análise do plasma de pacientes e de um pool de indivíduos saudáveis normolipidêmicos. Este experimento foi realizado sob supervisão do grupo do prof. Magnus Gidlund, responsável pelo Laboratório de Imunofisiopatologia do Instituto de Ciências Biomédicas IV da Universidade de São Paulo.

A preparação da LDL e da LDL oxidada (oxLDL) envolveu a obtenção do plasma, após ultracentrifugação (1000 g por 15 minutos a 4ºC), seguido da diálise com tampão fosfato salino (PBS; pH 7,4), livre de EDTA, e da incubação com sulfato de cobre ($CuSO_4$) (20 μM) por 18 horas à 37ºC. Empregou-se a ultracentrífuga Beckman L8 (Palo Alto, CA). Após este período a incubação, foi bloqueado com EDTA 1mM.

A fim de determinar auto anticorpos contra oxLDL, placas de 96 poços (Nunc-Immuno) foram sensibilizadas com oxLDL (7,5 ug/mL; 50 μL por poço), resuspensas em tampão cabonato de sódio (0,1 mol/L; pH 9,6) e incubadas por 24 horas a 4ºC. Após o ciclo de lavagens com PBS, as placas foram bloqueadas com solução de gelatina a 3% (Gibco, EUA) e mantidas, a temperatura ambiente, por 2 horas.

Em sequência, lavou-se as placas 4 vezes com PBS. Os poços receberam, em triplicata, 50 μL das amostras de soro diluídas 1:400 em PBS. Após 2 horas de incubação, a 37ºC, as placas foram novamente lavadas (4 vezes) com 100 μL de PBS contendo Tween 20 (0,05%) e encaminhadas à incubação com 50 μL de conjugado, por 2 horas em temperatura ambiente. A Imunoglobulina antihumana G (IgG) marcada com peroxidase (Thermo Scientific, Rockford, IL) na diluição 1:2000, foi utilizada como conjugado. Outros 4 ciclos de lavagem das placas, com PBS, ocorreram.

O processo de revelação foi realizado por meio da transferência de 75 μL de solução contendo TMB (250 μL de 3-3', 5-5' tetrametilbenzidina 6,5% em DMSO; Sigma, St Louis, MO) e 10 μL de peróxido de hidrogêncio (H_2O_2),

substrato para enzima peroxidase, diluída em 12 mL de tampão citrato (0,1; pH 5,5) durante 5 minutos a temperatura ambiente. A reação foi interrompida, após 10 minutos, com adição de 25 μL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) (2 mol/L) (Merck, Alemanha). A cinética de formação de conjugados, determinada pela variação na absorbância, foi avaliada por espectrofotometria (leitor Multiskan Tecan), utilizando comprimento de onda igual a 450 nm.

4.10 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa SPSS 10.01 para Windows e os resultados obtidos foram apresentados como média ± desvio padrão (dp) ou mediana (mínimo-máximo).

As frequências gênicas e genotípicas dos polimorfismos 192QR, 55LM, no gene da *PON1,* e 148AG e 311CS, no gene da *PON2,* foram estimadas e o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) calculado através do teste de Qui-Quadrado (χ^2). O teste *t* de Student foi utilizado para comparar as variáveis quantitativas e os genótipos, seguido pelo teste de Bonferroni para determinar as diferenças inter e intragrupos.

As variáveis bioquímicas foram analisadas pelo teste de correlação de Pearson e a influência dos polimorfismos nos genes da *PON1 e* da *PON2*, sob os valores obtidos da atividade enzimática arilesterase e paraoxonase, calculados pelo teste de análise de variância (ANOVA).

Foram consideradas significantes todas as situações nas quais o nível descritivo de significância foi inferior a 5% ($p < 0,05$).

5. Resultados

5.1 Características clínicas e demográficas das populações do estudo

A população do presente estudo foi composta de 78 (43%) pacientes com LDGCB (grupo caso) e 104 (57%) indivíduos saudáveis (grupo controle). Não foram constatadas diferenças na distribuição de participantes do sexo feminino ou masculino entre os grupos estudados (Teste Qui-Quadrado (χ^2); p>0,05).

Com idades compreendidas entre os 20 e 65 anos (mediana de 40 anos; média ± desvio padrão: 41,8 ± 9,8 anos) o grupo controle apresentou valores de idade significativamente menores (Anexo 12) quando comparado ao grupo caso (mediana de 60 anos; média ± desvio padrão: 57,5 ± 15,9) (Teste *t* de Student; Figura 6).

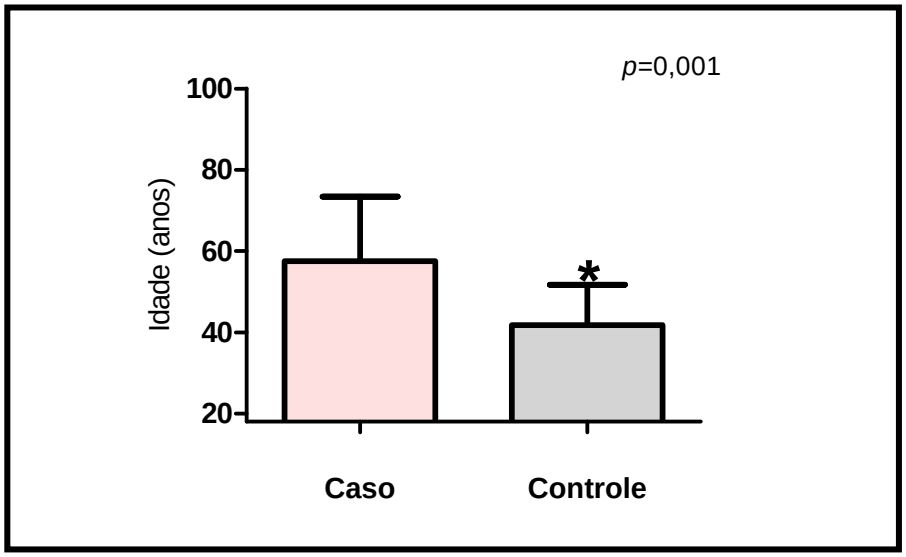

Figura 6. Distribuição da idade (anos) entre os grupos caso e controle

No tocante ao sistema de estadiamento clínico Ann Arbor, proposto para indivíduos com diagnóstico de linfoma, 31 (39,7%) pacientes

encontravam-se em estadio IV. O estadio II apresentou 16 (20,5%) dos pacientes avaliados, seguido dos estadios I (19,2%) e III (16,7%). Em 3 (3,8%) pacientes não haviam dados disponíveis relacionados ao estadiamento (Figura 7).

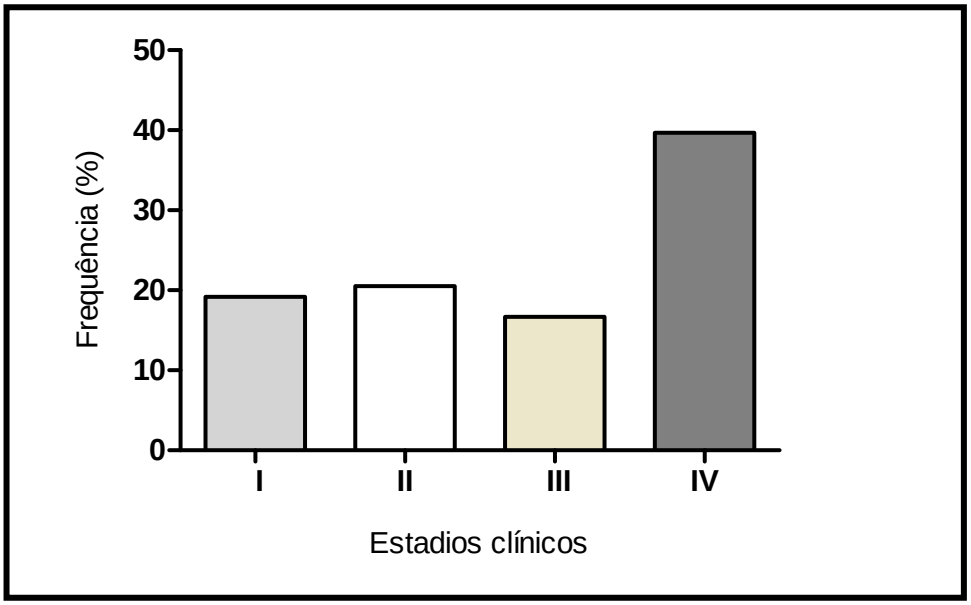

Figura 7. Distribuição percentual dos pacientes com LDGCB (n=78) de acordo com o sistema de classificação Ann Arbor

Resultando da análise dos fatores sexo versus estadio clínico, não foram encontradas diferenças estatísticas significantes ($p>0,05$). Classificados, em grande maioria no estadio IV, 13 (41,9%) eram mulheres e 18 (51,1%) eram homens (Teste Qui-Quadrado (χ^2); $p>0,05$). Os grupos de estadiamento também não diferiram com relação à variável idade ($p>0,05$).

O anexo 9 lista os dados de estadiamento clínico e idade dos pacientes com LDGCB.

5.2 Distribuição dos genótipos e frequência alélica dos polimorfismos 192QR e 55LM, no gene da PON1, e 148AG e 311SC, no gene da PON2.

A partir da distribuição dos genótipos e frequência relativa dos alelos foi estimado o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), para cada um dos polimorfismos nos genes da *PON1* e *PON2,* nos grupos caso (anexo 2) e controle (anexo 11). Verificou-se que os polimorfismos, em ambos os genes, apresentavam valores em acordo com os esperados para o EHW (Teste Qui-Quadrado (χ^2); Tabelas 6 e 7).

Tabela 6. Distribuição genotípica e frequência de alelos para os polimorfismos 192QR e 55LM no gene da *PON1*, nos grupos caso (n=78) e controle (n=104)

	Genótipos (%)			**Frequência Alélica (%)**	
Grupos	**QQ**	**QR**	**RR**	**Q**	**R**
Caso	53,2	31,2	15,6	0,69	0,31
Controle	51,0	29,8	19,2	0,66	0,34
	LL	**LM**	**MM**	**L**	**M**
Caso	53,2	36,4	10,4	0,71	0,29
Controle	47,1	37,5	15,4	0,66	0,34

Tabela 7. Distribuição genotípica e frequência de alelos para os polimorfismos 148AG e 311SC no gene da PON2, nos grupos caso (n=78) e controle (n=104)

	Genótipos (%)			Frequência Alélica (%)	
Grupos	**AA**	**AG**	**GG**	**A**	**G**
Caso	48,7	44,9	6,4	0,71	0,29
Controle	57,3	37,9	4,8	0,66	0,34
	SS	**SC**	**CC**	**S**	**C**
Caso	57,9	34,2	7,9	0,75	0,25
Controle	47,1	33,3	19,6	0,64	0,36

Os resultados apresentados nas tabelas 6 e 7 também demonstram que não houve diferença estatística na distribuição de genótipos e frequência de alelos entre os grupos de indivíduos estudados.

Em relação aos polimorfismos 192 e 55, no gene da *PON1,* os alelos Q (0,69 e 0,66%) e L (0,71 e 0,66%) apresentaram-se em maior frequência nos indivíduos com LDGCB e indivíduos saudáveis, respectivamente. Os genótipos 192QQ e 55LL, no gene da *PON1*, foram os mais comuns tanto nos portadores de LDGCB (51,0e 47,1% respectivamente) quanto nos indivíduos saudáveis (53,2%, para ambos os genótipos), seguidos dos genótipos 192QR e 55LM e pelos homozigotos de menor frequência, 192RR e 55MM.

Ao considerarmos os polimorfismos no gene da *PON2,* as isoformas 148AA e 311SS apresentaram maior frequência tanto no grupo caso (48,7 e 57,9%, respectivamente) quanto no grupo controle (57,3 e 47,1%, respectivamente), enquanto os heterozigotos 148AG e 311SC ocuparam a segunda posição, seguidos dos genótipos 148GG e 311CC. O alelo A (0,71

e 0,66%), para o polimorfismo da posição 148 foi o mais frequente em ambos os grupos de estudo, assim como o alelo S (0,75 e 0,64%), da posição 311 do gene.

Diferenças na distribuição genotípica dos polimorfismos da *PON1* e *PON2* em relação às variáveis, sexo e estadiamento clínico, não foram observadas (p>0,05). Por sua vez, no grupo caso, observou-se diferença estatística significativa em relação à idade, na análise do polimorfismo 55LM, no gene da *PON1* (Figura 8; ANOVA e Teste de Bonferroni). Portadores do genótipo 55MM apresentaram idade inferior (média ± desvio padrão: 47,6 ± 19,6 anos) quando comparados aos portadores dos genótipos 55LL (média ± desvio padrão: 55,5 ± 15,6 anos) e 55LM (média ± desvio padrão: 63,1 ± 13,7 anos).

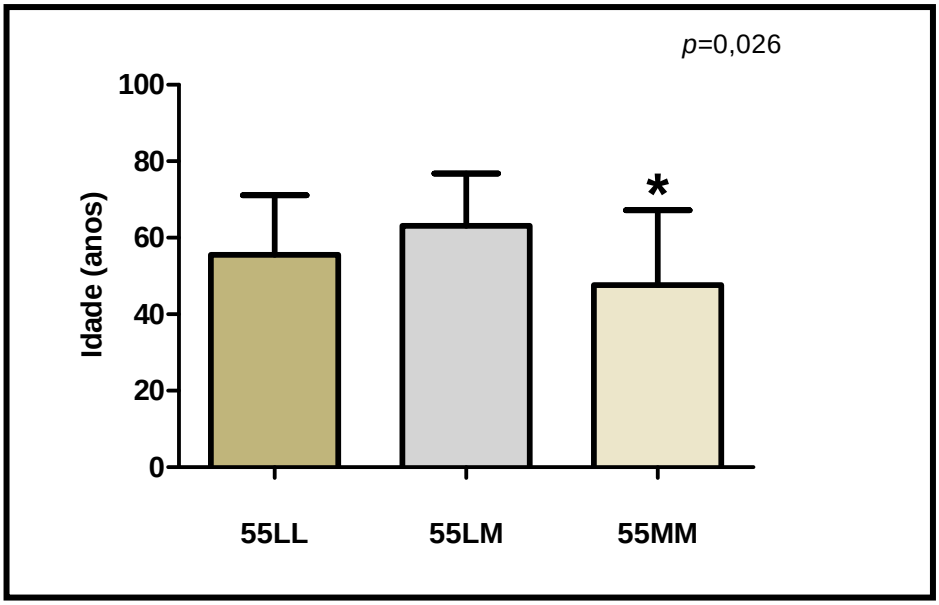

Figura 8. Associação entre o polimorfismo 55LM, no gene da *PON1,* com a idade (anos) em pacientes com LDGCB (n=78).

5.3 Concentração sérica de lipídeos

Os valores de referência dos lipídeos foram os mesmos empregados pelo Serviço de Bioquímica Clínica da Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da FMUSP.

As concentrações séricas de colesterol total (CT), triglicerídeos (TG), lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) e apolipoproteínas (apo) A1, A2, B e E não apresentaram médias distintas estatisticamente, em relação ao seu comportamento, durante os quatro momentos do tratamento quimioterápico (T0, T1, T2 eT3), nos indivíduos com LDGCB ($p>0,05$). Os valores das determinações lipídicas correspondentes a cada período avaliado estão dispostos nos Anexos 3-6.

Por sua vez, concentrações elevadas de TG foram observadas nos pacientes com LDGCB (50-995mg/dL) em relação aos participantes do grupo controle (<150-200mg/dL) ($p < 0,05$). De modo contrário, os níveis de HDL dos pacientes LDGCB foram significativamente inferiores ($p < 0,05$).

Através da análise de variância, não foi observada diferença estatística significativa entre os estadiamentos clínicos, dos indivíduos com LDGCB, e o perfil lipídico, determinado ao longo das avaliações ($p>0,05$).

Previamente ao tratamento quimioterápico (T0), os níveis de TG foram associados ao polimorfismo na posição 311, do gene da *PON2* (Figura 9; ANOVA). Indivíduos portadores do genótipo 311CC apresentaram valores médios de TG superiores (média $\pm$ desvio padrão: 271,3 $\pm$ 357,7 mg/dL) quando comparados aos indivíduos com genótipo 311SS (média $\pm$ desvio

padrão: 138,8 ± 83,4 mg/dL) e 311SC (média ± desvio padrão: 141,4 ± 56,1 U/mL).

