UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Avaliação dos polimorfismos *L55M e Q192R* do gene *PON1* e do polimorfismo *S311C* do gene *PON2* na doença arterial coronariana em adultos jovens

Érika Miguel de Souza

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador: Prof. Tit. Mario Hiroyuki Hirata

São Paulo
2005

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Avaliação dos polimorfismos *L55M e Q192R* do gene *PON1* e do polimorfismo *S311C* do gene *PON2* na doença arterial coronariana em adultos jovens

Érika Miguel de Souza

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador: Prof. Tit. Mario Hiroyuki Hirata

São Paulo
2005

18471

DEDALUS - Acervo - CQ

30100011693

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

S829a Souza, Érika Miguel de
Avaliação dos polimorfismos L55M e Q192R do gene PON1 e do polimorfismo S311C do gene PON2 na doença arterial coronariana em adultos jovens / Érika Miguel de Souza -- São Paulo, 2005.
110p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Hirata, Mario Hiroyuki

1. Análise clínica : Medicina 2. Biologia molecular 3. DNA : Polimorfismo genética I. T. II. Hirata, Mario Hiroyuki, orientador

616.0756-9 CDD

Érika Miguel de Souza

Avaliação dos polimorfismos *L55M* e *Q192R* do gene *PON1* e do polimorfismo *S311C* do gene *PON2* na doença arterial coronariana em adultos jovens

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Tit. Mario Hiroyuki Hirata
Orientador/Presidente

_____
Examinador

_____
Examinador

23/02/06

São Paulo, ___ de _____ de 200__.

À minha mãe, que sempre me fez crer na força do conhecimento.

Ao Rodrigo, Bruna e Eduardo, motivações diárias de alegria em minha vida, que me apoiaram incondicionalmente.

Agradecimentos

Ao Prof. Tit. Mario Hiroyuki Hirata, pela orientação, ensinamentos e sugestões que foram fundamentais na realização deste trabalho.

À Profª. Assoc. Rosario Dominguez Crespo Hirata, pela colaboração e participação na minha formação.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em nome da sua Diretora, Profª. Tit. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto.

Aos funcionários da Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Farmácia: Elaine Midori Ychico, Jorge Alves de Lima e Benedita Espírito Santo de Oliveira.

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêutica da Universidade de São Paulo, em nome de sua chefe, Profª. Tit. Ana Campa.

À Profª. Tit. Dulcineia Saes Parra Abdalla, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia - Área de Análises Clínicas, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Farmácia - Área de Análises Clínicas, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Às funcionárias da secretaria do Departamento de Análises Clínicas da FCF-USP: Márcia Cristina Caramico, Sueli Providelo, Ana Maria Dantas e Maria Auxiliadora de Lima.

Às funcionárias do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP, Claudia Luciano dos Reis, Carmen Lúcia Moura e Maria Dorlei Moura.

Ao Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia de São Paulo – Seção de Coronárias - em nome do médico cardiologista Dr. Marcelo Ferraz Sampaio, pela cooperação na seleção das pacientes deste trabalho.

Ao Laboratório Clínico do Instituto Dante Pazzanese pela realização das análises laboratoriais desta pesquisa.

À Profª. Dra Silvya Stuchi Maria Engler e ao Dr. Marcelo Chiara Bertolami, componentes da Comissão Julgadora do Exame de Qualificação, pelas valiosas sugestões que contribuíram para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Ao Helymar C. Machado, estatístico da Universidade Estadual de Campinas-SP, pelo valioso auxílio prestado nas análises estatísticas, que contribuíram em muito para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Aos voluntários que participaram deste estudo e contribuíram para o aumento do conhecimento científico.

Às colegas Fabiana Cristina Pereira dos Santos e Alice Cristina Rodrigues, que contribuíram no desenvolvimento da parte técnica deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico da FCF-USP: Raffaella Picciotti, Marília Reis Gonçalves Rocha, Mustafa Hassan Issa, Heluih Ata Abdallah, Evelyn K. Anzai, Adriana Natsue Ozaki, Paulo Henrique Lage Carbone, Hamilton Massayuki Hinuy, Carlos Eduardo de Melo, Bety Chen, Raimundo Antônio Gomes de Oliveira, Ivanise Marina Moretti Rebecchi, Selma Andréa Cavalli, Luis Antonio Salazar Navarrete, André Ducati Luchessi, Cristina Moreno Fajardo, Fabiana Dalla Vecchia, Francisco José Forestiero, Letícia Cecon, Maria Alice Vieira Willrich, Raquel de Oliveira, Sarah Aparecida Soares, Simone Cohen Sorkin, Verônica Simões de Oliveira, Vladimir Tavares, Claudia Muraro Carvalho, Leila Badreddine, Patrícia Barco, Sun Ok Yoon, Taiza Stumpp e Tânia Sueli de Andrade.

A todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para que esse trabalho pudesse ser concretizado.