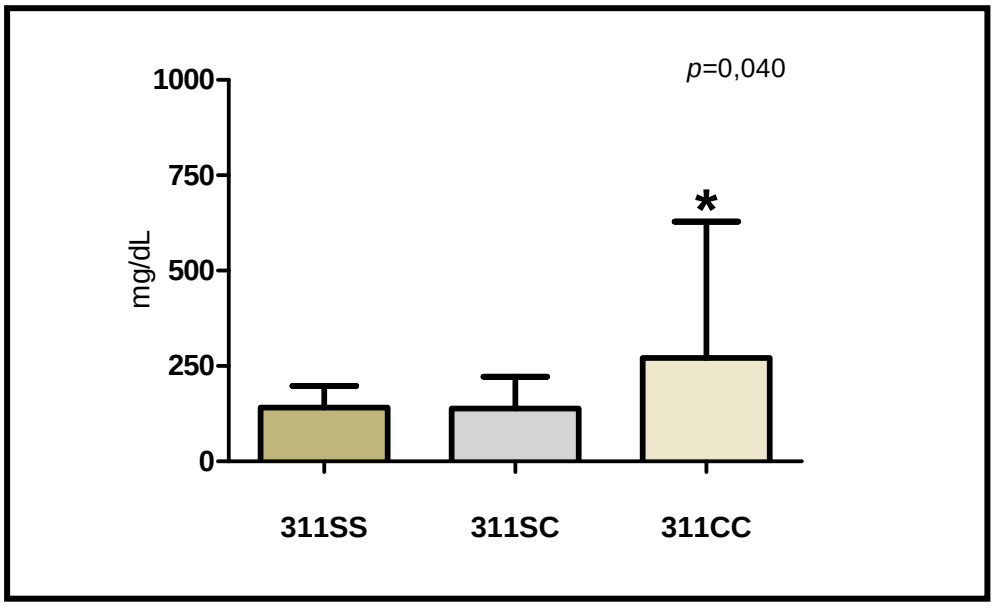

Figura 9. Influência do polimorfismo 311SC, no gene da *PON2*, sobre os níveis de triglicérideos (TG) em indivíduos portadores de LDGCB (n=78)

Diferenças significativas nas concentrações de TG e demais lipídeos, com relação aos polimorfismos do gene *PON1* (55LM e 192QR) e 148AG, no gene *PON2* não foram evidenciadas.

5.4 Análise descritiva da atividade arilesterase (ARE) e paraoxonase (PON)

A atividade sérica arilesterase (ARE) apresentou valores significativamente maiores entre os indivíduos saudáveis (mediana de 92; média ± desvio padrão: 91,7 ± 23,8 U/mL) quando comparados aos do grupo com LDGCB (mediana de 78; média ± desvio padrão: 78,3 ± 26,6 U/mL) nos

distintos momentos do tratamento quimioterápico. (Figura 10; Teste *t* de Student).

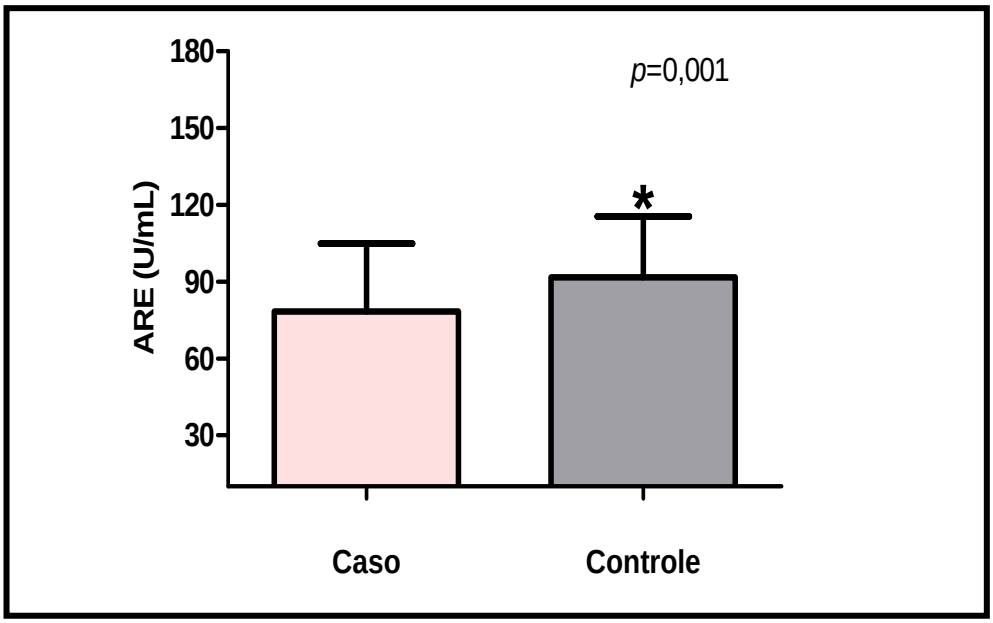

Figura 10. Atividade da enzima arilesterase no grupo caso (n= 78) e grupo controle (n= 104). Resultados expressos em U/mL.

Em termos da atividade da enzima paraoxonase (PON), expressa em µmoles de *p*-nitrofenol/min/mL de soro, nenhuma associação estatística foi encontrada entre os grupos caso (mediana de 86; média ± desvio padrão: 91,3 ± 57,1 U/L) e controle (mediana de 95; média ± desvio padrão: 98,6 ± 57,0 U/L) (Teste *t* de Student; p>0,05).

Em ambos os grupos, caso e controle, as médias de idade e estadiamento clínico não alteraram as atividades enzimáticas ARE e PON (p>0,05). No entanto, em relação à média basal da atividade PON, as mulheres com LDGCB apresentaram valores significativamente maiores (média ± desvio padrão: 105,4 ± 56,4 U/L) quando comparadas aos homens (média ± desvio padrão: 77,6 ± 55,2 U/L) (Figura 11; Teste *t* de Student).

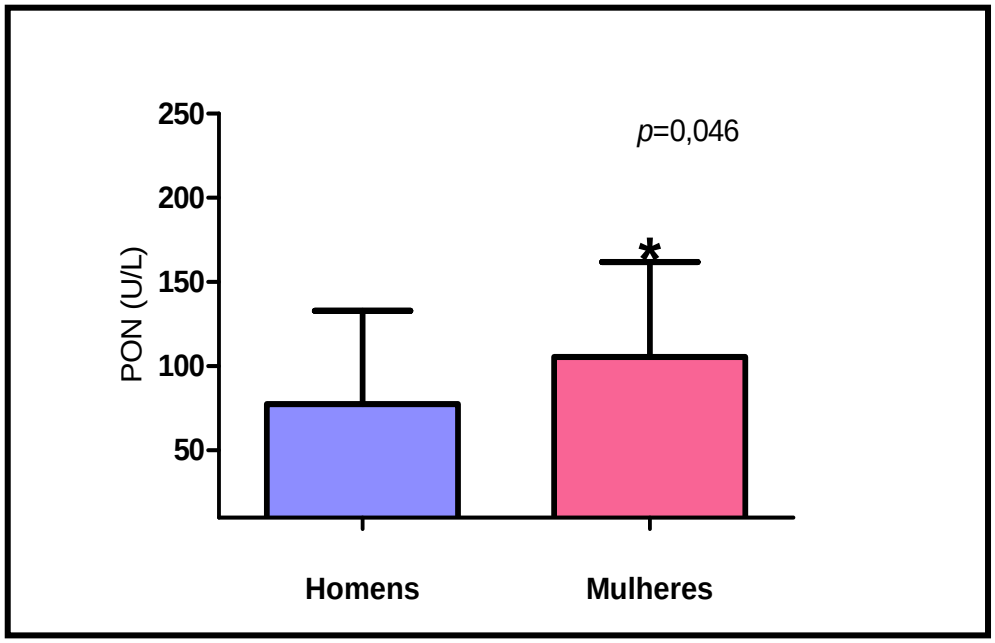

Figura 11. Atividade paraoxonase (PON) no soro de indivíduos com LDGCB. Homens (n=38); Mulheres (n=40)

Ao analisar a influência dos polimorfismos da *PON1* sobre a atividade ARE, indivíduos do grupo caso (média ± desvio padrão: 57,6 ± 13,7 U/mL) e do grupo controle (média ± desvio padrão: 77,6 ± 20,6 U/mL), portadores do genótipo 55MM, apresentaram valores médios de atividade menores quando comparados aos portadores dos genótipos 55LM e 55LL (Figura 12; ANOVA; Teste de Bonferroni).

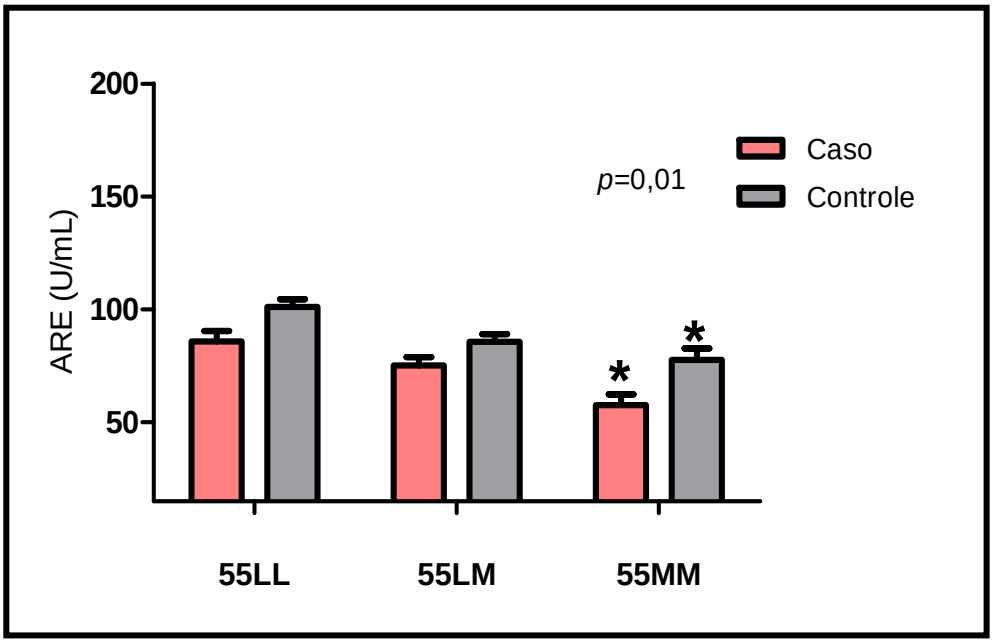

Figura 12. Influência do polimorfismo, na posição 55 do gene da *PON1* sobre a determinação da atividade arilesterase (ARE) nos grupos caso (n=78) e controle (n=104)

O polimorfismo *PON1* 55MM também foi associado à atividade PON ($p<0,05$) apenas entre os indivíduos saudáveis, os quais apresentaram média de atividade enzimática significativamente inferior quando comparados aos indivíduos portadores dos genótipos 55LM e 55LL (ANOVA; Teste de Bonferroni). A tabela 8 apresenta os valores (mínimo e máximo), média e desvio padrão referente a esta análise.

Tabela 8. Influência do polimorfismo, na posição 55, do gene da *PON1* sobre a determinação da atividade paraoxonase (PON), nos indivíduos saudáveis (n=104)

PON	Média	DP	Mínimo	Máximo	*p*
55LL	115,1	58,3	26	230	
55LM	65,6	43,4	19	143	0,001
55MM	61,9	40,6	23	123	

Atividade paraoxonase (PON), expressa em U/L. DP: Desvio padrão.

O polimorfismo *PON1* 192QR foi associado à atividade PON em ambos os grupos de estudo. Indivíduos com genótipo 192QQ apresentaram média de valores significativamente baixa, intermediária nos portadores do genótipo 192QR e com maior atividade entre os indivíduos com o genótipo 192RR (Figura 13; ANOVA; Teste de Bonferroni).

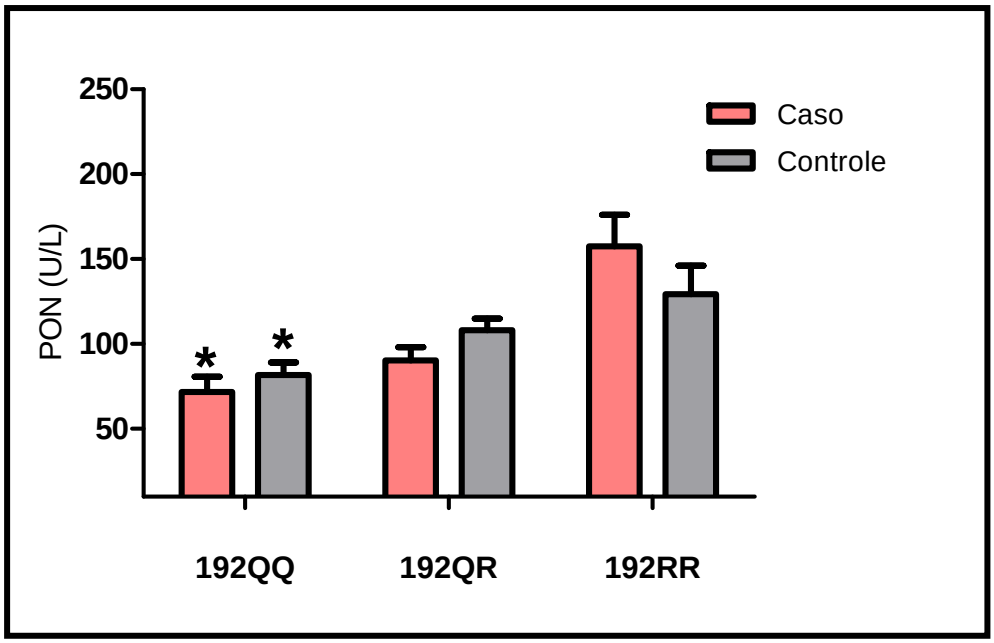

Figura 13. Influência do polimorfismo na posição 192 do gene da *PON1* sobre a determinação da atividade paraoxonase (PON) nos grupos caso (n=78; p=0,001) e controle (n=104; p=0,004)

Associação significativa estatisticamente foi encontrada entre o polimorfismo *PON2* 311SC e a atividade enzimática ARE nos indivíduos saudáveis, portadores do genótipo 311SS, os quais apresentaram médias de atividade menores com relação às médias dos indivíduos com genótipos 311SC e 311CC (Tabela 9; ANOVA; Teste de Bonferroni).

Tabela 9. Influência do polimorfismo, na posição 311 do gene da *PON1* sobre a determinação da atividade arilesterase (ARE), nos indivíduos saudáveis (n=104)

ARE	Média	DP	Mínimo	Máximo	*p*
311SS	86,9	24,1	13	137	
311SC	90,3	20,8	51	131	0,021
311CC	104,3	25,2	8	161	

5.5 Detecção de autoanticorpos anti-oxLDL

Os títulos de autoanticorpos anti-oxLDL foram analisados nos indivíduos com LDGCB, após diagnóstico e antes do primeiro ciclo de QT (T0) e entre o primeiro e o segundo ciclo de QT (T1). Os resultados obtidos estão demonstrados sob a forma de média ± desvio padrão (Figura 14; Tabela 10).

Tabela 10. Concentração de anti- oxLDL no soro de indivíduos com LDGCB em momentos distintos do tratamento quimioterápico

	N (%)	Média	DP	Mínimo	Máximo
oxLDL (T0)	76,9	0,49	0,18	0,11	1,17
oxLDL (T1)	67,9	0,48	0,17	0,24	1,07

Valores expressos em U/mL. Densidade óptica (D.O) λ 405nm

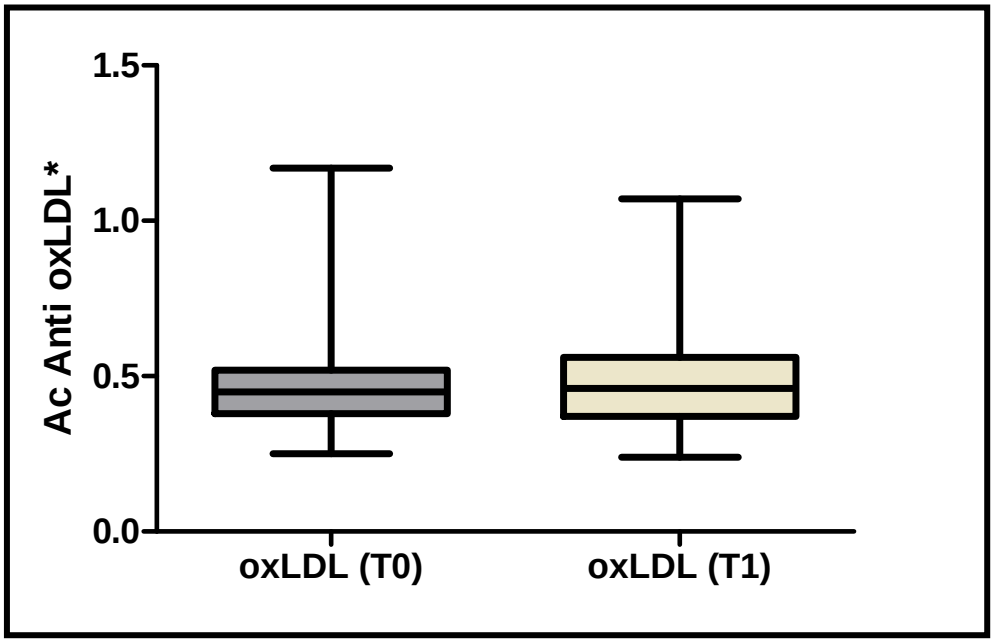

Figura 14. Concentração de anti-oxLDL no soro de indivíduos com LDGCB em momentos distintos do tratamento quimioterápico. *Densidade óptica (D.O) λ 405nm

As variáveis, idade, sexo e estadio clínico, não diferiram estatisticamente nesta análise (p>0,05).

Por sua vez, na análise genética, o polimorfismo *PON1* 55LM associou-se à concentração de anti-oxLDL. Portadores do genótipo 55MM (média ± desvio padrão: 0,40 ± 0,05 U/mL) diferiram estatisticamente dos indivíduos com genótipos 55LL (média ± desvio padrão: 0,45 ± 0,14 U/mL) e 55LM (média ± desvio padrão: 0,57 ± 0,24 U/mL, apresentando média de valores significativamente inferiores (Figura 15; Teste de Bonferroni). O polimorfismo *PON1* 192QR e as variantes de *PON2* (148AG e 311SC) não foram associado às taxas de autoanticorpos anti-oxLDL (p>0,05), assim como as atividades enzimáticas ARE e PON, e perfis lipídicos.

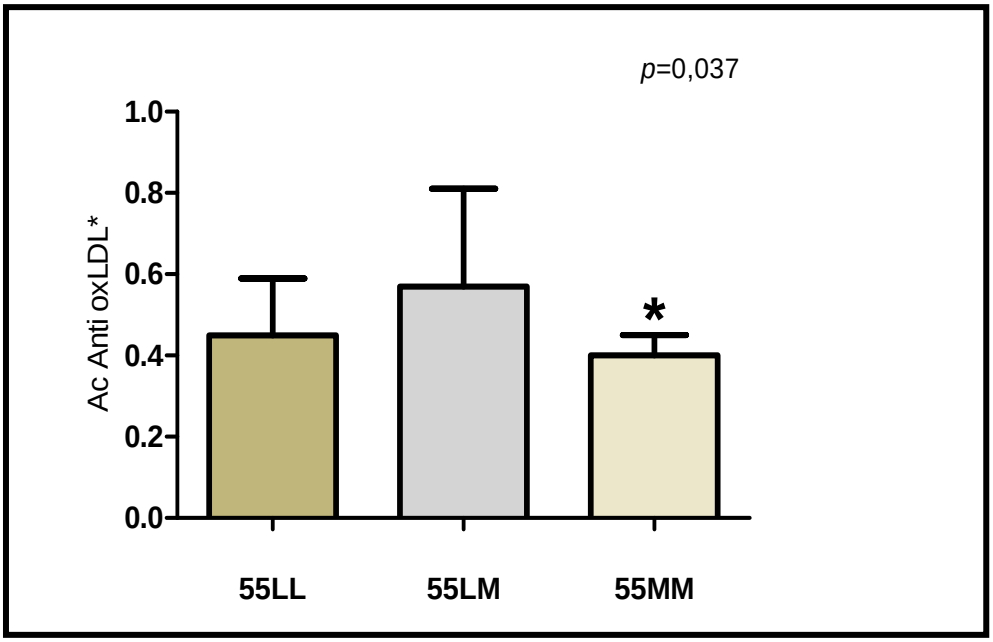

Figura 15. Influência do polimorfismo 55LM, no gene da *PON1,* sobre a concentração de autoanticorpos anti-oxLDL. Valores expressos em U/mL. * Densidade óptica (D.O) λ405nm

6. Discussão

A distribuição e frequência dos polimorfismos nos genes da *PON1* (192QR e 55LM) e *PON2* (148AG e 311SC) e a influência dessas variantes nas atividades enzimáticas (arilesterase e paraoxonase), perfil lipídico e níveis de auto anticorpos ox-LDL foram determinadas, numa amostra da população brasileira, no presente estudo.

Embora não tenham diferido estatisticamente, um percentual maior de mulheres (51,3%) foi encontrado entre os indivíduos diagnosticados com LDGCB. Estes dados assemelham-se aos obtidos por outros autores, os quais avaliaram a população brasileira com LDGCB (Camara, 2006; Souza, 2011). No entanto, resultados conflitantes também foram vistos, sendo a frequência da doença ligeiramente maior no sexo masculino (Hallack Neto, 2007; Mota, 2006; Veloso, 2008). O conjunto dessas informações sugere a importância de mais estudos epidemiológicos.

O LDGCB pode ocorrer entre indivíduos de todas as faixas etárias, incluindo as crianças, embora seja mais frequente em adultos, situando-se a mediana de idades na 7ª década de vida (64 anos) (Said, 2009). Demonstrando similaridade, os pacientes avaliados neste estudo apresentaram média de idade igual a 57,5 anos (mediana 60 anos). Esse resultado foi concordante aos de outros estudos realizados na população brasileira (Souza, 2011; Veloso, 2008)

O sistema de classificação Ann Arbor identifica os locais de envolvimento anatômico pelo linfoma e divide os pacientes em quatro categorias, que variam de I a IV, baseado na extensão da disseminação da doença (Armitage, 2005). Ao diagnóstico, neste estudo, 31 (39,7%) pacientes apresentavam estadio IV, caracterizado pelo pior prognóstico devido, principalmente, a infiltração de órgãos

não linfoides (pulmão, fígado, medula óssea), corroborando com os dados de Ricci Jr (2004). Divergindo destes achados, Mota (2006) e Souza (2011) encontraram um predomínio dos estadios I e II na população com LDGCB.

As paraoxonases (PON1, PON2 e PON3) têm sido objeto de grande interesse, por prevenir a elevação do status oxidativo, condição importante na carcinogênese (De Ross, 2010; Goswami et al., 2009). Dada a escassez de informações sobre a atuação desta família multigênica de enzimas, na susceptibilidade diferencial ao risco de linfomas, Kerridge e colaboradores (Kerridge et al., 2002) investigaram a associação dos polimorfismos nos genes da *PON* em tais doenças, onde observou-se um risco elevado (2,5 vezes) nos indivíduos portadores do genótipo *PON1* 192RR. Nosso estudo, em contrapartida, apresentou uma maior frequência da variante 192QQ (53,2%) tanto nos portadores de LDGCB quanto nos indivíduos do grupo controle (50,9%). Tal resultado está de acordo aos obtidos por De Ross e colaboradores (2006) que avaliaram o genótipo 192QQ em indivíduos diagnosticados com LDGCB (De Ross et al., 2006).

Em outros estudos, a frequência elevada do genótipo *PON* 1 192QQ também foi encontrada em cânceres não hematológicos (Hussein et al., 2011; Stevens et al., 2008), coronariopatas (Rios et al., 2007), diabéticos (Catapan, 2004), portadores do vírus HIV (Maselli, 2007), não diferindo com relação ao sexo e faixa etária dos indivíduos, corroborando com os nossos achados.

O polimorfismo *PON1* 55LL apresentou maior frequência genotípica (53,2 e 47,1%) e relativa de alelos (0,71 e 0,66%), nos grupos caso e controle, respectivamente. Similar a essas informações, foram os dados encontrados por De Ross e colaboradores nos indivíduos saudáveis e portadores de LDGCB, sugerindo

que a homozigoze para o alelo 55L seja fator de risco para o desenvolvimento de linfomas (De Ross et al., 2006).

Embora os dados da literatura não avaliem os polimorfismos *PON1* 55LM e *PON1* 192QR separadamente, com relação à idade, encontramos em nosso estudo a associação apenas do polimorfismo na posição 55 a esta variável, sendo observado que os indivíduos com LDGCB, com genótipo 55LM (63,1%) apresentavam médias de idade superiores aos indíduos 55LL (55,5%) e 55MM (47,6%). A longevidade é determinada, em partes, por fatores genéticos relacionados à manutenção básica e reparo de condições tais como inflamação e resistência ao estresse oxidativo. Nesse contexto, o papel da *PON1* vem sendo estudado (Marchegiani et al., 2008; Lescai et al., 2009).

As informações das variantes 148AG e 311SC, do gene *PON2,* sobre o risco de desenvolvimento de linfomas, ainda encontram-se em especulação. No entanto, neste estudo, os indivíduos com LDGCB apresentaram os genótipos 148AA (48,7%) e 311SS (57,9%) em maior frequência. Estudos realizados no Brasil, em amostras de indivíduos diagnosticados com outras patologias, as frequências desses polimorfismos também foram similares (Oliveira et al., 2004; Catapan, 2004; Maselli, 2007).

Indivíduos com linfoma, na maioria dos casos, apresentam metabolismo lipídico alterado (Lim et al., 2007; Skibola et al., 2007), sendo caracterizado pela síntese e acúmulo contínuos de colesterol, nos tecidos tumorais, e níveis reduzidos de HDL circulante (Naik et al., 2006). No entanto, a alteração nos níveis lipídicos pode ocorrer previamente à manifestação clínica da doença, atuando como

indicador para o desenvolvimento do linfomas, induzido pelos quadros de estresse oxidativo e inflamação (Naik et al., 2006).

Nenhuma diferença significativa foi encontrada nos lípides do grupo caso, em distintos momentos da quimioterapia. Analisando a influência dos polimorfismos, apenas a variante *PON2* 311 influenciou o perfil lipídico. Portadores de LDGCB e que apresentavam genótipo 311CC (n = 6), possuíram níveis menos desejáveis de TG e HDL, em comparação aos indivíduos saudáveis com genótipo 311CC (n = 20). O aumento de TG traz consequências relacionadas ao metabolismo do HDL, uma vez que quantidades substanciais de HDL são obtidas a partir da lipólise de TG ricos em lipoproteínas. Do mesmo modo, é concebível que os níveis elevados de TG possam competir com as HDL pelas lipases e confiram aumento nos níveis de PON1 (Correia et al., 2010).

As atividades séricas arilesterase (ARE) e paraoxonase (PON) não diferiram estatisticamente ao serem comparadas com o fator idade. A atividade paraoxonase apresentou média de valores maiores entre os indivíduos do sexo feminino com relação aos indivíduos do sexo masculino (média $\pm$ desvio padrão: 77,6 $\pm$ 55,2 U/L), apenas no grupo controle. Este fato afirma ainda mais a suspeita de uma relação sexo-dependente, onde se leva em consideração, principalmente, as diferenças hormonais e os níveis de HDL entre os homens e as mulheres (Faggioni, 2003; Prakash, 2007).

Neste estudo, uma associação significativamente estatística foi encontrada apenas entre o polimorfismo 55 e a atividade enzimática em torno do fenilacetato (MM<LM<MM); em ambos os polimorfismos (192 e 55), no gene da *PON1,* a atividade em torno do *paraoxon* aumentou progressivamente nos indivíduos com

LDGCB (192QQ<QR<RR); entre os indivíduos saudáveis a progressão foi dada segundo os genótipos 55MM<LM<LL. Nossos achados concordam aos obtidos por outros estudos (Catapan, 2004; Sepahvand et al, 2007), que também consideram a variação da concentração sérica da enzima PON entre os indivíduos com alguns desses genótipos. Sugere-se que tal variação esteja vinculada aos fatores ambientais, embora as variantes alélicas de *PON1* sejam as maiores determinantes da atividade enzimática da PON (Costa et al., 2005).

As condições de inflamação e status oxidativo também sofrem influência das variantes da *PON2,* com consequências sobre a atividade enzimática da PON Dasgupta et al., 2011; Precourt et al., 2011). No presente estudo, os indivíduos do grupo controle e portadores do genótipo 311SS (86,9%) apresentaram atividade ARE significativamente menor. Sabe-se que os polimorfismos da *PON2* encontram-se associados às variações de lipoproteínas no plasma, levando a inibição ou ativação de algumas enzimas da rota do metabolismo dos lipídeos (Pasdar et al., 2006). Somada a essas características, estudos ainda sugerem existir um desequilíbrio de ligação entre os alelos da *PON2* com outras mutações funcionais na família *PON* ou com genes também localizados no cromossomo 7q, influenciando a regulação da atividade enzimática (Li et al., 2003; Dasgupta et al., 2011).

A avaliação da oxidação da LDL, a partir do isolamento desta lipoproteína, vem sendo avaliada *in vivo*, em determinadas populações com cardiopatias, a partir da quantificação de autoanticorpos contra oxLDL e a oxLDL, por métodos imunológicos (Duarte et al., 2008). A PON consiste numa enzima com potencial antioxidante, prevenindo a oxidação da LDL por modular ou inativar o estresse oxidativo sistêmico e/ou localizado. (Précourt et al., 2011). Nos indivíduos portadores

de LGCB, os níveis de autoanticorpos anti-oxLDL parecem ter sido influenciados pelo polimorfismo da posição 55 do gene da *PON1*. A variante 55MM (0,40%) apresentou valores de médias inferiores com relação aos indivíduos com os genótipos 55LM e 55LL. É sabido que a PON1 atua de modo a prevenir a oxidação da LDL nativa (não modificada) (Yildirim et al., 2008). No entanto Aviram e colaboradores (1999) demonstraram que a proteção contra a oxidação desta lipoproteína é acompanhada pela inativação da PON, situação propícia à detecção de anticorpos anti-oxLDL em condições de estresse oxidativo e inflamação (Aviram et al., 2005; Yildirim et al., 2008).

7. Conclusões

- A distribuição gênica e frequência relativa dos alelos dos polimorfismos 192QR e 55LM, no gene da *PON1,* e 148AG e 311SC, no gene da *PON2* foram semelhantes entre os grupos caso (portadores de LDGCB) e controle (indivíduos saudáveis) avaliados;

- A atividade arilesterase da enzima PON apresentou-se significativamente maior no grupo controle;

- A atividade paraoxonase da enzima PON foi semelhante à atividade observada em indivíduos controle;

- Os polimorfismos PON1 192 e PON1 55 associaram-se à atividades paraoxonase da enzima PON1; os polimorfismos PON1 55 e PON2 311 associarm-se à atividade arilesterase;

- A determinação do perfil lipídico grupos parece não influenciar as atividades arilesterase e paraoxonase da enzima PON;

- Os níveis de autoanticorpos anti-oxLDL associaram-se ao polimorfismo PON1 55;

- Espera-se que os resultados obtidos neste trabalho auxiliem como fonte de caracterização da família multigênica de enzimas paraoxonase sobre a população brasileira diagnosticada com LDGCB.

8. Anexos

Anexo 1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME .....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº ..... SEXO: M □ F □
DATA NASCIMENTO...../...../.....
ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO .....
BAIRRO ..... CIDADE .....
CEP..... TELEFONE: DDD (.....) .....

2. RESPONSÁVEL LEGAL .....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº .....SEXO: M □ F □
DATA NASCIMENTO. ...../...../.....
ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO .....
BAIRRO ..... CIDADE.....
CEP .....TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. Título do Protocolo da Pesquisa: Estudo dos polimorfismos nos genes das paraoxonases 1 e 2 em pacientes com linfoma não Hodgkin.
Pesquisador: Sergio Paulo Bydlowski
Cargo/Função: Professor Associado da Disciplina de Hematologia e Hemoterapia FMUSP/ Chefe LIM-31 FMUSP
Inscrição do Conselho Regional: nº 28342
Unidade do HCFMUSP: Depto de Clinica Médica HCFMUSP/ LIM-31 / Serviço de Hematologia e Hemoterapia HCFMUSP

2. Avaliação do Risco da Pesquisa:

RISCO MÍNIMO X RISCO MÉDIO □
RISCO BAIXO □ RISCO MAIOR □

3. Duração da Pesquisa: 03 anos

1. **Desenho do estudo e objetivo(s):** A amostra que será coletada hoje faz parte de um estudo realizado em pacientes portadores de linfoma não Hodgkin, acompanhados pelo Serviço de Hematologia do HCFMUSP. Serão estudadas as diferentes formas hereditárias (herdadas de pai e de mãe) da enzima paraoxonase, pois queremos saber se existe alguma relação entre a atividade (funcionamento) desta enzima com a progressão e o tratamento desta doença, uma vez que a enzima paraoxonase age como protetora dos lipídeos (“gorduras”) e pode sofrer mudanças por causa de algumas doenças. Serão pesquisadas a atividade (funcionamento) da enzima no sangue, e suas diferentes formas hereditárias (herdadas do pai e da mãe) através do estudo de DNA. Serão estudadas também mudanças nos lipídeos (“gorduras”) de seu sangue (colesterol, triglicérides e frações de lipoproteínas). É importante conhecer o quanto destas mudanças acontece, porque elas podem fazer com que a gordura do sangue comece a se depositar na parede das artérias (“veias”), o que pode provocar outras complicações e outras doenças (como por exemplo, infarto do coração).

2. O Sr. responderá perguntas simples sobre seus ancestrais (pais e avós), porque as formas hereditárias da enzima paraoxonase possuem freqüências diferentes dentre as três principais raças (brancos, negros e amarelos) e suas misturas encontradas no Brasil. Favor assinalar:

Paciente: Branco Negro Índio Miscigenado

Pai: Branco Negro Índio Miscigenado **Mãe:** Branco Negro Índio Miscigenado

Avó Paterna: Branco Negro Índio Miscigenado **Avó Materna:** Branco Negro Índio Miscigenado

Avô Materna: Branco Negro Índio Miscigenado **Avô Materna:** Branco Negro Índio Miscigenado

3. O sangue necessário para fazer estes testes de laboratório será coletado em quatro momentos, juntamente com seus exames laboratoriais de rotina. A primeira coleta será antes do início de seu tratamento (logo após a primeira consulta), a segunda entre os ciclos (1° e 2º), a terceira após o quarto ciclo de quimioterapia e a quarta, após o último ciclo de quimioterapia.

4. Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3: somente os da punção venosa (picada da agulha) para a coleta do sangue, o qual será obtido quando da coleta de outros exames rotineiros.