Resumo

SOUZA, E.M. **Avaliação dos polimorfismos *L55M* e *Q192R* do gene *PON1* e do polimorfismo *S311C* do gene *PON2* na doença arterial coronariana em adultos jovens.** São Paulo, 2005. 110p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

O efeito anti-aterogênico da HDL foi sugerido ser devido, parcialmente, à ação da paraoxonase (PON) associada à HDL. Três SNPs em *PON1* (*L55M* e *Q192R*) e *PON2* (*S311C*) têm sido implicados como fatores de risco independentes para doença arterial coronariana (DAC) em alguns, mas não todos os estudos. O efeito destes três polimorfismos do gene *PON* na DAC e na concentração sérica de lipídios, apolipoproteínas A-I e B (apo A-I e apo B) foi investigado em 221 indivíduos sem vínculos genéticos. Os três polimorfismos genéticos (*L55M*, *Q192R* e *S311C*) do gene *PON* foram analisados por PCR-RFLP. Não houve diferença entre a distribuição genotípica e a freqüência relativa dos alelos dos polimorfismos *L55M*, *Q192R* e *S311C* do gene *PON* entre pacientes e controles. Não houve associação entre os polimorfismos da PON e a DAC na população estudada. As freqüências dos haplótipos dos pacientes foram similares às encontradas no grupo controle. O polimorfismo *L55M* do gene *PON1* está associado com variações na concentração sérica de apo A-I dos pacientes. O polimorfismo *S311C* do gene *PON2* não está associado com variações na concentração sérica de lipídios, apo A-I e apo B dos pacientes.

Abstract

SOUZA, E.M. **Assessment of the *L55M* and *Q192R* polimorfisms of the *PON1* gene and *S311C* polimorfism of the gene *PON2* in the coronary artery disease in young adults.** São Paulo, 2005. 110p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

The anti-atherogtenic effect of the HDL has been suggested to be due, partially, to the action of the HDL-associated paroxonase(PON). Three SNPs in *PON1* (*L55M* e *Q192R*) and *PON2* (*S311C*) have been involved as independent risk factors for coronary artery disease (CAD), in some, but not all studies. The effect of these three polymorphisms of the *PON* gene on CAD and on the level of lipids, apolipoproteins A-I e B (apo A1 and apo B) was investigated in 221 genetically unrelated individuals. The three gene polymorphismis (*L55M*, *Q192R* e *S311C*) of the *PON* gene were analyzed by PCR-RFLP. Is no significant difference between distribuition of genotype and allele frequencies of the *L55M*, *Q192R* and *S311C* polymorfisms of the *PON* gene between patient group and controls. Is no association between polymorphisms of the PON gene and CAD in the population studied. The frequencies of the haplotypes in the patients were similar to those found in the control group. The *L55M* polymorphism of the *PON1* gene is associated with variations of the level of polipoprotein A-I at patients. The *S311C* polymorphism of the *PON2* is not associated with variations of the level of lipids, apo A-I and apo B at patients.

Lista de ilustrações

Figura 2.1 - Processo aterosclerótico..... 23

Figura 2.2 - Progressão da lesão aterosclerótica..... 25

Figura 2.3 - Metabolismo de lipoproteínas..... 28

Figura 2.4 - Mecanismo do efluxo de colesterol da parede arterial..... 29

Figura 2.5 – Localização dos membros da família gênica *PON* (*PON1, PON2 e PON3*)..... 30

Figura 2.6 - Estrutura cristalográfica da PON1..... 34

Figura 4.1 – Representação esquemática dos fragmentos com o polimorfismo *L55M* do gene *PON1* após restrição enzimática com *Nla*III..... 35

Figura 4.2 – Representação esquemática dos fragmentos com o polimorfismo *Q192R* do gene *PON1* após restrição enzimática com *Mbo*I..... 50

Figura 4.3 – Representação esquemática dos fragmentos com o polimorfismo *S311C* do gene *PON2* após restrição enzimática com *Dde*I..... 51

Figura 5.1 – Perfil de parâmetros bioquímicos dos indivíduos agrupados de acordo com os GC e GE..... 52

Figura 5.2 – Fotografia do gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo, sob luz U.V., dos produtos de amplificação da região polimórfica *L55M* do gene *PON1*..... 57

Figura 5.3 – Fotografia do gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo, sob luz U.V., dos fragmentos de restrição com a enzima *Nla*III da região polimórfica *L55M* do gene *PON1*..... 58

Figura 5.4 – Distribuição das freqüências dos genótipos (%) para o polimorfismo *L55M* do gene da *PON1* no grupo de estudo (GE) e controle (GC)..... 60

Figura 5.5 – Fotografia do gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo, sob luz U.V., dos produtos de amplificação da região polimórfica *Q192R* do gene *PON1*. 62

Figura 5.6 – Fotografia do gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo, sob luz U.V., dos fragmentos de restrição com a enzima *Mbo*I da região polimórfica *Q192R* do gene *PON1*. 63

Figura 5.7 – Distribuição das freqüências dos genótipos (%) para o polimorfismo *Q192R* do gene da *PON1* no grupo de estudo (GE) e controle (GC). 65

Figura 5.8 – Fotografia do gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo, sob luz U.V., dos produtos de amplificação da região polimórfica *S311C* do gene *PON2*..... 68

Figura 5.9 – Fotografia do gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo, sob luz U.V., dos fragmentos de restrição com a enzima *Mbo*I da região polimórfica *S311C* do gene *PON2*.... 68