5. Possíveis benefícios advindos da pesquisa: Nos casos onde forem detectadas quaisquer alterações do perfil lipídico (colesterol total, suas frações e triglicérides), o paciente será encaminhado para tratamento.

6. Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar, não há

7. Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os principais investigadores são a **Dra. Juliana Pereira, Karolline Santana da Silva** e o **Prof. Dr. Sérgio Bydlowski**, que podem ser encontrados na Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155 (PAMB) – 1º andar, sala 43. São Paulo/SP - fones: (11) 3061-5544 ramal. 264. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – fone: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: (11) 3069-6442 ramal. 26. E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

8. É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

9. Direito de confidencialidade. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.

10. Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

11. Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12. Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas. O risco do estudo é mínimo, sendo apenas o de três coletas de amostras de sangue.

13. A sua amostra de sangue coletada hoje ficará armazenada no laboratório, conforme regras de sigilo e manutenção de materiais biológicos vigentes, e poderá vir a ser utilizada em outro estudo, somente caso o(a) senhor(a) concorde após lhe explicarmos sobre o que seria o novo projeto de pesquisa. Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Estudo dos polimorfismos nos genes das paraoxonases 1 e 2 em pacientes com linfoma não Hodgkin."

14. Eu discuti com Karolline Santana da Silva e/ou com a Dra. Juliana Pereira sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário.

Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal* Data ___/___/___

Assinatura da testemunha Data ___/___/___

*para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ___/___/___

Anexo 2.. Genotipagem dos polimorfismos 192QR e 55LM, no gene da *PON1* e 148AG e 311SC, no gene da *PON2*, nos portadores de LDGCB (n = 78).

Amostras	*PON1*		*PON2*	
	192QR	**55LM**	**148AG**	**311SC**
001	QQ	LL	AG	SC
002	QQ	LL	AA	SS
003	QQ	LM	AA	SS
004	QQ	LM	AG	SS
005	QQ	LL	AA	SS
006	QQ	LM	AA	SS
007	QQ	LM	AA	SS
008	QQ	LM	AA	SS
009	RR	LL	AA	SS
010	QQ	MM	AA	SS
011	RR	LL	AG	SC
012	QR	LL	AG	SC
013	QQ	LM	AG	SC
014	RR	LL	AA	SS
015	QR	LL	AG	SC
016	RR	LL	AG	SS
017	QQ	LM	AG	SC
018	QQ	LL	AA	SS
019	QQ	LL	AG	CC
020	QQ	LL	AG	SC
022	QR	LL	AA	SS
023	QR	LL	AA	SS
024	QQ	MM	GG	SC
025	QR	LL	AA	CC
026	QQ	LM	AA	CC
027	QR	MM	AG	SC
028	RR	LL	AA	SS
029	QQ	MM	AG	SS
030	QQ	MM	AA	SS
031	QQ	LL	AA	SS
032	QQ	LL	AG	ND*
033	QQ	LL	AG	SC

continua

Amostras	*PON1*		*PON2*	
	192QR	**55LM**	**148AG**	**311SC**
035	QQ	LL	GG	SC
036	QQ	LM	AG	SC
037	RR	LM	AA	SS
039	QR	LL	AA	SS
040	QR	LL	AA	SS
041	QQ	LL	AG	SC
042	RR	LL	AA	SS
043	QR	LL	AA	SS
044	QR	LM	AA	CC
045	QQ	LL	AG	SC
046	RR	LL	AG	SS
047	QQ	MM	AA	SS
048	QQ	MM	AA	SS
050	QQ	MM	AG	SS
051	QQ	LM	AG	SC
052	QQ	LM	AG	SC
053	QR	LL	AG	SC
054	QR	LL	AG	SC
055	QR	LM	AA	SS
059	QR	LL	AA	SS
061	QQ	LM	GG	CC
063	QQ	LM	AG	SC
064	QQ	LL	AG	SC
065	QR	LM	AA	SS
067	RR	LL	AA	ND*
071	QQ	LM	AA	SS
073	QQ	LM	AA	SS
074	RR	LL	AA	SS
075	QR	LL	AG	SS
079	QQ	LL	GG	CC
081	QR	LL	AG	SC
082	QQ	LM	AG	SS
083	QQ	LM	AA	SS
084	QR	LL	AG	SS

continua

Amostras	*PON1*		*PON2*	
	192QR	**55LM**	**148AG**	**311SC**
085	QR	LL	AG	SS
086	RR	LL	AA	SS
087	QR	LM	AG	SC
088	QR	LM	AG	SC
090	QR	LM	AG	SC
092	ND*	ND*	AA	SS
095	QQ	LM	AG	SC
097	QR	LM	AA	SS
098	QQ	LM	GG	SC
099	QQ	LM	AG	SS

Polimorfismos 192QR (QQ: homozigoto selvagem; QR: heterozigoto; RR: homozigoto mutado) e 55LM (LL: homozigoto selvagem; LM: heterozigoto; MM: homozigoto mutado) no gene da *PON1.* Polimorfismos 148AG (AA: homozigoto selvagem; AG: heterozigoto; GG: homozigoto mutado) e 311SC (SS: homozigoto selvagem; SC: heterozigoto; CC: homozigoto mutado) no gene da *PON2*. ND*: Não determinado.

Anexo 3. Determinações bioquímicas das apolipoproteínas (Apo) A1, A2, B e E, colesterol total (CT) e frações (HDL-C, LDL-C, VLDL-C) e triglicérides (TG) dos portadores de LDGCB (n = 78)

Amostras	Apo A1	Apo A2	Apo B	Apo E	CT	HDL	LDL	VLDL	TG
001	68,8	13,8	90,7	2,6	144	252	16	50	50
002	132,6	23,9	75,1	2,4	156	78	48	16	92
003	157, 1	34,5	85,6	3,7	186	196	52	39	95
004	78,1	17,5	48,7	5,2	86	64	16	19	51
005	198,8	32,2	119,6	6,3	255	209	65	42	148
006	108,4	24,1	133,3	7,3	243	441	26	ND*	140
007	154,1	28,4	93,9	5,1	190	75	54	15	121
008	145,5	29,6	74,3	3,8	164	77	60	15	89
009	161,5	36,9	77,7	5,20	173	85	61	17	95
010	132,6	29,3	111,5	4	238	122	49	24	165
011	92,3	28,7	79,2	3,9	150	109	30	22	98
012	153,2	39,3	133	5,3	250	198	59	40	151
013	184,1	36,4	87,8	6,8	197	139	69	28	100
014	115,7	23,1	45	3,6	108	50	41	10	57
015	59,1	9,4	94,1	3,4	128	160	20	32	76
016	145	18,1	132,4	4,9	201	130	49	26	126
017	162,5	26,7	104,2	5,7	197	214	46	43	108
018	157,5	31	102,6	4,3	193	99	51	20	122
019	93,4	19,8	50,3	3	92	76	40	15	37
020	95	20,5	86,4	5,1	133	123	27	25	81
022	125,3	35,4	94,7	3,4	180	99	36	20	124
023	105,4	18,7	149,7	5,7	230	208	29	42	159
024	107,4	17,3	110,7	4,2	196	119	38	24	134
025	142	30,4	75,8	4	148	114	55	23	70
026	79,9	15,1	279,8	15,20	384	995	34	ND*	163
027	137	30,9	99,3	5	216	57	57	11	148
028	82,5	17,5	83,7	5,6	180	101	27	ND*	133
029	121,4	29,9	114	4,9	206	302	36	ND*	133
030	117,5	25,1	139,4	4,1	254	95	47	19	188
031	109,9	22,2	63,5	2,2	124	96	42	19	63
032	203,1	31,5	59	2,9	161	99	94	20	47
033	211,9	42,5	76,5	2,9	179	256	77	51	51
035	165	29	57,1	5,3	160	123	62	25	73
036	145,7	21	76,1	5,5	203	108	74	22	107
037	156,5	37,7	89,8	4,3	213	114	59	23	131

continua

Amostras	Apo A1	Apo A2	Apo B	Apo E	CT	HDL	LDL	VLDL	TG
039	112,3	23,7	85	4,2	163	120	37	24	102
040	200,4	36,1	74,1	3,9	200	82	80	16	104
041	111	26,5	94,9	6,3	174	121	36	ND*	114
042	137,2	27	121,3	5,6	224	123	42	25	157
043	101,9	24,8	32,6	2,8	84	52	29	10	45
044	109,9	23,6	82,3	4,7	163	128	32	26	105
045	153,1	39,4	114	5	253	167	52	33	168
046	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
047	47	11,4	83,5	5,3	126	139	9	28	89
048	104,1	22,3	110,2	4,9	192	214	26	43	123
050	110,7	16,8	84,1	3,9	162	96	42	19	101
051	145,5	25,9	64	3,1	157	75	55	15	87
052	162,4	41,3	100,4	4,9	238	81	60	16	162
053	110,9	30,9	125,2	3,5	232	193	34	39	159
054	124,6	26,7	119,9	5,1	239	130	37	26	176
055	121,3	33	116,8	5	211	142	39	28	144
059	93,1	18	151	5,6	258	195	27	39	192
061	41,4	10,6	119,4	4,8	155	215	10	43	102
063	114,5	19,8	107,6	6,5	205	107	46	21	138
064	143,9	26	69,4	4,5	148	216	45	43	60
065	162,1	33,5	111,2	4,5	257	131	57	26	174
067	110,9	21,9	51,1	2,3	114	106	40	21	53
071	108,4	18,2	87,8	4,6	184	190	35	38	111
073	110,9	20,5	116	3,30	194	123	34	25	135
074	92,4	17,4	77,9	4,80	143	59	38	12	93
075	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
076	101,3	30,5	97,6	4,4	196	114	34	23	139
077	80,1	17,7	64,9	6,1	109	122	22	24	63
079	202,7	36,6	114,8	3,2	263	100	72	20	171
081	162,1	122,8	98,4	4,8	236	149	60	30	146
082	142,1	25,5	132,5	1,8	211	89	55	18	138
083	34,8	8,8	108	2,5	127	98	10	20	97
084	77,8	16,8	63,3	2,9	118	108	28	22	68
085	119,9	30,1	94,1	4,9	164	168	30	34	100
086	155,1	30,1	142,1	5,9	254	146	50	29	175
087	118,9	29,1	102,2	3,7	179	111	36	22	121
088	133,2	23,4	97,2	4,1	179	108	44	22	113

continua

Amostras	Apo A1	Apo A2	Apo B	Apo E	CT	HDL	LDL	VLDL	TG
090	122,4	31,4	111,9	9,2	238	209	35	42	161
092	15,8	5,2	144,5	7,5	148	157	6	31	111
095	86,3	14,6	57	35	123	74	31	15	77
097	32,5	7,6	175,7	8,4	195	417	8	ND*	27
098	108,8	19,4	52,7	3	122	77	41	15	66
099	131,4	31,8	71	7	179	105	48	21	110

Valores obtidos no momento T0 (após o diagnóstico e antes do início da QT). Resultados expressos em mg/dL. ND*: Não disponível.

Anexo 4. Determinações bioquímicas das apolipoproteínas (Apo) A1, A2, B e E, colesterol total (CT) e frações (HDL-C, LDL-C, VLDL-C) e triglicérides (TG) dos portadores de LDGCB (n = 78)

Amostras	Apo A1	Apo A2	Apo B	Apo E	CT	HDL	LDL	VLDL	TG
001	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
002	154,1	29,5	81,5	2,8	165	51	58	10	97
003	103,2	29,8	78,6	5,6	160	332	24	ND*	89
004	45,7	6,5	48,2	6,3	58	129	6	26	26
005	196,4	34,9	125,7	7,3	257	243	65	49	143
006	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
007	126,1	28,2	96,3	7,3	196	162	41	32	123
008	174,5	34,2	96,9	4,8	196	133	69	27	100
009	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
010	118,3	22,5	122,2	3,3	212	73	44	15	153
011	97,7	23,5	74,4	4,5	136	99	29	20	87
012	178,5	37,2	139,6	5,7	271	157	55	31	185
013	169,9	28,5	71,5	6,4	148	106	50	21	77
014	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
015	118,1	27,3	66,3	3,1	149	113	53	23	73
016	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
017	141,4	28,6	90,9	11,1	200	646	30	ND*	72
018	161,5	34,9	104,7	5,3	222	109	58	22	142
019	119,6	25,2	77,6	4	181	144	42	29	110
020	181,7	38,1	87,6	7,7	200	186	67	37	96
022	131,5	33,8	93,4	4,5	201	212	36	42	123
023	160,5	29	184,9	7,3	284	335	45	ND*	206
024	128,8	26,5	128,7	5,2	218	156	38	31	149
025	129,4	30,2	103,2	6,8	224	368	37	ND*	127
026	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
027	131,9	34,3	117,7	5,4	238	131	49	26	163
028	150,7	33,5	91,5	4,7	216	73	58	15	143
029	109,8	30,4	86,5	4,3	179	224	35	45	99
030	148,6	39,7	136	7,8	285	291	49	58	178
031	111,2	33,2	64,6	5,2	138	281	23	56	59
032	206,5	26,4	47,9	2,3	163	95	92	19	52
033	161,8	36,5	85,5	6,1	211	594	44	ND*	86
035	229,4	38,9	64,2	6,4	221	169	85	34	102
036	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
037	164,2	39,8	86,1	6	195	155	61	31	103
039	167,7	28,7	47,3	2,8	144	53	76	11	57

continua

Amostras	Apo A1	Apo A2	Apo B	Apo E	CT	HDL	LDL	VLDL	TG
040	171,8	32,6	77,2	3,6	185	107	55	21	109
041	160,1	36	96,1	9,1	233	125	66	25	142
042	136,5	22,6	94,6	3,6	211	79	59	16	136
043	94,2	24,2	35,7	3,9	84	58	32	12	40
044	125	18,9	67,8	3,5	155	103	41	21	93
045	217,2	51	144,5	5	349	182	94	36	219
046	187,3	31,8	78,8	4,8	228	133	70	27	131
047	122,2	230	91	4,9	213	96	48	19	146
048	88,1	20,4	72	6,3	134	354	15	ND*	58
050	56,7	6,2	76,7	4,1	111	108	18	22	71
051	143,4	24,2	62,9	3,5	161	115	51	23	87
052	186,6	47,6	72,5	5,6	205	152	75	30	100
053	142,9	37,8	137,2	5,6	269	218	43	44	182
054	173,9	48,4	94,7	4,8	201	440	47	ND*	110
055	152,4	36,7	93	6,5	187	327	51	ND*	83
059	101,7	29,3	125,8	4,3	238	133	33	27	178
061	182,8	33,6	100,9	6,5	240	284	61	57	122
063	151	40,2	87,3	4,2	203	89	59	18	126
064	142,4	22,8	57,1	3,3	126	126	46	25	55
065	114,8	30,5	112,9	4,4	202	167	32	33	137
067	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
071	140	22,9	87,5	5,6	223	219	47	44	132
073	139,9	23,9	121,6	3,7	233	199	44	40	149
074	178,9	33,3	61,9	7,4	199	56	86	11	102
075	140,5	28,6	58,7	10,1	184	148	56	30	98
076	112,6	26	79,3	4	168	95	55	19	94
077	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
079	186,6	46,1	125,9	4,7	253	134	65	27	161
081	119,4	23,7	122,8	3,6	243	122	39	122	180
082	88,2	14,7	104,3	2,3	157	157	27	31	99
083	107,3	27,5	79,6	2,4	155	55	39	11	105
084	125,5	20,7	75,3	4,8	181	81	63	16	102
085	133,8	28,6	89,9	4,3	170	163	35	33	102
086	174	32,7	98,7	6,4	247	69	75	69	158
087	123	28,3	101,3	3,7	186	126	38	25	123
088	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
090	143	25	49,40	7,1	141	139	57	28	56

continua

Amostras	Apo A1	Apo A2	Apo B	Apo E	CT	HDL	LDL	VLDL	TG
092	114,6	17,9	107	5,8	212	151	48	30	134
095	120,2	15,6	85,6	5	189	119	47	24	118
097	118,3	21,50	102,4	6,3	208	82	63	16	129
098	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
099	161,9	29,6	66,6	5,4	174	101	61	20	93

Valores obtidos no momento T1 (entre o primeiro e segundo ciclo de QT). Resultados expressos em mg/dL. ND*: Não disponível.

Anexo 5. Determinações bioquímicas das apolipoproteínas (Apo) A1, A2, B e E, colesterol total (CT) e frações (HDL-C, LDL-C, VLDL-C) e triglicérides (TG) dos portadores de LDGCB (n = 78)

Amostras	Apo A1	Apo A2	Apo B	Apo E	CT	HDL	LDL	VLDL	TG
001	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
002	142,6	31,6	88,9	3,1	181	47	111	23	117
003	147,7	39,4	92,6	5,1	191	44	100	47	236
004	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
005	191,3	34,5	95,1	5,6	188	57	86	45	226
006	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
007	95,1	16,6	122,3	6,7	205	29	143	33	167
008	161	31,3	91,1	3,2	191	56	119	16	78
009	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
010	131,8	27,3	140,9	4,1	251	48	178	25	124
011	87	22,8	82,6	3,1	129	31	79	19	95
012	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
013	154	31,7	70,5	5,8	157	50	67	40	202
014	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
015	158,8	41,2	89,1	6,50	232	85	114	33	167
016	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
017	140,1	26,5	95,4	13	233	64	77	ND*	786
018	146,9	26,4	85,6	3,3	195	70	111	14	70
019	158,3	38,70	100,8	6	247	52	150	45	226
020	172,6	40,8	89,1	6,4	217	65	127	25	125
022	142	37,7	111,6	3,9	229	47	146	29	153
023	163,8	29,7	169	5,40	313	48	212	53	264
024	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*

continua

Amostras	Apo A1	Apo A2	Apo B	Apo E	CT	HDL	LDL	VLDL	TG
025	113,3	27,5	107,5	6,5	223	32	127	ND*	383
026	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
027	132	27,4	97,7	4,7	228	42	156	30	149
028	121,5	33,1	51	5,0	138	59	66	16	79
029	163,7	33,8	78,4	5	191	59	105	27	136
030	116,8	30,7	129	5,2	265	39	191	35	175
031	112,2	35,2	77,4	7,9	157	18	47	ND*	510
032	206,9	49,2	43,3	3,8	169	100	48	21	103
033	167,2	39	95,1	4,2	217	73	99	45	223
035	202,4	42,8	67,4	6,9	192	72	90	30	150
036	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
037	159,4	39	102,1	5,1	224	62	123	39	197
039	123	22,5	44	2,5	122	52	59	11	55
040	174,8	32,2	66,2	4,1	173	77	75	21	105
041	156	42,5	93,4	7,1	200	54	115	31	163
042	117,3	27	106,6	3,6	257	50	184	23	113
043	184,8	38,8	46,1	3,2	135	60	59	16	81
044	111,7	27,2	81,2	4,3	143	36	82	25	127
045	190,4	42,3	158,8	5,3	322	67	224	31	153
046	143,9	30,6	114,3	5,6	231	57	144	30	151
047	94,4	24,4	72,7	3,1	142	31	90	21	103
048	145,3	31,8	116,2	5,2	247	39	161	47	234
050	130,5	27,7	85,8	5,1	174	44	103	27	135
051	117,8	24,9	69,8	3,3	140	35	86	19	94

continua

Amostras	Apo A1	Apo A2	Apo B	Apo E	CT	HDL	LDL	VLDL	TG
052	186,6	47,6	72,5	5,6	205	75	100	30	152
053	98,7	27,5	128,4	4,9	211	29	151	31	154
054	118,6	26,4	119,9	4,7	255	42	175	38	188
055	158,7	36,5	6,3	196	333	87	ND*	ND*	49
059	101,7	29,3	125,8	4,3	238	33	178	27	133
061	160,6	35,4	131,3	5,6	266	54	173	39	196
063	151	40,2	87,3	4,2	203	59	126	18	89
064	128,4	25,8	47,7	3,2	51	40	<3	28	142
065	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
067	173,9	48,4	94,7	4,8	201	47	110	ND*	440,0
071	136,1	22,1	70,2	3,8	163	51	89	23	117
073	116	23,5	122,8	3,3	214	35	148	31	156
074	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
075	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
076	81,6	21,5	46,6	3,1	99	25	54	20	102
077	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
079	178,8	41,3	130,7	4,8	285	60	194	31	153
081	136,2	27	79,3	3,1	181	49	112	20	98
082	88,7	18,5	95,2	3,3	158	27	196	39	92
083	84,5	28,7	81,4	2,8	146	27	98	21	104
084	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
085	124,9	29,1	80,7	5,3	171	36	90	45	226
086	161,3	34	70,3	5,6	185	43	123	19	93
087	102,5	28,3	103,4	5,8	190	29	112	49	247

continua

Amostras	Apo A1	Apo A2	Apo B	Apo E	CT	HDL	LDL	VLDL	TG
088	155,5	27	123,8	5,4	258	60	171	27	135
090	121,1	22,6	71	6,8	185	44	86	55	275
092	162	23,5	11,5	6,7	250	53	152	45	227
095	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
097	163	31,6	121,3	7,4	283	55	198	30	149
098	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
099	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*

Valores obtidos no momento T2 (após o quarto ciclo da QT). Resultados expressos em mg/dL. ND*: Não disponível.

Anexo 6. Determinações bioquímicas das apolipoproteínas (Apo) A1, A2, B e E, colesterol total (CT) e frações (HDL-C, LDL-C, VLDL-C) e triglicérides (TG) dos portadores de LDGCB (n = 78)

Amostras	Apo A1	Apo A2	Apo B	Apo E	CT	HDL	LDL	VLDL	TG
001	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
002	117,7	28,7	93,2	2	180	45	111	24	119
003	168,9	38,1	104,7	5,3	197	55	104	38	192
004	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
005	163,5	33,8	104	7,1	226	65	131	30	150
006	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
007	164,8	40,8	117,1	6,8	226	47	154	25	127
008	161	31,3	91,1	3,2	191	56	119	16	18
009	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
010	143,3	27,1	109,2	4,3	230	48	162	20	99
011	100,4	20,7	56,1	4,2	127	37	73	17	83
012	166,1	35,3	146,1	6,5	289,0	52	184	ND*	395
013	161,6	28,5	65	5,5	162	54	81	27	133
014	129	29,9	61	6	157	53	90	14	71
015	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
016	171,7	ND*	80,3	ND*	178	49	95	34	172
017	191,9	42,5	117	7,1	259,0	53	152	54	269
018	192,2	37,7	132,8	4,1	278	70	187	21	106
019	158,8	41,7	97,2	4,9	213	56	132	25	123
020	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
022	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
023	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
024	140,2	28,8	94,6	4,1	209	51	137	21	103

continua

Amostras	Apo A1	Apo A2	Apo B	Apo E	CT	HDL	LDL	VLDL	TG
025	117	24,6	86,6	5,2	172	41	99	32	158
026	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
027	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
028	134,4	32,1	93	3,4	ND*	14	56	121	71
029	143,4	32,2	97,3	3,2	206	49	118	39	195
030	129,4	33,7	96	4,8	208	52	134	22	112
031	106,4	32,8	56,8	4,8	140	32	77	31	154
032	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
033	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
035	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
036	100,9	27	71	3,8	156	34	90	32	159
037	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
039	120,1	25,2	50,9	3,2	129	53	64	12	62
040	175,3	36,2	84,9	3,8	208	67	107	34	169
041	162,6	40,4	121,4	8,4	259	52	165		373
042	138,9	34,7	131,9	5,0	268	51	191	26	130
043	174,4	36,7	60,1	3,6	144	55	69	20	101
044	81,8	19,4	68,8	3,9	108	14	63	31	157
045	138,7	37,4	112,2	4,3	216	40	127	49	246
046	137,6	26,1	100,7	5,3	204	42	125	37,0	185
047	120,3	24,9	62,8	3,5	146	46	78	22	109
048	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
050	112,6	22,6	66,7	4,3	154	51	87	16	79
051	131	29,5	79,2	3,6	171	51	102	18	92

continua

Amostras	Apo A1	Apo A2	Apo B	Apo E	CT	HDL	LDL	VLDL	TG
052	153,9	30,5	79,1	5,3	191	57	107	27	135
053	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
054	127	34,9	117,2	4,7	250	43	177	30	148
055	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
059	108	31,5	140,4	4,7	240	37	102	20	183
061	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
063	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
064	130,9	26,8	67,6	4,7	141	32	63	46	230
065	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
067	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
071	116	22,3	76,8	4,1	171	39	95	37	187
073	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
074	152,4	27,8	70,3	6,2	194	70	107	17	86
075	162	35,7	62,3	7	187	65	101	21	104
076	82	25	49,6	2,8	101	22	60	19	95
077	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
079	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
081	129,8	30	84,4	3,4	176	43	112	21	106
082	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
083	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
084	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
085	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
086	164,4	34,6	83,8	5,5	185	62	101	22	112
087	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*

continua

Amostras	Apo A1	Apo A2	Apo B	Apo E	CT	HDL	LDL	VLDL	TG
088	89,4	24,6	46	4,4	125	12	65	48	238
090	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
092	102	15,7	99,3	5,5	186	41	41	113	162
095	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
097	141,6	29,3	113,5	6,3	244	68	155	21	106
098	56,9	18,7	38,8	4,1	64	6	40	18	92
099	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*

Valores obtidos no momento T3 (ao término do ciclo da QT). Resultados expressos em mg/dL. ND*: Não disponível.

Anexo 7. Determinação da atividade arilesterase (U/mL) nos portadores de LDGCB em momentos distintos da Quimioterapia (QT): T0, T1, T2 e T3*. (n = 78)

Amostras	T0	T1	T2	T3
001	49	82	ND*	ND*
002	84	107	100	113
003	97	89	111	95
004	97	88	ND*	ND*
005	112	120	129	86
006	65	ND*	ND*	ND*
007	ND*	116	82	69
008	72	81	60	ND*
009	87	ND*	ND*	ND*
010	49	57	ND*	52
011	141	94	ND*	47
012	106	125	ND*	103
013	83	82	85	74
014	110	ND*	ND*	109
015	43	64	87	ND*
016	95	94	ND*	111
017	71	71	95	77
018	117	116	99	ND*
019	69	108	78	ND*
020	49	59	91	ND*
022	98	117	97	ND*
023	80	102	69	97
024	59	83	95	ND*
025	80	81	65	94
026	38	ND*	ND*	ND*
027	38	130	72	ND*
028	96	100	98	98
029	82	76	109	87
030	72	96	72	88
031	89	65	72	ND*
032	73	82	88	ND*
033	165	137	131	ND*
035	99	120	116	ND*

continua

Amostras	T0	T1	T2	T3
036	95	ND*	ND*	81
037	69	81	95	ND*
039	69	81	83	83
040	74	81	86	98
041	42	54	95	91
042	100	95	76	98
043	61	61	ND*	121
044	75	62	74	90
045	108	ND*	105	98
046	71	102	109	93
047	54	47	65	62
048	54	60	71	ND*
050	53	38	74	76
051	89	108	98	110
052	118	118	165	101
053	117	124	116	ND*
054	95	91	ND*	113
055	67	75	77	ND*
059	79	112	131	115
061	62	72	101	ND*
063	62	126	ND*	ND*
064	92	108	49	90
065	90	102	ND*	ND*
067	51	105	ND*	ND*
071	51	78	80	96
073	61	82	74	ND*
074	20	48	33	42
075	ND*	69	72	ND*
076	128	110	91	109
077	56	ND*	ND*	ND*
079	118	144	117	ND*
081	83	90	66	87
082	79	65	80	57
083	70	111	98	ND*
084	53	64	ND*	ND*
085	101	115	125	ND*

continua

Amostras	T0	T1	T2	T3
086	73	103	98	80
087	79	90	68	ND*
088	87	ND*	101	107
090	106	93	86	ND*
092	26	72	67	42
095	45	58	ND*	ND*
097	40	45	44	40
098	77	66	71	68
099	86	83	ND*	ND*

Determinação da atividade arilesterase da PON1 sérica, utlizando como substrato o fenilacetato. Resultado expresso em U/mL. *T0 (após o diagnóstico e antes do início da QT), entre o primeiro e segundo ciclo de QT; T2) após o quarto ciclo de QT e; T3) ao término do último ciclo de QT. ND*: Não disponível.

Anexo 8. Determinação da atividade paraoxonase (U/L) nos portadores de LDGCB em momentos distintos da Quimioterapia (QT): T0, T1, T2 e T3*. (n = 78)

Amostras	T0	T1	T2	T3
001	26	45	ND*	ND*
002	120	155	135	103
003	143	123	158	137
004	127	ND*	ND*	115
005	170	145	129	113
006	129	ND*	ND*	ND*
007	ND*	106	111	99
008	107	161	102	ND*
009	194	ND*	ND*	ND*
010	24	27	17	28
011	162	114	82	ND*
012	155	170	157	ND*
013	44	33	32	ND*
014	230	ND*	ND*	194
015	51	76	118	ND*
016	166	ND*	ND*	202
017	51	56	30	36
018	66	52	64	68
019	81	70	52	68
020	35	29	39	ND*
022	121	110	103	ND*
023	88	96	ND*	75
024	73	138	131	ND*
025	69	75	68	59
026	29	ND*	ND*	ND*
027	105	117	90	ND*
029	23	29	56	34
030	58	ND*	87	108
031	61	52	86	69
032	ND*	ND*	107	ND*
033	198	134	141	ND*
035	93	108	121	ND*

continua

Amostras	T0	T1	T2	T3
036	37	ND*	ND*	32
037	31	42	35	ND*
039	43	35	17	12
040	147	88	157	198
041	ND*	29	21	ND*
042	101	182	166	ND*
043	47	46	116	ND*
044	ND*	103	92	73
045	176	ND*	56	102
046	205	ND*	195	156
047	27	ND*	32	31
048	ND*	ND*	36	ND*
050	123	15	27	21
051	ND*	ND*	35	27
052	106	140	166	103
053	107	126	107	ND*
054	135	125	ND*	107
055	31	30	81	ND*
059	85	103	106	113
061	27	41	40	ND*
063	31	42	ND*	ND*
065	134	ND*	ND*	ND*
067	121	183	ND*	ND*
071	ND*	58	30	19
073	39	29	22	ND*
074	ND*	ND*	57	51
075	ND*	ND*	76	ND*
076	229	103	146	169
077	57	ND*	ND*	ND*
079	ND*	58	50	ND*
081	95	77	102	78
082	19	19	27	50
083	31	29	34	ND*
084	53	62	ND*	ND*

continua

Amostras	T0	T1	T2	T3
085	118	119	123	ND*
086	108	144	180	152
087	86	93	75	ND*
088	106	ND*	141	104
090	108	98	121	ND*
092	32	ND*	29	20
095		ND*	ND*	ND*
097	46	72	68	82
098	24	34	49	55
099	24	27	ND*	ND*

Determinação da atividade paraoxonase da PON1 sérica, utlizando como substrato o *paraoxon*. Resultado expresso em U/L. *T0 (após o diagnóstico e antes do início da QT); T1 (entre o primeiro e segundo ciclo de QT); T2 (após o quarto ciclo de QT) e T3 (ao término do último ciclo de QT). ND*: Não disponível.

Anexo 9. Idade e estadio clínico dos portadores de LDGCB (n = 78).

Amostras	Idade (anos)	Estadio clínico
001	55	IV
002	35	II
003	51	II
004	72	II
005	72	II
006	65	II
007	74	IV
008	55	III
009	54	I
010	46	I
011	70	II
012	48	III
013	66	III
014	76	IV
015	18	II
016	64	IV
017	66	IV
018	78	II
019	55	IV
020	67	IV
022	52	IV
023	51	I
024	69	IV
025	57	IV
026	80	I
027	66	ND*
028	28	III
029	33	I
030	24	IV
031	31	IV
032	39	II
033	52	I
035	63	II
036	71	I

continua

Amostras	Idade (anos)	Estadio clínico
037	60	I
039	52	IV
040	73	III
041	74	IV
042	69	IV
043	43	IV
044	72	IV
045	68	III
046	64	III
047	38	IV
048	60	IV
050	73	II
051	36	I
052	50	I
053	38	I
054	49	IV
055	52	III
059	21	IV
061	53	IV
063	68	IV
064	75	III
065	65	IV
067	44	II
071	85	IV
073	77	I
074	47	II
075	40	IV
076	71	II
077	59	IV
079	31	IV
081	53	IIII
082	69	II
083	36	I
084	75	III

continua

Amostras	Idade (anos)	Estadio clínico
085	56	IV
086	78	III
087	61	II
088	78	II
090	85	ND*
092	67	ND*
095	50	IV
097	67	IV
098	65	I
099	40	I

Distribuição dos pacientes segundo o Sistema Ann Arbor de estadiamento. Estadio I: Envolvimento de uma região linfonodal ou estrutura linfóide; Estadio II: Envolvimento de duas ou mais regiões linfonodais do mesmo lado do diafragma; Estadio III: Envolvimento de regiões linfonodais do mesmo lado do diafragma; Estadio IV: Envolvimento de órgão extranodal. ND*: Não disponível

Anexo 10. Níveis séricos de autoanticorpos anti- oxLDL, nos portadores de LDGCB, em momentos distintos da Quimioterapia (QT): T0 e T1* (n=78)

Amostras	T0	T1
001	0,65	0,46
002	0,46	0,61
003	0,70	0,41
004	0,45	0,66
005	0,40	0,43
006	0,25	0,29
007	ND*	0,36
008	0,44	ND*
009	0,41	ND*
010	0,46	ND*
011	ND*	ND*
012	0,43	ND*
013	ND*	ND*
014	ND*	0,37
015	ND*	ND*
016	ND*	0,29
017	ND*	ND*
018	ND*	ND*
019	ND*	ND*
020	ND*	ND*
022	0,35	0,39
023	0,38	0,24
024	ND*	ND*
025	0,11	ND*
026	ND*	ND*
027	0,34	ND*
028	0,52	ND*
029	0,38	ND*
030	ND*	0,51
031	0,45	0,56
032	ND*	0,53
033	0,41	0,41
035	0,39	0,38

continua

Amostras	T0	T1
036	ND*	0,37
037	0,80	0,61
039	0,33	0,30
040	0,82	0,67
041	0,36	0,28
042	0,75	0,56
043	0,49	0,41
044	0,52	0,40
045	0,58	0,55
046	0,38	ND*
047	0,39	0,48
048	0,45	0,48
050	0,40	0,31
051	0,40	0,46
052	0,49	0,26
053	0,34	ND*
054	0,39	1,07
055	0,40	0,29
059	0,39	0,46
061	ND*	0,39
063	0,39	ND*
064	ND*	ND*
065	0,70	ND*
067	0,50	0,64
071	0,46	0,67
073	1,17	1,06
074	0,39	ND*
075	ND*	0,34
076	0,69	0,36
077	0,52	ND*
079	0,48	0,32
081	0,50	0,50
082	0,38	0,56
083	0,98	0,66
084	0,52	0,58

continua

Amostras	T0	T1
085	0,33	0,42
086	0,36	0,47
087	0,31	0,51
088	0,49	ND*
090	0,38	0,65
092	0,34	0,56
095	0,93	0,46
097	0,67	0,40
098	0,45	0,49
099	0,79	0,75

Resultados das absorbâncias dados em U/mL *T0 (após o diagnóstico e antes do início da QT), T1 (entre o primeiro e segundo ciclo de QT); T2 (após o quarto ciclo de QT) e; T3 (ao término do último ciclo de QT). ND*: Não disponível.