Figura 5.10 - Distribuição das freqüências dos genótipos (%) para o polimorfismo *S311C* do gene da *PON2* no grupo de estudo (GE) e controle (GC)..... 70

Figura 5.11 - Distribuição dos genótipos e freqüências dos haplótipos dos polimorfismos *L55M* e *Q192R* do gene *PON1* nos indivíduos do grupo de estudo (GE) e do grupo controle (GC)..... 73

Lista de tabelas e quadros

Tabela 2.1 - Principais atores de risco que predispõem à aterosclerose... 21

Quadro 2.1 - Características principais das lipoproteínas humanas..... 26

Tabela 2.2 - Genes associados com o fenótipo doença cardiovascular.... 31

Tabela 2.3 – Evidências e possíveis mecanismos da propriedade antioxidante da PON1 humana..... 36

Tabela 4.1 – Metodologias para determinações bioquímicas utilizando produtos da Roche Diagnóstica..... 44

Tabela 4.2 – Iniciadores utilizados na reação de PCR para amplificação das regiões polimórficas dos genes da paraoxonase..... 46

Tabela 4.3 – Condições utilizadas na PCR para amplificação do polimorfismo *L55M* do gene *PON1*..... 47

Tabela 4.4 – Condições utilizadas na PCR para amplificação do polimorfismo *Q192R* do gene *PON1*..... 47

Tabela 4.5 – Condições utilizadas na PCR para amplificação do polimorfismo *S311C* do gene *PON2*..... 48

Tabela 5.1 – Dados biodemográficos e características clínicas dos indvíduos do grupo econtrole (GC) e do grupo estudo (GE).. 55

Tabela 5.2 – Concentrações séricas dos parâmetros bioquímicos (média ± DP) dos indivíduos do grupo controle (GC) e do grupo de estudo (GE)..... 56

Tabela 5.3 – Distribuição das freqüências dos genótipos e dos alelos do polimorfismo *L55M* do gene *PON1* dos indivíduos do grupo de estudo (GE) e do grupo controle (GC)..... 59

Tabela 5.4 – Distribuição das concentrações séricas dos parâmetros bioquímicos (média ± DP) dos indivíduos adultos infartados jovens (GE), dos indivíduos do grupo controle (GC) e (GE+GC), de acordo com os genótipos do polimorfismo *L55M* do gene *PON1*..... 61

Tabela 5.5 – Distribuição das concentrações séricas dos parâmetros bioquímicos (média ± DP) dos indivíduos adultos infartados jovens (GE), dos indivíduos do grupo controle (GC), de acordo com os genótipos (LL vs LM + MM) do polimorfismo *L55M* do gene *PON1*..... 62

Tabela 5.6 – Distribuição dos genótipos e freqüências dos alelos do polimorfismo *Q192R* do gene *PON1* nos indivíduos do grupo de estudo (GE) e do grupo controle (GC)..... 64

Tabela 5.7 – Distribuição das concentrações séricas dos parâmetros bioquímicos (média ± DP) dos indivíduos adultos infartados jovens (GE), indivíduos do grupo controle (GC) e (GE+GC), de acordo com os genótipos do polimorfismo *Q192R* do gene *PON1*..... 66

Tabela 5.8 – Distribuição das concentrações séricas dos parâmetros bioquímicos (média ± DP) dos indivíduos adultos infartados jovens (GE), dos indivíduos do grupo controle (GC), de acordo com os genótipos (QQ vs QR + RR) do polimorfismo *Q192R* do gene *PON1*..... 67

Tabela 5.9 – Distribuição dos genótipos e freqüências dos alelos do polimorfismo *S311C* do gene *PON2* nos indivíduos do grupo de estudo (GE) e do grupo controle (GC)..... 69

Tabela 5.10- Distribuição das concentrações séricas dos parâmetros bioquímicos (média ± DP) dos indivíduos adultos infartados jovens (GE), indivíduos do grupo controle (GC) e (GE+GC), de acordo com os genótipos do polimorfismo *S311C* do gene *PON2*..... 71

Tabela 5.11– Distribuição das concentrações séricas dos parâmetros bioquímicos (média ± DP) dos indivíduos adultos infartados jovens (GE), dos indivíduos do grupo controle (GC), de acordo com os genótipos (SS vs SC + CC) do polimorfismo *S311C* do gene da *PON2*..... 72

Tabela 5.12- Distribuição dos genótipos e freqüências dos haplótipos dos polimorfismos *L55M* e *Q192R* do gene *PON1* nos indivíduos do grupo de estudo (GE) e do grupo controle (GC)..... 73

Tabela 5.13- Resultados das análises de regressão logítica univariadas para a influência de *PON1-55* e *PON1-192* nas variáveis lipídicas do grupo controle (GC)..... 75

Tabela 5.14- Resultados das análises de regressão logítica univariadas para a influência de *PON1-55* e *PON1-192* nas variáveis lipídicas do grupo controle (GE)..... 76

Tabela 5.15- Resultados das análises de regressão logítica multivariadas para a influência dos alelos dos polimorfismos *L55M*, *Q192R* e *S311C* nos parametros lipídicos do grupo controle (GC)..... 77