Anexo 11. Genotipagem dos polimorfismos 192QR e 55LM, no gene da *PON1* e 148AG e 311SC, no gene da *PON2,* dos doadores (n=104).

	PON1		***PON2***	
Amostras	**192QR**	**55LM**	**148AG**	**311SC**
Doa – 001	QQ	LM	AA	CC
Doa – 004	RR	LL	AA	SC
Doa – 005	QQ	LL	GG	CC
Doa – 006	QQ	LM	AA	SS
Doa – 007	QQ	LL	AA	SC
Doa – 008	QR	LM	ND*	SC
Doa – 009	QR	LM	AA	SS
Doa – 011	QQ	MM	AG	SC
Doa – 012	QR	LL	AA	SS
Doa – 013	RR	LL	AA	SC
Doa – 014	QQ	LL	AA	SC
Doa – 015	QR	MM	AG	SC
Doa – 017	QQ	MM	AA	SS
Doa – 018	QR	LL	AA	SS
Doa – 019	RR	MM	AA	SS
Doa – 022	QQ	MM	AA	SS
Doa – 023	QQ	LM	AA	SS
Doa – 024	QQ	LM	AA	SC
Doa – 026	QQ	LL	AA	SC
Doa – 027	RR	LL	AA	ND*
Doa – 028	QQ	LL	AA	SC
Doa – 030	QQ	LL	AA	SC
Doa – 031	RR	LL	AG	SC
Doa – 032	QQ	MM	AG	SC
Doa – 033	RR	LL	AA	CC

continua

	PON1		*PON2*	
Amostras	**192QR**	**55LM**	**148AG**	**311SC**
Doa – 034	QQ	LM	AA	SC
Doa – 035	QQ	LL	AG	SS
Doa – 036	QQ	MM	AG	SC
Doa – 037	RR	LL	AG	SS
Doa – 038	QQ	LM	AG	SC
Doa – 039	QQ	MM	AA	SS
Doa – 040	QQ	LL	GG	SS
Doa – 041	QQ	LL	AA	CC
Doa – 042	QQ	LL	AA	SC
Doa – 043	RR	LM	AG	SS
Doa – 044	RR	LM	AG	SS
Doa – 045	QQ	LM	AG	SS
Doa – 046	QQ	LL	AA	SC
Doa – 047	QQ	LM	AA	SS
Doa – 048	QQ	LL	AA	SC
Doa – 050	QR	LM	AG	SS
Doa – 051	QQ	LL	AA	SS
Doa – 052	QQ	MM	AG	SC
Doa – 053	QQ	LM	AG	SS
Doa – 054	RR	LL	AG	SS
Doa – 056	RR	LL	AA	SS
Doa – 057	QQ	LM	AA	SC
Doa – 058	QQ	MM	AA	SC
Doa – 059	QQ	LL	GG	SC
Doa – 062	QR	LL	AG	SS
Doa – 063	QQ	LL	AA	SS

continua

	PON1		***PON 2***	
Amostras	**192QR**	**55LM**	**148AG**	**311SC**
Doa – 064	QR	LM	AG	SS
Doa – 065	QR	LL	AG	SS
Doa – 066	QR	LL	AA	SC
Doa – 067	RR	LL	AA	SC
Doa – 068	QR	LM	GG	SC
Doa – 071	QQ	LL	AG	SS
Doa – 072	QQ	MM	AG	CC
Doa – 073	RR	LL	AG	SS
Doa – 074	QR	LL	AA	CC
Doa – 075	QR	LL	AA	CC
Doa – 077	QQ	LL	AA	ND*
Doa – 078	QR	LL	AA	CC
Doa – 079	QR	MM	AG	SC
Doa – 080	QQ	LL	AG	SS
Doa – 081	QQ	LM	AA	SS
Doa – 082	QQ	LM	AA	SS
Doa – 083	RR	LL	AA	SC
Doa – 084	QQ	LM	AG	SS
Doa – 086	QQ	LM	AA	SS
Doa – 087	QQ	LM	AA	SC
Doa – 089	QR	LM	AG	SS
Doa – 092	QR	LM	AG	SS
Doa – 093	QQ	LM	AA	SC
Doa – 094	QR	LL	GG	SS
Doa – 095	QR	LM	AA	SS
Doa – 096	QQ	LM	AA	SS

continua

	PON1		*PON2*	
Amostras	**192QR**	**55LM**	**148AG**	**311SC**
Doa – 097	RR	LL	AA	SS
Doa – 098	QR	LL	AA	SS
Doa – 100	QR	LM	AA	SS
Doa – 101	QR	LM	AA	SC
Doa – 102	QQ	MM	AA	SC
Doa – 103	QQ	MM	AG	SC
Doa – 104	QQ	MM	AG	SC
Doa – 107	QQ	LM	AG	SS
Doa – 108	RR	LL	AG	CC
Doa – 109	QQ	LM	AA	CC
Doa – 110	QR	LM	AG	CC
Doa – 111	QQ	LM	AA	SS
Doa – 112	RR	LL	AA	SS
Doa – 113	QR	LL	AG	CC
Doa – 115	QR	LM	AG	CC
Doa – 116	QR	LL	AG	CC
Doa – 117	QQ	MM	AA	SS
Doa – 119	RR	LL	AG	CC
Doa – 121	QR	LL	AA	CC
Doa – 122	QR	LM	AA	SS
Doa – 123	QQ	LM	AG	CC
Doa – 124	RR	LL	AG	CC
Doa – 125	QR	LM	AA	SS
Doa – 126	QR	LM	AG	CC
Doa – 127	QQ	LL	AA	SS
Doa – 128	QR	LM	AG	CC

continua

	PON1		*PON2*	
Amostras	**192QR**	**55LM**	**148AG**	**311SC**
Doa – 130	RR	LL	AA	SS

Polimorfismos 192QR (QQ: homozigoto selvagem; QR: heterozigoto; RR: homozigoto mutado) e 55LM (LL: homozigoto selvagem; LM: heterozigoto; MM: homozigoto mutado) no gene da *PON1*. Polimorfismos 148AG (AA: homozigoto selvagem; AG: heterozigoto; GG: homozigoto mutado) e 311SC (SS: homozigoto selvagem; SC: heterozigoto; CC: homozigoto mutado) no gene da *PON2*. ND*: Não determinado.

Anexo 12. Idade, valores da atividade arilesterase (ARE) e atividade paraoxonase (PON) da PON1 sérica nos doadores (n = 104).

Amostras	Idade	ARE	PON
Doa – 001	60	69	88
Doa – 004	40	117	176
Doa – 005	61	141	69
Doa – 006	65	69	42
Doa – 007	31	112	67
Doa – 008	52	84	156
Doa – 009	37	92	111
Doa – 011	42	70	29
Doa – 012	37	137	111
Doa – 013	39	131	197
Doa – 014	31	108	108
Doa – 015	32	103	146
Doa – 017	41	66	128
Doa – 018	38	118	128
Doa – 019	32	78	23
Doa – 022	39	47	88
Doa – 023	41	55	45
Doa – 024	43	87	96
Doa – 026	49	66	151
Doa – 027	52	109	42
Doa – 028	47	105	163
Doa – 030	32	105	184
Doa – 031	38	94	39
Doa – 032	37	62	135
Doa – 033	46	95	85
Doa – 034	53	90	51
Doa – 035	61	107	32
Doa – 036	29	67	218
Doa – 037	31	108	99
Doa – 038	62	79	24
Doa – 039	41	62	56
Doa – 040	38	123	91
Doa – 041	43	97	40
Doa – 042	41	78	102

continua

Amostras	Idade	ARE	PON
Doa – 043	36	13	11
Doa – 044	35	98	169
Doa – 045	35	107	ND*
Doa – 046	31	107	42
Doa – 047	36	72	25
Doa – 048	46	94	43
Doa – 050	49	105	104
Doa – 051	43	85	69
Doa – 052	43	125	247
Doa – 053	52	89	95
Doa – 054	43	111	103
Doa – 056	60	86	144
Doa – 057	32	104	124
Doa – 058	30	91	30
Doa – 059	52	70	66
Doa – 062	44	96	55
Doa – 063	55	116	56
Doa – 064	50	92	96
Doa – 065	32	66	82
Doa – 066	28	68	30
Doa – 067	45	62	26
Doa – 068	38	88	88
Doa – 071	31	75	32
Doa – 072	53	84	37
Doa – 073	35	126	213
Doa – 074	61	68	105
Doa – 075	40	93	90
Doa – 077	34	100	119
Doa – 078	38	161	76
Doa – 079	49	91	40
Doa – 080	32	48	36
Doa – 081	39	69	115
Doa – 082	47	76	175
Doa – 083	45	70	116
Doa – 084	42	68	35
Doa – 086	38	100	46

continua

Amostras	Idade	ARE	PON
Doa – 087	36	109	36
Doa – 089	41	79	121
Doa – 092	58	64	26
Doa – 093	32	128	136
Doa – 094	65	92	83
Doa – 095	36	92	133
Doa – 096	33	77	31
Doa – 097	56	126	ND*
Doa – 098	58	96	128
Doa – 100	33	84	124
Doa – 101	32	84	103
Doa – 102	33	51	33
Doa – 103	59	101	151
Doa – 104	31	68	84
Doa – 107	60	78	48
Doa – 108	40	111	220
Doa – 109	35	95	125
Doa – 110	42	119	161
Doa – 111	55	65	87
Doa – 112	33	112	232
Doa – 113	36	126	194
Doa – 115	20	102	113
Doa – 116	35	126	159
Doa – 117	45	75	24
Doa – 119	58	128	177
Doa – 121	43	87	118
Doa – 122	32	89	127
Doa – 123	39	73	37
Doa – 124	37	84	170
Doa – 125	36	71	97
Doa – 126	31	130	156
Doa – 127	46	112	58
Doa – 128	32	97	88
Doa – 130	35	103	215

Determinação da atividade basal da paraoxonase sérica, utlizando como substratos o fenilacetato (resultado expresso em U/mL) e o *paraoxon* (resultado expresso em U/L). ND*. Não Determinado

7. Referências.

Acuña M, Eaton L, Cifuentes L. Genetics variants of paraoxonases (PON1 and PON2) in the Chilean population. *Hum Biol*. 200476 (2):299-305.

Agachan B, Yilmaz H, Ergen HA, Karaali ZE, Isbir T. Paraoxonase (PON1) 55 and 192 polymorphism and its effects to oxidant-antioxidant system in Turkish patients with type 2 diabetes mellitus. *Physiol Res.* 2005;54:287-93.

Agachan B, Yilmaz H, Karaali Z, Isbir T. Paraoxonase 55 and 192 polymorphism and its relationship to serum paraoxonase activity and serum lipids in Turkish patients with non-insulin dependent diabetes mellitus.*Cell Biochem Funct*. 2004;22(3):163-8.

Akanji AG. Estudo de marcação com iodo-131 de anticorpo monoclonal anti-CD20 usado na terapia de linfoma não-Hodgkin [Dissertação]. São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Autarquia Associada à Universidade de São Paulo, 2006.

Aldridge WN. Serum esterases 1. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. *Biochem J*. 1953;53:110-7.

Allebrandt KV, Souza RLR, Chautard-Freire-Maia, EA. Variability of the paraoxonase gene (PON1) in Euro and Afro-brazilians. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2002;180:151-6.

Armitage JO. Staging non-Hodgkin lymphoma. *CA Cancer J Clin.* 2005;55(6):368-76.

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.

Bassam BJ, Caetano-Annoles G, Gresshof PM. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem*. 1991;196:80-3.

Beer S, Moren X, Ruiz J, James RW. Postprandial modulation of serum paraoxonase activity and concentration in diabetic and non-diabetic subjects. *Nutr Metab Cardiovasc.* 2006;16:457-65.

Belteki G, Kempster SL, Forhead AJ, Giussani DA, Fowden AL, Curley A, Charnock-Jones DS, Smith GC. Paraoxonase-3, a putative circulating antioxidant, is systemically up-regulated in late gestation in the fetal rat, sheep, and human. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(8):3798-805.

Boright AP, Connelly PW, Brunt JH, Scherer SW, Tsui LC, Hegele RA. Genetic variation in paraoxonase-1 and paraoxonase-2 is associated with variation in plasma lipoproteins in Alberta Hutterites. *Atherosclerosis*. 1998;139:131–6.

Brandão SA, Izar MC, Fischer SM, Santos AO, Monteiro CM, Póvoa RM, Helfenstein T, Carvalho AC, Monteiro AM, Ramos E, Gidlund M, Figueiredo Neto AM, Fonseca FA. Early incresead in autoantibodies against human oxidized low-density lipoprotein in hypertensive patients after blood pressure control. *Am J Hypertens.* 2010;23(2):208-14.

Brophy VH, Jampsa RL, Clendenning JB, McKinstry LA, Jarvik GP, Furlong CE. Effects of 5' regulatory-region polymorphisms on paraoxonase-gene (PON1) expression. *Am J Hum Genet.* 2001;68:1428-36.

Burton PR, Tobin MD, Hopper JL. Key concepts in genetic epidemiology. *Lancet.* 2005;366:9489.

Calle R, McCarthy MI, Banerjee P, Zeggini E, Cull CA, Thorne KI, Wiltshire S, Terra S, Meyer D, Richmond J, Mancuso J, Milos P, Fryburg D, Holman RR. Paraoxonase 2 (PON2) polymorphisms and development of renal dysfunction in type 2 diabetes: *Diabetologia.* 2006;49:2892-99.

Campo S, Sardo AM, Campo GM, Avenoso A, Castaldo M, D'Ascola A, Giunta E, Calatroni A, Saitta A. Identification of paraoxonase 3 (PON3) missense mutations in a population of southern Italy. *Mutat Res*. 2004; 26; 546 (1-2): 75-80.

Camps J, Marsillach J, Rull A, Alonso-Villaverde C, Joven J. Interrelationships between Paraoxonase-1 and monocyte chemoattractant protein-1 in the regulation of hepatic Inflammation. *Paraoxonases in Inflammation, Infection, and Toxicology*. 2010;XVI:212-17.

Camuzcuoglu H, Arioz DT, Toy H, Kurt S, Celik H, Erel O. Serum paraoxonase and arylesterase activities with epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2009;112:481-5.

Carbone PP, Kaplan HS, Musshof K, Smithers DW, Tubiana M. Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification. *Cancer Res*. 1971;31:1860-1.

Cataño HC, Cueva JL, Cardenas AM, Izaguirre V, Zavaleta AI, Carranza E, Hernández AF. Distribution of Paraoxonase-1 gene polymorphisms and Enzyme activity in a peruvian population*. Environ Mol Mutagen.* 2006;47:699-706.

Chen Q, Reis SE, Kammerer CM, McNamara DM, Holubkov R, Sharaf BL, Spoko G, Pauly DF, Mercz CN, Kamboh MI*.* Association between the severity of angiographic coronary artery disease and paraoxonase gene polymorphisms in the National Heart, Lung, and Blood Institute-sponsored Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE) study. *Am J Hum Genet*. 2003;72:13–22.

Coiffier B. Rituximab therapy in malignant lymphoma. *Oncogene*. 2007;26:3603-13.

Correia JD, Perry IDS. Modulação dietética da atividade da paraoxonase: Revisão de estudos em humanos. *Rev HCPA.* 2010;30 (3).

Costa LG, Cole TB, Jarvik GP, Furlong CE. Functional genomics of the paraoxonase (PON 1) polymorphisms: Effects on pesticide sensitivity, cardiovascular disease and drug metabolism. *Annu Rev Med* 2003;54:371-92.

Costa LG, Giordano G, Furlong CE. Pharmacological and dietary modulators of paraoxonase 1 (PON1) activity and expression: the hunt goes on. *Biochem Pharmacol.* 2011;81(3):337-44.

Costa LG, Vitalone A, Cole TB, Furlong CE. Modulation of paraoxonase (PON1) activity. *Biochem Pharmacol*. 2005;69:541-50.

DATASUS (Departamento de Informática do SUS). Informações de Saúde – Epidemiológicas e Morbidade. [online]. 2009. Acessado em fevereiro de 2011.