Tabela 5.16- Resultados das análises de regressão logítica multivariadas para a influência dos alelos dos polimorfismos *L55M*, *Q192R* e *S311C* nos parametros lipídicos do grupo de estudo (GE)..... 78

Lista de abreviaturas

apo	Apolipoproteína
CETP	Enzima colesteril éster transferase
CT	Colesterol total
DAC	Doença arterial coronariana
DCV	Doenças cardiovasculares
DNA	Ácido desoxi-ribonucléico
DP	Desvio-padrão
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
HDL-C	Colesterol da lipoproteína de alta densidade
IAM	Infarto agudo do miocárdio
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
Kb	Kilobases
KDa	Kilodalton
LCAT	Enzima lecitina colesterol aciltransferase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDL-C	Colesterol da lipoproteína de baixa densidade
LDL-ox	LDL-oxidada
LH	Lipase hepática
Lp[a]	Lipoproteína (a)
LRP	Receptor da Proteína Relacionada ao RLDL
Mg	Miligramas
Mm	Milimol
MRFIT	Multiple Risk Factor Intervention Trial
PCR	*Polymerase chain reaction*, reação em cadeia pela polimerase
PON	Gene da enzima paraoxonase humana
PON1	Gene da enzima paraoxonase humana 1
PON2	Gene da enzima paraoxonase humana 2
RFLP	Polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição
RLDL	Receptor da LDL
RNA	Ácido ribonucléico
RNAm	RNA mensageiro

SNP	Polimorfismo em único nucleotídeo
TBE	Tampão Tris-Borato-EDTA
TE	Tampão Tris-EDTA
TG	Triglicerídeos
UV	Ultra-violeta
VLDL-C	Colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade

Sumário

Resumo ..... *viii*
Abstract ..... *ix*
Lista de ilustrações ..... *x*
Lista de tabelas e quadros ..... *xii*
Lista de abreviaturas ..... *xiv*
1 Introdução 17
2 Revisão de literatura 19
2.1 As doenças do aparelho circulatório e os fatores de risco 19
2.2 Aterosclerose e infarto do miocárdio 22
2.3 Lipoproteínas 25
2.4 Marcadores genéticos 31
2.5 Paraoxonase (PON) 33
3 Objetivos 39
4 Material e métodos 40
4.1 Casuística 40
4.2 Material 42
4.3 Métodos 43
5 Resultados 54
6 Discussão 80
7 Conclusões 89
Referências bibliográficas 90
Anexos 104

1 INTRODUÇÃO

Apesar de importantes avanços na compreensão dos mecanismos fisiopatológicos e da existência de diversos agentes terapêuticos efetivos, as doenças do aparelho circulatório são, atualmente, responsáveis por altos índices da mortalidade no Brasil, apresentando uma taxa de 31,5% em 2002 (www.datasus.gov.br).

Estudos epidemiológicos realizados nas últimas décadas, identificaram um grupo de fatores que predispõem os indivíduos a um maior risco de desenvolvimento de doença arterial coronariana (DAC). Dentre estes fatores de risco, as concentrações séricas baixas do colesterol da lipropoteína de alta densidade (HDL-C) têm emergido como um fator importante (MILLER & MILLER, 1975; MILLER, 1978; CASTELLI & ANDERSON, 1986; CASTELLI, 1996). Desde o conhecimento destas informações, o mecanismo pelo qual a HDL exerce seu efeito protetor emergiu como um foco importante nas pesquisas científicas.

A função anti-aterogênica da partícula de HDL parece não ser um mecanismo único, mas sua propriedade funcional, a qual é altamente dependente das proteínas associadas à partícula, é um determinante conhecido para desenvolvimento de DAC. A HDL é uma molécula complexa e heterogênea, associada com um grande número de proteínas diferentes na circulação. Uma propriedade anti-aterogênica bem conhecida da HDL, é sua função no transporte reverso do colesterol, um processo pelo qual a HDL retira o excesso de colesterol localizado nos tecidos periféricos e transporta para o fígado. Além disso, é sugerido que a HDL protege contra DAC por inibir a modificação oxidativa da lipoproteína de baixa densidade (LDL), a qual, atualmente, está relacionada com inicialização e progressão

da aterosclerose (NAVAB *et al.*, 2004). A partícula de HDL foi associada com ambos mecanismos, proteção da LDL contra oxidação e atenuação da atividade biológica da LDL oxidada (LDLox) (NAVAB *et al.*, 2000a; NAVAB *et al.*, 2000b).

As propriedades antioxidantes e anti-aterogênicas da HDL têm sido atribuídas às proteínas associadas a ela, dentre estas proteínas, a enzima paraoxonase (PON) foi relacionada com a propriedade antioxidadante da HDL (MACKNESS, ARROL & DURRINGTON, 1991). Subsequentemente, foram identificadas variantes gênicas da PON associadas à condições fisiopatológicas como: doença arterial coronariana, acidente vascular cerebral e hipercolesterolemia familiar (HEGELE, BRUNT & CONNELLY, 1995; ODAWARA, TACHI & YAMASHITA, 1997; SANGHERA *et al.*, 1998; PFOHL *et al.*, 1999; IMAI *et al.*, 2000; VOETSCH *et al.*, 2002; CHEN *et al.*, 2003; SHI *et al.*, 2004; MARTINELLI *et al.*, 2004).