Dasgupta S, Demirci FY, Dressen AS, Kao AH, Rhew EY, Ramsey-Goldman R, Manzi S, Kammerer CM, Kamboh MI. Association analysis of PON2 genetic variants with serum paraoxonase activity and systemic lupus erythematosus. *BMC Med Genet.* 2011;12:7

De Ross AJ, Davis S, Colt JS, Blair A, Airola M, Severson RK, Cozen W, Cerhan JR, Hartge P, Nuckols JR, Ward MH. Residential proximity to industrial facilities and risk of Non-Hodgkin Lymphoma. *Environ Res*. 2010;110(1):70-8.

De Ross AJ, Gold LS, Wang S, Hartge P, Cerhan JR, Cozen W, Yeager M, Chanock S, Rothman N, Severson RK. Metabolic gene variants and risk of non-hodgkin's lymphoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006;15 (9):1647-53.

Deakin S, Leviev I, Brulhart-Meynet M, James RW. Paraoxonase 1 promoter haplotypes and serum paraoxonase: A predominant role of polymorphic position-107, implicating the sp1 trasncription factor. *Biochem J.* 2003;372:643-9.

Draganov D, Teiber J, Speelman A, Osawa Y, Sunahara R, La Du B. Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. *J Lipid Res*. 2005;46(6):1239-47.

Draganov DI, La Du BN. Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. Naunyn Schmiedebergs. *Arch Pharmacol*. 2004;369:(1)78-88.

Draganov DI, Stetson PL, Watson CE, Billecke SS, La Du BN. Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation. *J Biol Chem*. 2000;275(43): 33435-42.

Duarte M, Moresco RN, de Bem AF. Metodologias para a determinação da LDL oxidada e sua aplicação como marcador de risco cardiovascular. *RBAC.* 2008;40(2):101-6.

Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. Paraoxonase and atherosclerosis**.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:473-80.

Eckerson HW, Wyte CM, La Du BN The Human Serum Paraoxonase/ arylesterase polymorphism. *Am J Human Genet*. 1983;35:1126-38.

Elkiran ET, Mar N, Aygen B, Gursu F, Karaoglu A, Koca S. Serum paraoxonase and arylesterase activities in patients with lung cancer in a Turkish population. *BMC Cancer.* 2007; 7:48.

Eng CS, Mohamed Ali S, Eric YPH, Gan L, Bing OY, Seng CK. Distribution of polymorphisms-PON1Q192R and PON1L55M among Chinese, Malay and Indian males in Singapore and possible susceptibility to organophosphate esposure. *Neurotoxicol*. 2009;30:214-9.

Eom SY, Kim YS, Lee CJ, Lee CH, Kim YD, Kim H. Effects of intronic and exonic polymorphisms of paraoxonase 1 (PON1) gene on serum PON1 activity in a Korean population. *J Korean Med Sci.* 2011;26(6):720-5.

Faggioni T. *O efeito do hábito de fumar sobre a atividade da enzima paraoxonase em uma população humana* [Dissertação]. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública, 2003.

Fernvik EC, Ketelhut DF, Russo M, Gidlund M. The autoantibodies repertoire against copper or macrophage modified LDL differ in normolipidemic and hypercholesterolemic patient. *J Clin Immunol.* 2004; 24(2):170-6.

Ferreira PRS. *Freqüência das mutações Gln192Arg e Leu55Met no gene da paraoxonase 1 e das mutações Ser311Cis e A148G no gene da paraoxonase 2 em brasileiros de diferentes origens étnicas* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2007.

Ferreri AJ, Ernberg I, Copie-Bergman C. Infectious agents and lymphoma development: molecular and clinical aspects. *J Intern Med*. 2009; 265:421-38

Fisher SG, Fisher RL. The epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma. *Oncogene.*2003;23:6524-34.

Flekac M, Skrha J, Zídková K, Lacinová Z, Hilgertová J. Paraoxonase 1 gene polymorphisms and enzyme activities in diabetes mellitus. *Physiol Res.* 2008;57: 717-26.

Furlong CE, Holland N, Richter RJ, Bradman A, Ho A, Eskenazi B. Pon 1 status of farmworker mothers and children as a predictor of organophosphate sensitivity. *Pharmocogenet Genomics.* 2006;16:183-90.

Gaidukov L, Rosenblat M, Aviram M, Tawfik DS. The 192R/Q polymorphs of serum paraoxonase PON1 differ in HDL binding, lipolactonase stimulation, and cholesterol efflux. *J Lipid Res*. 2006;47(11):2492-502.

Gaidukov L, Tawfik DS. High affinity, stability, and lactonase activity of serum paraoxonase PON1 anchored on HDL with apoA-I. *Biochemistry*. 2005;44:11843-54.

Gamboa R. Zamora J, Rodríguez-Pérez JM, Posadas-Romero C, Vargas-Alárcon G. Distribution of paraoxonase PON1 gene polymorphisms in Mexican Populations. Its role in the lipid profile. *Exp Mol Pathol*. 2006;80:85-90.

Gatter K, Pezzella F. Diffuse Large B-Cell lymphoma. *Diagnostic Histopathol.* 2009;16:2.

Geldmacher-V, Mallinckodt M, Diepgen TL. The human paraoxonase polymorphism and specificity. *Toxicol Env Chem*. 1988;18: 179-96.

Goswami B, Tayal D, Gupta N, Mallika V. Paraoxonase: A multifaceted biomolecule. *Clin Chim Act.* 2009;410:1-12.

Gupta N, Gill K, Singh S. Paraoxonases: structure, gene polymorphism & role in coronary disease. *Indian J Med Res.* 2009; 130: 361-8.

Gupta N, Singh S, Maturu VN, Sharma YP, Gill KD. Paraoxonase 1 (PON1) polymorphisms, haplotypes and activity in predicting cad risk in North-West Indian Punjabis. *PLoS One*. 2011;6(5) :e17805.

HALLACK NETO, AE. Tratamento do linfoma difuso de grandes células B: experiência do Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2004.

Harel M, Aharoni A, Gaidukov L, Brumshtein B, Khersonsky O, Meged R, Dvir H, Ravelli RB, Mccarthy A, Toker L, Silman I, Sussman JL, Tawfik DS. Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nat Struct Mol Biol*. 2004;11(5):412-9.

Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister T, Loomfield C. World Health Organization Classification of neoplasms of the hematopoietic and lymphoid tissues: Report of the Clinical Advisory Committee Meeting- Airlie House, Virginia. *Hematol.* 2000;32:246-61.

Hassett C, Richter RJ, Humbert R, Chapline C, Crabb JW, Omiecinski CJ, Furlong CE. Characterization of cDNA clones encoding rabbit and human serum paraoxonase: the mature protein retains its signal sequence. *Biochemistry*. 1991;30:10141– 9.

Hegele RA, Connelly PW, Scherer SW, Hanley AJ, Harris SB, Tsui LC, Zinman B, *et al*. Paraoxonase-2 gene (PON2) G148 variant associated with elevated fasting plasma glucose in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82(10):3373-7.

Hegele RA. Paraoxonase genes and disease. *Ann Med*. 1999;31:217– 224.

Hernandez AF, Mackness B, Rodrigo L, López O, Pla A, Gil F, Durrington PN, Pena G, Parron T, Serrano JL, Mackness MI. Paraoxonase activity and genetic polymorphisms in greenhouse workers with long term pesticide exposure. *Hum Exp Toxicol*. 2003;22:565-74.

Hjalgrim H, Engels EA. Infectious aetiology of Hodgkin and non-Hogkin lymphomas: a review of the epidemiological evidence. *J Intern Med.* 2008;264(4):537-48.

Holland N, Furlong C, Bastaki M, Ritcher R, Bradman A, Huen K, Beckman K, Eskenazi B. Paraoxonase polymorphisms, haplotypes , and enzyme activity in Latino mothers and newborns. *Environ Health Perspect*. 2006;114:985-91.

Horke S, Witte I, Wilgenbus P, Altenhofer S, Kruger M, Li H, Förstermann U. Protective effect of paraoxonase-2 against endoplasmatic reticulum stress-induced apoptosis is lost upon disturbance of calcium homoeostasis. *Biochem J*. 2008; 416: 395-405.

Horke S, Witte I, Wilgenbus P, Kruger M, Strand D, Forstermann U. Paraoxonase 2 reduces oxidative stress in vascular cells and decreases endoplasmatic reticulum stress-induced caspase activation. *Circulation*. 2007; 2055-64.

Hunt KE, Reichard KK. Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Arch Pathol Lab Med*. 2008;132.

Hussein YM, Gharib AF, Etewa RL, Elsawy WH. Association of L55M and Q192R polymorphisms in paraoxonase 1 (PON1) gene with breast cancer risk and their clinical significance. *Mol Cell Biochem.* 2011;351:117-23.

Iborra RT. Treinamento físico aeróbio aumenta a capacidade antioxidante das HDL e reduz o estresse oxidativo plasmático no diabete melito tipo 2 [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2006.

Jack S, Barrans S. Recent advances in the understanding of aggressive B-cell lymphomas. *Current Diagnostic Pathology*. 2004;10:360-73.

Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. Pathology & Genetics: Tumours of Haematopoietic and Limphoid Tissues. World Health Organization Classification of tumours. *Intern Agency Res Cancer (IARC* press). (Lyon). 2001.

Janka, Z.; Juhasz, A.; Rimanoczy, A. A.; Boda, K.; Marki-Zay, J.; Kalman, J. Codon 311 (CysYSer) polymorphism of paraoxonase-2 gene is associated with apolipoprotein E4 allele in both Alzheimer's and vascular dementias. *Mol. Psychiatry* 2002;7:110– 112.

Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, Feuer EJ, Thun MJ. Cancer Statistics. *CA J Clin*. 2005;55:10-30

Kang H, Chen IM, Wilson CS, Bedrick EJ, Harvey RC, Atlas SR, Devidas M, Mullighan CG, Wang X, Murphy M, Ar K, Wharton W, Borowitz MJ, Bowman WP, Bhojwani D, Carroll WL, Carmita BM, Reaman GH, Smith MA, Downing JR, Hunger SP, Willman CL. Gene expression classifiers for relapse-free survival and minimal residual disease improve risk classification and outcome prediction in pediatric B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2010;115:1394-405.

Kao Y, Donaghue KC, Chan A, Bennetts TH, Knight J, Silink M, Paraoxonase gene cluster is a genetic marker for early microvascular complications in type 1 diabetes. *Diabet Med.* 2002;19(3):212-5.

Kerridge I, Lincz L, Scorgie F, Hickey D, Granter N, Spencer A. association between xenobiotic gene polymorphisms and non-Hodgkin's lymphoma risk. *Brit J Haematol*. 2002;118:477-81.

Khersonsky O, Tawfik DS. Structure-reactivity studies of serum paraoxonase. PON1 suggest that is native activity is lactonase. *Biochemistry.* 2005;44:6371-82.

Khersonsky O, Tawfik DS. The histidine 115-histidine 134 dyad mediates the lactonase activity of mammalian serum paraoxonases. *J Biol Chem*. 2006;281:7649–56.

Kordi-Tamandani DM, Hashemi M, Sharifi N, Kaykhaei MA, Torkamanzehi A. Association between paraoxonase-1 gene polymorphism and risk of metabolic syndrome. *Mol Biol Rep*. 2011; 38:1-7.

Kristinsson SY, Landgren O, Sjöberg J, Turesson I, Björkholm M, Goldin LR. Autoimmunity and risk for Hodgkin's lymphoma by subtype. *Haematologica.* 2009;94:1468–9.

Kucukali CI, Aydin M, Ozkok E, Orhan N, Cakir U, Kilic G, Ozbek Z, Ince N, Kara I. Paraoxonase-1 55/192 genotypes in schizophrenic patients and their relatives in Turkish population. *Psychiatr Genet.* 2008;18(6):289–94.

La Du BN, Adkins S, Bayoumi RA. Analysis of the serum paraoxonase/arylesterase polymorphism in same Sudanese families. *Prog Clin Biol Res* 1986;214:81-98.

La Du BN, Aviram M, Billecke S, Navab M, Primo-Parmo S, Sorenson RC, Standiford TJ. On the physiological role (s) of the paraoxonases. *Chem Biol Interact.* 1999; 14: 119-20:379-88.

La DU BN. Future studies of low-activity PON1 phenotype subjects may reveal how PON1 protects against cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:1317-8.

La Du BN. Structural and functional diversity of paraoxonases. *Nat Med*. 1996;2:1186–7.

Lawlor DA, Day INM, Gaunt TR, Hinks LJ, Timpson N, Ebrahim S, Davey SG. The association of the paraoxonase (PON1) Q192R polymorphism with depression in older women: findings from the British Women's Heart and Health Study. *J Epidemiol Community Health*. 2007;61: 85–7.

Lerario AM*. Perfis de expressão de genes relacionados a metástases em uma coorte de pacientes adultos e pediátricos portadores de neoplasias do córtex da supra-renal* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2008.

Lescai F, Marchegiani F, Franceschi C. PON1 is a longevity gene: results of a meta-analysis. *Ageing Res Rev.* 2009;8(4):277-84

Leus FR, Zwart M, Kastelein JJ, Voorbij HA. PON2 gene variants are associated with clinical manifestations of cardiovascular disease in familial hypercholesterolemia patients. *Atherosclerosis*. 2001;154:641–9.

Li HL, LIU DP, LIANG CC. Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress, and diseases. *J Mol Med*. 2003;81(12):766-79.

Lim U, Gayles T, Katki HA, Stolzenberg-Solomon R, Weinstein SJ, Pietinen P, Taylor PR, Virtamo J, Albanes D. Serum high-density lipoprotein cholesterol and risk of non-hodgkin lymphoma. *Cancer Res.* 2007;67:11.

Lu H, Zhu J, Zang Y, Ze Y, Qin J. Cloning, purification, and refolding of human paraoxonase-3 expressed in Escherichia coli and its characterization. *Prot Exper Purif.* 2006;46: 92-9.

Mackness B, Davies GK, Turkie W, Lee E, Roberts DH, Hill E, Roberts C, Durrington PN, Mackness M. Paraoxonase status in coronary heart disease: are activity and concentration more important than genotype? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001; 21:1451–7.

Mackness B, Durrigton P, Mcelduff P, Yarnell J, Azam N, Watt M, Mackness M. Low paraoxonase activity predicts coronary events in the Caerphilly Prospective Study. *Circulation*. 2003;107(22): 2775-9.

Mackness B, Durrigton PN, Mackess MI. The paraoxonase gene family and coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol*. 2002;13:357–62.

Mackness B, Durrington PN, Mackness MI. Human serum paraoxonase. *Gen Pharmacol*. 1998;31(3):329-36.

Mackness MI, Arrol S, Durrigton PN. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett.* 1991;286:1(2)152-4.

Mackness MI, Mackness B, Durrington PN, Coneelly PW, Hegele RA. Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. Curr Opin Lipidol. 1996;7 (2):69-76.

Mackness MI, Mackness B. Paraoxonase 1 and atherosclerosis: is the gene or the protein more important? *Free Radical Biol Med.* 2004;37(9):1317-23.

Mackness MI. A-esterases. Enzymes looking for a role? *Biochem. Pharmacol*. 1989;38(3):385-90.

Marchegiani F, Marra M, Olivieri F, Cardelli M, James RW, Boemi M, Franceschi C. Paraoxonase 1: genetics and activities during aging. *Rejuvenation Res*. 2008; 11(1): 113–27.

Marsillach J, Camps J, Beltran-Debón R, Rull A, Aragones G, Maestre-Matínez C, Sabench F, Mackness B, Mackness M. Immunohistochemical analysis of paraoxonases-1, 2, and 3 expression in normal mouse tissues. *Free Radic Biol Med*. 2008;45:146–57.

Martinelli N, Girelli D, Olivieri O, Stranieri C, Trabetti E, Pizzolo F, Friso S, Tenuti I, Cheng S, Grow MA, Pignatti PF, Corrocher R. Interaction between smoking and PON2 Ser311Cys polymorphism as a determinant of the risk of myocardial infarction. *Eur J Clin Invest* 2004; 34:14-20.

Maselli LMF. *Estudo dos polimorfismos das paraoxonases 1 e 2 em pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana e avaliação do potencial de peroxidação lipídica* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2007.

Mazur A. An enzyme in animal tissues capable of hydrolyzing the phosphorus-fluorine bond of alkyl fluorophosphates. *J Biol Chem*. 1946;164:271-89.

Meilin E, Aviram M, Hayek T. Paraoxonase 2 (PON2) decreases high glucose-induced macrophage triglycerides (TG) accumulation, via inhibition of NADPH-oxidase and DGAT1 activity: studies in PON2-deficient mice. *Atherosclerosis* 2010;208:390–5.

Mesquita RA. *Linfomas de Boca: Reclassificação e caracterização das células dendríticas* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, 2002.

Miller AS, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Research*. 1998;16:1215.

Mochizuki H, Scherer SW, Xi T, Nickle DC, Mayer M, Huizenga JJ, Tsui LC, Prochazca M. Human PON2 gene at 7q21.3: cloning, multiple mRNA forms, and missense polymorphisms in the coding sequence. *Gen*. 1998;213:149–57.

Mohamed Ali S, Chia SE. Interethnic variablity of plasma paraoxonase (PON1) activity towards organophosphates and PON1 polymorphisms among asian populations – a short review. *Ind Health.* 2008;46(4):309-17.