A DAC é uma doença complexa, multifatorial, dependente de uma série de fatores ambientais e genéticos. O conhecimento destes fatores torna-se primordial para o entendimento da etiologia e fisiopatologia desta doença e deste modo, este conhecimento pode contribuir para melhorar o prognóstico, prevenção e tratamento.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 As doenças do aparelho circulatório e os fatores de risco

Os grupos mais significativos de causas por afecções do aparelho circulatório (códigos I-00 a I-99, do Capítulo IX da CID-10) são a doença isquêmica do coração (I-20 a I-25) e a doença cerebrovascular (I-60 a I-69) (www.datasus.gov.br).

No Brasil, as doenças do aparelho circulatório são responsáveis pelas maiores taxas de mortalidade e morbidade nos grupos de doenças humanas com causas definidas, sendo responsáveis, também, por cerca de 11% das internações hospitalares pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Em 2002, a taxa de mortalidade por doenças do aparelho circulatório foi 31,5%, seguida pela mortalidade por neoplasias (15,3%) e por causas externas (14,9%) (www.datasus.gov.br).

Embora, tenha havido, nas últimas décadas, uma redução nas taxas de mortalidade causadas por estas doenças, tanto nos EUA quanto no Brasil, os valores atuais, ainda, são elevados. Nos EUA, a mortalidade devido a doenças do aparelho circulatório sofreu uma diminuição desde os anos 80. No período de 1991 a 2001, houve uma redução média de 18,8% na taxa de mortalidade por doenças cardiovasculares para ambos os sexos (AMERICAN HEART ASSOCIATION, 2005).

No Brasil, a redução nos valores de mortalidade pôde ser observada a partir de 1985, como mostra um estudo no qual foram utilizados dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) e do Banco de dados do Sistema Único de Saúde (DATASUS), ambos do período de 1979 à 1996. Os resultados deste estudo indicaram redução da mortalidade por doenças cerebrovasculares e por doenças isquêmicas do coração para ambos os

sexos. Em relação às doenças cerebrovasculares houve diminuição de, aproximadamente, 8,0 mortes por ano em ambos os sexos, mas apresentou maior incidência entre as mulheres quando comparada com as doenças isquêmicas do coração. Entre 1979 e 1996, a taxa de mortalidade da doença isquêmica do coração passou de 549 mortes por grupo de 100.000 habitantes para 492 mortes, o que significa uma redução anual de 2,9 mortes por ano em homens e de 1,7 mortes por ano em mulheres (MANSUR *et al.*, 2001).

Várias causas contribuíram para a redução nas taxas de mortalidade e morbidade por doenças do aparelho circulatório, e provavelmente, a causa mais importante foi o controle dos fatores de risco para prevenção primária e secundária da aterosclerose. Pois, dentre as anormalidades vasculares que provocam manifestação clínica, a aterosclerose é a mais prevalente e significativa (SANTOS, GIANNINI & FONSECA, 2001).

Nos últimos 30 anos, os resultados dos estudos realizados permitiram identificar um grupo de fatores que predispõem os indivíduos a um maior risco de desenvolvimento de aterosclerose, e consequentemente, ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Estes fatores de risco, denominados tradicionais ou clássicos, foram identificados por meio de diversos estudos epidemiológicos e clínicos prospectivos em grupos bem definidos da população. Dentre estes fatores destacam-se as dislipidemias, tabagismo, hipertensão arterial sistêmica (HAS), diabete melito (DM), idade e a história familiar de doença arterial coronariana, que representa o componente genético (tabela 2.1). Estes estudos também mostraram que a concentração plasmática elevada de colesterol total (CT) e colesterol da lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) estão entre os principais fatores de risco para o desenvolvimento de doença aterosclerótica cardiovascular, assim como baixas concentrações do colesterol da lipoproteína de alta densidade (HDL-C) (MILLER, 1978; STAMLER, WENTWORTH & NEATON, 1986; RIFAI, BACHORIK & ALBERTS, 1999; KANNEL, 2000; MENOTTI *et al.*, 2000; MORTALITY ..., 1990).

Tabela 2.1 - Principais atores de risco que predispõem à aterosclerose

Fatores de Risco
Dislipidemia (CT > 160 mg/dL, LDL-C > 160 mg/dL, HDL-C < 40 mg/dL)
Tabagismo
Hipertensão arterial sistêmica (PA ≥ 140/90 mmHg)
Diabete melito
Idade (≥ 45 anos homem e ≥ 55 anos mulher)
História familiar precoce de aterosclerose (parentes de 1° grau < 55 anos para homens e < 65 anos para mulheres)

CT: colesterol total; LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; HDL-C: colesterol da lipropoteína de alta densidade; PA: pressão arterial.
Fonte: adaptado de Santos, Giannini & Fonseca, 2001.

Dentre os trabalhos mais importantes estão o *Multiple Risck Factor Intervention Trial* (MRFIT), um estudo longitudinal, com início em 1980, que avaliou os principais fatores de risco clássicos para doenças cardiovasculares (MORTALITY..., 1990). O estudo longitudinal de Framingham, EUA, iniciado em 1948, que evidenciou, por exemplo, a importância da concentração do colesterol da lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) no desenvolvimento das doenças ateroscleróticas (MILLER, 1978; KANNEL, 2000). O estudo dos Sete Países, do tipo transversal, iniciado em 1990, demonstrou entre outras, a correlação entre concentrações médias de LDL-C de diferentes populações e índices de mortalidade por DAC (MENOTTI *et al.*, 2000).

Além destes fatores clássicos, acima citados, uma série de novos marcadores de risco, para doenças cardiovasculares, foram descritos em vários outros estudos. São exemplos de novos marcadores a lipoproteína (a) – Lp(a) e fibrinogênio, ambos observados no estudo *The Munster Heart Study* (PROCAM) (ASSMANN, CULLEN & SCHULTE, 1998); homocisteína (SUNDSTROM *et al.*, 2004); inibidor do ativador do plasminogênio-1 (PAI-1) e proteína C reativa de alta sensibilidade (PCR-as) (PAI *et al.*, 2004).

Os marcadores de risco poderiam potencializar os fatores de risco clássicos ou serem os determinantes, em casos onde os pacientes,

aparentemente sem risco, desenvolvem doença cardiovascular. A presença de múltiplos fatores de risco exerce um efeito aditivo e até mesmo sinérgico, contudo pode-se verificar o desenvolvimento de aterosclerose na ausência de qualquer fator de risco aparente (SANTOS, GIANNINI & FONSECA, 2001).

Estes dados revelam as importantes lacunas ainda existentes em nossos conhecimentos. Por estas razões, e devido à importância geral da aterosclerose para a saúde pública, suas causas e patogenia continuam sendo objeto de estudos intensos.

2.2 Aterosclerose e infarto do miocárdio

Atualmente, a aterosclerose é considerada um processo complexo, no qual ocorre a interação de fatores de risco com as células da parede arterial, sangüíneas e moléculas de sinalização, ocasionando uma disfunção endotelial, podendo resultar na formação da lesão aterosclerótica (LIBBY, 2002).

Uma via importante pela qual o processo pode iniciar-se é quando as artérias, na presença de hiperlipidemia crônica, acumulam lipoproteínas no interior da íntima, principalmente lipoproteínas de baixa densidade (LDL). O transporte da LDL para a íntima é um fenômeno passivo e diretamente proporcional a sua concentração sangüínea. Teoricamente uma disfunção endotelial, em um endotélio ainda morfologicamente normal, decorrente por exemplo de estresse hemodinâmico, aumentaria a migração da LDL. A LDL seria oxidada por ação de produtos reativos, presentes nas células endoteliais, musculares lisas (CML) e macrófagos. A oxidação da LDL (LDLox) é uma fase obrigatória para a formação de células espumosas (ROSS, 1999).

Consequentemente, as células endoteliais aumentam a expressão de moléculas de adesão, proteína quimiotática dos monócitos (MCP-1) e fator estimulador de colônias (CSF) que promovem a ligação dos monócitos da

corrente sangüínea à superfície endotelial, que posteriormente, migram para o espaço subendotelial (GERRITY, 1981). Neste local, os monócitos diferenciam-se em macrófagos e fagocitam vários tipos de lipoproteínas, na maioria LDLox. A LDLox é reconhecida pelo macrófago através de receptores *scavenger* (GOLDSTEIN *et al.*, 1979) e CD-36 (STEINBRECHER, 1999), que englobam estas moléculas de lipoproteínas de uma maneira não controlada por retroalimentação negativa. Os macrófagos acumulam lipídios, formando assim a célula espumosa, o marco celular da aterosclerose. O acúmulo de células espumosas na íntima caracteriza a formação da estria gordurosa, o estágio inicial do processo aterosclerótico (ROSS, 1993). Posteriormente, os macrófagos ativados e as células endoteliais produzem fatores de crescimento e citocinas, que estimulam a produção de colágeno e a proliferação das célula musculares lisas, que vão formar a placa aterosclerótica (LIBBY, 2002) (figura 2.1).