Mota SMB. Linfoma Não-Hodgkin *Difuso de Grandes Células B: Características clínicas, tratamento e prognóstico com os esquemas quimioterápicos CHOP e CHOP-BLEO* [Dissertação]. Fortaleza: Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, 2006.

Motti C, Dessi M, Gnasso A, Irace C, Indigeno P, Angelucci CB, Bernardini S, Fucci G, Federici G, Cortese C. A multiplex PCR-based assay for the detection of paraxonase gene cluster polymorphisms. *Atherosclerosis*. 2001;158:35-40.

Müller AMS, Ihorst G, Mertelsmann R, Engelhardt M. Epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma (NHL): trends, geographic distribution, and etiology. *Ann Hematol*. 2005;84:1-12.

Naik PP, Ghadge MS, Raste AS. Lipid profile in leukemia and hodgkin’s disease. *Indian J Chem Techn.* 2006;21(2):100-2.

Ng CJ, Shih DM, Hama SY, Villa N, Navab M, Reddy ST. The paraoxonase gene family and atherosclerosis. *Free Radic Biol Med.* 2005;38:153–63.

Ng CJ, Wadleigh DJ, Gangopadhyay A, Hama S, Grijalva VR, Navab M, Fogelman AM, Reddy ST. 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.

Nogai H. Dörken B, Lenz G. Pathogenesis of Non-Hodgkin Lymphoma.*J Clin Oncol.* 2011;29:14.

Noto H, Yoshiaki H, Satoh H, Hara M, Iso-o N, Togo M, Kimura S, Tsukamoto K. Exclusive association of Paraoxonase 1 with High-Density Lipoprotein particles in Apoliprotein A-I deficiency. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;289(2):395-401.

Oliveira SA, Mansur AP, Ribeiro CC, Ramires JAF, Annichino-Bizzacchi JM. PON1 M/L55 mutation protects high-risk patients against coronary artery disease. *Int J Cardiol.* 2004;94(1):73-7.

Ozturk O, Kagnici OF, Ozturk T, Durak H, Tuzuner BM, Kisakesen HI, Çakalir C, Isbir T. 192R allele of paraoxonase 1 (PON1) gene as a new marker for susceptibility to bladder Cancer. *Anticancer Res*. 2009;29:4041-6.

Parra S, Marsillach J, Aragonès G, Rull A, Beltrán-Debón R, Alonso-Villaverde C, Joven J, Camps J. Methodological constraints in interpreting serum paraoxonase-1 activity measurements: an example from a study in HIV-infected patients. *Lipids Health Dis.* 2010;25(9):32.

Pasdar A, Ross-Adams H, Cumming A, Cheung J, Whalley L, St Clair D, MacLeod M. Paraoxonase gene polymorphism s and haplotype analysis in a stroke population. *BMC Medical Genet*. 2006;7:28.

Pérez-Herrera N, May CP, Hernández IO, Castro JM, Rojas EG, Borja VHA, Castillo TB, Quintanilla BV. Pon1 Q192R polymorphism is associated with lipid profile in mexican men with Mayan ascendancy. *Exp Toxicol Pathol.* 2008;85:129-34.

Phuntuwate W, Suthisisang C, Koanantakul B, Mackness MI, Mackness B. Paraoxonase 1 status in the Thai population. *J Hum Genet.* 2005:50-293-300.

Phuntuwate W, Suthisisang C, Koanantakul B, Mackness MI, Mackness B. Paraoxonase 1 status in the Thai population. *J Hum Genet.* 2005;50(6):293-300.

Pise- Masison CA, Radonovich M, Mahieux R, Chartterjee P, Whiteford C, Duvall J, Guillerm C, Gessain A, Brady JN. Transcription profile of cells infected with human T-cell leukemia virus type I compared with activated lymphocytes. *Cancer Res.* 2002;62:3562-71.

Prakash M, Shetty JK, Tripathy S, Verma M, Vasudev S, Bhandary PV. Serum paraoxonase in alcohol abusers associated with alcoholic liver disease. *Clin Chim Acta*. 2007;378:232–4.

Précourt LP, Amre D, Denis MC, Lavoie JC, Delvin E, Seidman E, Levy E. The three-gene paraoxonase family: Physiologic roles, actions and regulation. *Atherosclerosis*. 2011; 214: 20-36.

Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics*. 1996;33:498– 507.

Rainwater DL, Rutherford S, Dyer TD, Rainwater ED, Cole SA, VandeBerg JL, Almasy L, Blangero J, MacCluer JW, Mahaney MC. Determinants of variation in human serum paraoxonase activity. *Hereditary.* 2009;102:147-52.

Rajković MG, Barišić K, Juretić D, Grubišić TŽ, Flegar-Meštrić Z, Rumora L. Polymorphisms of pon1 and pon2 genes in hemodialyzed patients. *Clin Biochem*. 2011;44(12):964-8.

Ramaswamy S, Ross KN, Lander ES, Golub TR. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet*, 2003;33(1):49-54.

Reddy ST, Wadleigh DJ, Grijalva V, Ng C, Hama S, Gangopadhyay A, Shih DM, Lusis AJ, Navab M, Fogelman M. Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids*. Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:542–7.

Ricci Jr O. Caracterização clínica, citogenética e fatores de risco em linfoma de grandes células B difuso. *Rev bras hematol hemoter.* 2004;26(3):225-6.

Richter RJ, Jarvik GP, Furlong CE. Paraoxonase 1 (PON1) status and substrate hydrolysis. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009; 235(1): 1-9.

Rios DLS, D'onofrio O, Cerqueira CCS, Bonfim-Silva R, Carvalho HG, Santos-Filho A, Galvão-Castro B. 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.

Rojas-García AE, Solís-Heredia MJ, Piña-Guzmán B, Veja L, Lopez-Carrillo L, Quintanilla-Veja B. Genetic polymorphisms and activity of PON1 in a Mexican population. *Toxicol Appl Pharm*. 2005;205:282-9.

Roman E, Smith AG. Epidemiology of lymphomas. *Histopathol.* 2011;58:4-14.

Rosenblat M, Coleman R, Reddy ST, Aviram M. Paraoxonase 2 attenuates macrophage triglyceride accumulation via inhibition of diacylglycerol acyltransferase 1. *J Lipid Res* 2009;50:870–9.

Rosenblat M, Gaidukov L, Khersonsky O, Vaya J, Oren R, Tawfik DS, Aviram M. 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; 281:7657–65.

Rosenblat M, Volkova N, Ward J, Aviram M. Paraoxonase 1 (PON1) inhibits monocyte-to-macrophage differentiation. *Atherosclerosis*. 2011;219(1):49-56.

Ross ME, Zhou X, Song G, Shurtleff AS, Girtman K, Williams WK, Liu HC, Mahfouz R, Raimondi SC, Leny N, Patel A, Downing JR. Classification of pediatric acute lymphoblastic leukemia y gene expression profiling. *Blood*. 2003;102:2951-9.

Rossit A, Froes NDTC. Susceptibilidade genética, biometabolismo e Câncer. *Rev Br Cancerol.* 2000;10.

Rothem L, Hartman C, Dahan A, Lachter J, Eliakim R, Shamir R. Paraoxonases are associated with intestinal inflammatory diseases and intracellurarly localized to the endoplasmatic reticulum. *Free Radic Biol Med.* 2007;43:1239-47.

Roy AC, Saha N. Tay JS, Ratnam SS. Serum paraoxonase polymorphism in three populations of southeast Asia. *Human Hered*. 1991;41(4):265-9.

Saeed M, Perwaiz Iqbal M, Yousuf FA, Perveen S, Shafiq M, Sajid J, Frossard PM. Interactions and associations of paraoxonase gene cluster polymorphisms with myocardial infarction in a Pakistani population. *Clin Genet*. 2007;71(3):238-44.

Said J. Diffuse aggressive B-cell lymphomas. *Adv Anat Pathol*. 2009;16(4):216-35.

Sanghera DK, Aston CE, Saha N, Kambob MI. DNA Polymorphisms in two paraoxonase genes (PON1 and PON2) are associated with the risk of coronary heart disease. *Am J Hum Genet*. 1998;62:36–44.

Sanghera DK, Manzi S, Minster RL, Shaw P, Kao A, Bontempo F, Kamboh MI. Genetic variation in the paraoxonase-3 (PON3) gene is associated with serum PON1 activity. *Ann Hum Genet.* 2008;72(1):72-81.

Santos NPC, Ribeiro-dos-Santos AKC, Santos SEB. Frequency of the Q192R and L55M polymorphisms of the human serum paraoxonase gene (PON1) in ten Amazonian Ameridian tribes. *Genet Mol Biol.* 2005;28(1):36-9.

Scacchi R, Corbo RM, Rickards O, De Stefano GF. New data on the world distribution of paraoxonase (PON1 Gln192→Arg) gene frequencies. *Human Biol.* 2003; 75(3): 365-73.

Schwering I, Brauninger A, Klein U, Jungnickel B, Tinguely M, Diehl V, Hansmann ML, Dalla FR, Rajewsky K, Küpers R. Loss of the lineage-specific gene expression program in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. Blood. 2003;

101(4):1505-12.

Senti M, Tomas M, Elosual R, Sala J, Marrugat J, Covas MI, Fitó M. Interrelationship of smoking, paraoxonase activity, and leisure time physical activity: a population-based study. *Eur J Intern Med.* 2003;14(3):178-84.

Sepahvand F, Rahimi-Moghaddam P, Shafiei M, Ghhaffari SM, Rostam-Shirazi M, Mahmoudian M. Frequency of paraoxonase 192/55 polymorphism in an Iranian population. *J Toxicol Env Heal A.* 2007;70:1129-2007.

Seres I, Paragh G, Deschene E, Fulop T, Khalil A. Study of factors influencing the decreased HDL associated PON1 activity with aging. *Exp Gerontol.* 2004;39:59–66.

Shi J, Zhang S, Tang M, Liu X, Li T, Han H, Wang Y, Guo Y, Zhao J, Li H, Ma C. Possible association between Cys311Ser polymorphism of paraoxonase 2 gene and late-onset Alzheimer's disease in Chinese. *Brain Res Mol Brain Res*. 2004;120(2):201-4.

Shih DM, Lusis AJ. The roles of PON1 and PON2 in cardiovascular disease and innateimmunity. *Curr Opin Lipidol*. 2009;20:288-92.

Shih DM, Xia YR, Wang XP, Wang SS, Bouquard N, Fogelman AM, Lusis AJ, Reddy ST. Decreased obesity and aterosclerosis in human paraoxonase 3 transgenic mice. *Circ Res*. 2007;100(8):1200-7.

Shih DM, Xia YR, Yu JM, Lusis AJ. Temporal and tissue-specific patterns of PON3 expression in mouse: in situ hybridization analysis. *Adv Exp Med Biol*. 2010;660:7387.

Shin, BS. Paraoxonase gene polymorphism in south-western korean population. *J Korean Med Sci*. 2009;24:561-6.

Silva R. *Comparação entre as técnicas de imunofenotipagem por citometria de fluxo e reação em cadeia da polimerase no diagnóstico dos linfomas Folicular e Difuso de grande célula B* [Dissertação]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2009.

Singh S, Kumar V, Thakur S, Banerjee BD, Rautela RS, Grover SS, Rawat DS, Pasha ST, Jain SK, Ichhpujani RL, Rai A. Paraoxonase-1 genetic polymorphisms and susceptibility to DNA damage in workers occupationally exposed to organophosphate pesticides.*Toxicol Appl Pharmacol.* 2011;252(2):130-7.

Skibola CF, Curry JD, Nieters A. Genetic susceptibility to lymphoma. *Haematologica.* 2007; 92-960-9.

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;19:2214– 25.

Souza PO. Polimorfismos de enzimas de fase 1 e 2 do metabolismo de drogas em pacientes portadores de Linfoma Difuso de Grandes Células B [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2011.

Stevens VL, Rodriguez C, Pavluck AL, Thun MJ, Calle EE. Association of polymorphisms in the paraoxonase 1 gene with breast cancer incidence in the cps-ii nutrition cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15(6).

Stoltz DA, Ozer EA, Ng CJ, Yu JM, Reddy ST, Lusis AJ, Bouguard N, Parsek MR, Zabner J, Shih DM. Paraoxonase-2 deficiency enhances pseudomonas aeruginosa quorum sensing in murine tracheal epithelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007;292:L852-60.

Stoltz DA, Ozer EA, Recker TJ, Estin M, Yang X, Shih DM, Lusis AJ, Zabner J: A common mutation in paraoxonase-2 results in impaired lactonase activity. *J Biol Chem* 2009;284:35564-71.

Stone JM. Thomas Hodgkin: medical immortal and uncompromising idealist. *BUMC Proceedings*. 2005;18:368-75.

Sumegova K, Blazicek P, Fuhrman B, Waczulikova I, Durackova Z. Paraoxonase 1 (PON1) and its relationship to lipid variables, age and gender in healthy volunteers. *Biol*. 2006;61(6):699-704.

Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th ed. Lyon, France: IARC Press, 2008.

Taskiran P, Cam SF, Sekuri C, Tuzun N, Alioglu E, Altintas N, Berdeli A. The relationshiop between paraoxonase gene Leu-Met (55) ang Gln-Arg (192)

polymorphisms and coronary artery disease. *Arch Turk Soc Cardiol.* 2009;37(7): 473-8.

Tsakaris S, Karika GA, Parthimos T, Taskaris T, Akogiannis C, Schulpis KH. Alpha-tocopherol supplementation prevents the exercise-induced reduction of serum paraoxonase 1/arylesterase activities in healthy individuals. *Eur J Clin Nutr*. 2009;63: 215–21.

Uyar OA, Kara M, Erol D, Ardicoglu A, Yuce H. Investigating paraoxonase-1 gene Q192R and L55M polymorphism in patients with renal cell cancer. *Genet Mol Res*. 2011;10(1):133-9.

Vaisi-Raygani A, Ghaneialvar H, Rahimi Z, Tavilani H, Pourmotabbed T, Shakiba E, Vaisi-Raygani A, Kiani A, Aminian M, Alibakhshi R, Bartels C. Paraoxonase Arg 192 allele is an independent risk factor for three-vessel stenosis of coronary artery disesase. *Mol Biol Rep*. 2011;1-8.

Van Der Waal RIF, Huijgens PC, Van Der Valk P, Van Der Waal I. Characteristics of 40 primary extranodal non-Hodgkin lymphomas of the oral cavity in perspective of the new WHO classification and the International Prognostic Index. *J Maxillofac Sur*. 2005;34:391-5.

Van Himbergen TM, Van Tits LJ, Roest M, Stalenhoef AF. The story of PON1: how an organophosphate-hydrolysing enzyme is becoming a player in cardiovascular medicine. *Neth J Med.* 2006;4(2):34-8.

Veloso GDC, Clementino NCD. *Linfoma Não-Hodgkin: revisão morfológica, clínica, tratamento e evolução.Experiência do Hospital das Clínicas da UFMG no período de 2000 a 2005.* [Dissertação]. Minas Gerais: Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.

Wang XY, Xue YM, Wen SJ, Zhang NL, Ji Z, Pan SY. The association of paraoxonase 2 gene C311S variant with ischemic stroke in Chinese type 2 diabetes mellitus patients. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*. 2003;20(3):215-9.

Witte I, Altenhöfer S, Wilgenbus P, Amort J, Pautz A, Li H, Förstermann U, Horke S. Beyond reduction of atherosclerosis: PON2 provides apoptosis resistance and stabilizes tumor cells. *Cell Death Dis.* 2011;(2):112.

Yamada Y, Ando F, Niino N, Miki T, Shimokata H. Association of polymorphisms of paraoxonase 1 and 2 genes, alone or in combination, with bone mineral density in community-dwelling Japanese. *J. Hum. Genet 2003;*48:469–475.

Yamaguchi M, Nakamura N, Suzuki R, Kagami Y, Okamoto M, Ichinohasama R, Yoshino T, Suzumiya J, Murase T, Miura I, Ohshima K, Nishikori M, Tamaru JI, Taniwaki M, Hirano M, Morishima Y, Ueda R, Shiku H, Nakamura S. *De novo* $CD5^{+}$ diffuse large B-cell lymphoma: results of a detailed clinicopathological review in 120 patients. *Haematologica*. 2008;93(8):1195.

Yıldırım S, Akar S, Kuyucu M, Yıldırım A, Dane S, Aygül R. Paraoxonase 1 gene polymorphisms, paraoxonase/arylesterase activities and oxidized low-density lipoprotein levels in patients with migraine. *Cell Biochem Funct.* 2011;29(7):549-54.

Zainuddim N. Molecular Genetic Analysis in B-Cell Lymomas. A focus on the p53 pathway and $p16^{INK4a}$. Acta Universitatis Upsaliensis. Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine, 2010.

Zhang Y, Zheng F, Du H, Krepinsky JC, Segbo JÁ, Zhou X. Detecting the polymorphisms of paraoxonase (PON) cluster in Chinese Han population based on a rapid method. *Clin Chim Acta.* 2006; 365(1-2):98-103.

Zintzaras E, Voulgarelis M, Moutsopoulos HM. The risk of lymphoma development in autoimmune diseases: a meta-analysis. *Arch Intern Med*. 2005;165:2337-44.