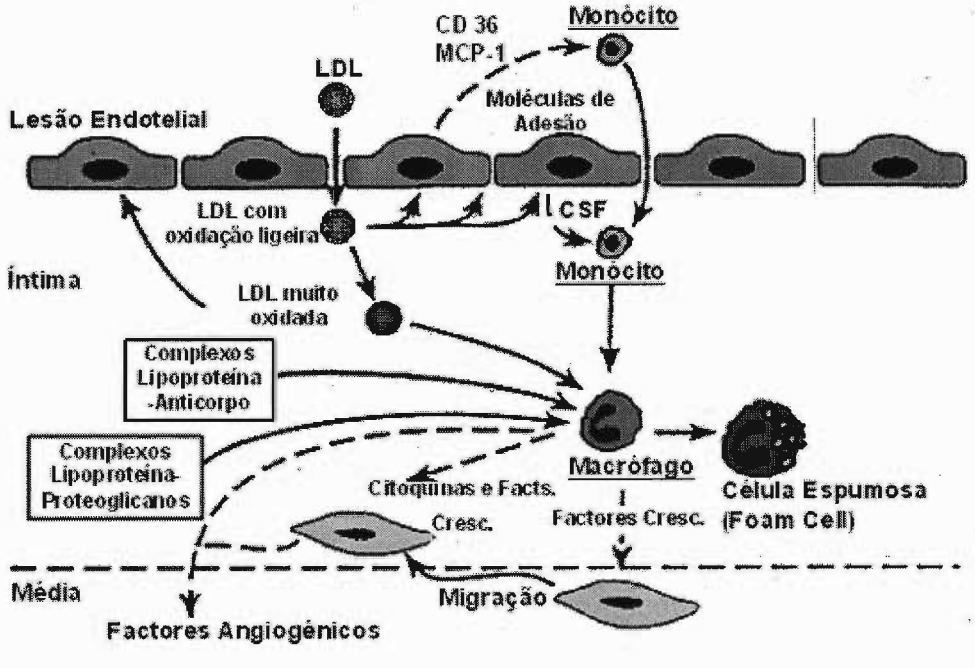

Figura 2.1 - Processo aterosclerótico. A LDL migra para a íntima, sofre oxidação por ação de produtos reativos, é fagocitada pelo macrófago formando a célula espumosa. As células endoteliais produzem os fatores de crescimento e citocinas que atraem novos monócitos para o local. O acúmulo de células espumosas e proliferação de CML resultam em crescimento da placa.
Fonte: Libby, 2002.

Há vários estágios morfológicos das lesões ateroscleróticas, que variam desde o tipo I até o tipo VI. Eles são classificados de acordo com os critérios da *American Heart Association* (AHA). O tipo I é a lesão microscópica inicial, invisível a olho nu, o tipo II é conhecida como estria gordurosa, sendo a primeira fase visível o olho nu. O tipo III é a lesão chamada de intermediária. O tipo IV é o ateroma e o tipo V, caracteriza-se pela presença de tecido fibroso envolvendo o núcleo lipídico. Por último o tipo VI é a lesão complicada constituída por superfície defeituosa, hematoma-hemorragia e suscetível a formação de trombos (FUSTER, 1994).

O tipo I: caracteriza-se por um aumento no número de macrófagos e pelo surgimento das células espumosas localizadas na íntima vascular. Estas lesões são detectáveis antes mesmo do primeiro ano de vida. A formação de células espumosas é a característica celular da aterosclerose. Um possível mecanismo que leva a formação destas células é o desajuste entre a captação de lipoproteína e o efluxo de colesterol pelos macrófagos. O tipo II: são compostas por macrófagos, células musculares lisas e lipídios extracelulares. Lesões tipo II são encontradas antes da terceira década de vida. O tipo III: origina-se das lesões tipo II e difere destas por possuir maior quantidade de lipídio extracelular ocupando parte da matriz de proteoglicanos, formando pequenos núcleos lipídicos visíveis a olho nu. É uma fase de transição para a formação da lesão tipo IV (LINSEL-NITSCHKE & TALL, 2005).

A placa aterosclerótica, o tipo IV, consiste em uma placa elevada no interior da íntima, com centro lipídico constituído, principalmente, por colesterol, ésteres de colesterol e células espumosas. No tipo V, revestindo o centro lipídico há uma cápsula fibrosa composta por células musculares lisas (CML), macrófagos, células espumosas, linfócitos, colágeno, elastina, proteoglicanos e neovascularização. O tipo VI: é a placa complicada por fissura, rotura, hemorragia ou erosão (LINSEL-NITSCHKE & TALL, 2005).

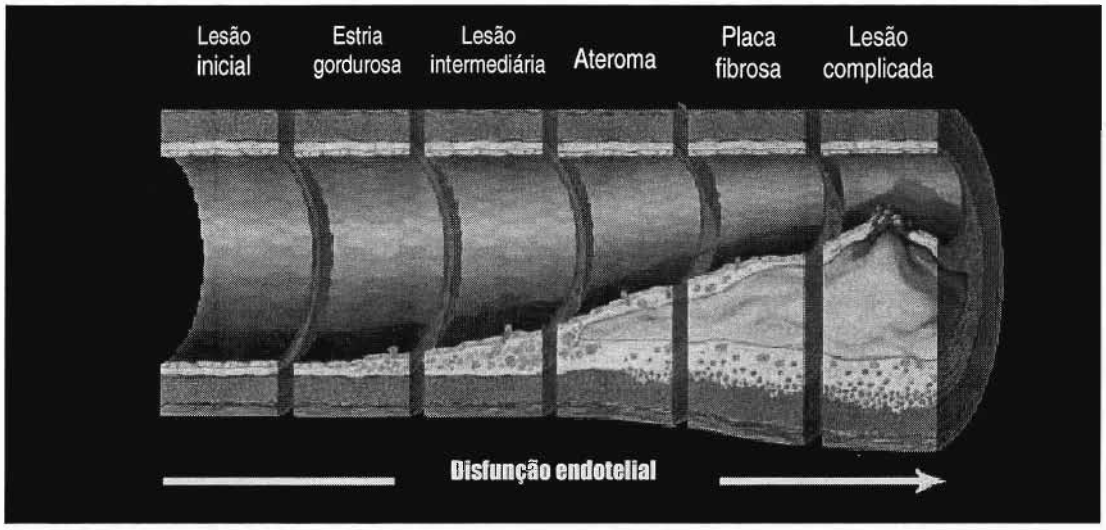

Figura 2.2 - Progressão da lesão aterosclerótica. O tipo IV – placa aterosclerótica, é a lesão característica da aterosclerose que consiste em uma placa elevada no interior da íntima, com centro lipídico constituído, principalmente, por colesterol, ésteres de colesterol e células espumosas. O tipo V - placa fibrosa, é caracterizado pela cápsula fibrosa revestindo o centro lipídico.
Fonte: adaptado de Pepine, 1998.

As placas ateroscleróticas fazem protusão na luz do vaso, bloqueando, total ou parcialmente, o fluxo sangüíneo. Quando a oclusão ocorre em artérias coronárias, há deficiência de fluxo sangüíneo para uma região do músculo cardíaco, cujas células sofrem necrose tecidual causada por isquemia. O processo é denominado infarto do miocárdio - entidade nosológica mais freqüente dentre as doenças isquêmicas do coração (BRAUNWALD, 1998).

2.3 Lipoproteínas

As lipoproteínas são constituídas por uma parte central contendo lipídios hidrofóbicos (triacilgliceróis e ésteres de colesterol), envolvida por uma camada externa hidrofílica formada por colesterol livre, fosfolipídios e diferentes proteínas (apolipoproteínas). Diferentes combinações de lipídios e proteínas formam partículas com tamanho, densidade, composição química e funções diferentes. As principais classes de lipoproteínas são os

quilomícrons, lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteína de densidade intermediária (IDL), lipoproteína de densidade baixa (LDL) e lipoproteína de alta densidade (HDL). A diferença básica entre cada classe de lipoproteína diz respeito às quantidades e aos tipos de lipídios e proteínas presentes nas moléculas. As apolipoproteínas (apo) conferem estabilidade estrutural às lipoproteínas e determina a via metabólica das partículas. As classes de apo são denominadas por sistema alfanumérico (quadro 2.1) (OLSON, 1998).

Quadro 2.1 - Características principais das lipoproteínas humanas

Tipos	Apo	TG	PT	FF	EC	D
Quilomícrons	B-48, A-IV, C-II, C-III, E	88%	1%	7%	4%	< 0,95
VLDL	*B-100, C-I, C-II, C-III, E*	54%	8%	16%	22%	0,95 – 1,006
IDL	B-100, remC e E	10-30%	25%	25%	30%	1,006 – 1,019
LDL	B-100	11%	21%	22%	46%	1,019 – 1,063
HDL	A-I, A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III, D, E	4%	50%	26%	20%	1,063 – 1,210

Apo: apolipoproteínas; TG: triacilgliceróis; PT: proteínas; FF: fosfolipídios; EC: ésteres de colesterol; D: densidade; VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade; IDL: lipoproteína de densidade intermediária; LDL: lipoproteína de densidade baixa; HDL: lipoproteína de alta densidade; rem: remanescente.
Fonte: adaptado de Olson, 1998.

2.3.1 Transporte de lipídios exógenos

Os quilomícrons são lipoproteínas responsáveis pelo transporte dos lipídeos proveniente da dieta (exógenos) e são sintetizados na mucosa intestinal. Os ácidos graxos exógenos de cadeia curta e média se ligam a albumina e são levados via porta para o fígado, no entanto, os ácidos graxos de cadeia longa, são reacilados na mucosa do intestino formando triacilgliceróis que juntamente com as apolipoproteínas, apo B-48, apo A-IV e apo C-III, assim como com o colesterol, fosfolipídios e triacilgliceróis formam os quilomícrons que são lançados no sistema linfático (OLSON, 1998). Na

linfa e nos capilares dos tecidos periféricos, os quilomícrons trocam elementos de superfície com as HDL, se enriquecendo de apo CII e apo E. A apo C-II ativa a lipase lipoproteica (LPL) que hidrolisa seus triacilgliceróis (MERKEL, ECKEL & GOLDBERG, 2002). Os remanescentes de quilomícrons são captados pelo fígado através dos receptores para a apo E e LRP, sendo, posteriormente, degradados pela lipase lisossômica hepática.

2.3.2 Transporte de lipídios endógenos

2.3.2.1 Transporte de lipídios sintetizados no fígado para os tecidos periféricos

Excedentes calóricos são convertidos, no fígado, em triacilgliceróis e unidos com apo B-100, C-I, C-II, C-III, apo E, colesterol e fosfolipídios, gerando lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL). A apo B-100 é um ligante fisiológico para o receptor de LDL (LDL-R). Estas lipoproteínas são transportadas do fígado para os tecidos periféricos (OLSON, 1998), onde interagem com HDL recebendo apo C-II e apo E. A apo C-II ativa a LPL, que hidrolisa triacilgliceróis, reduzindo a VLDL de tamanho e tornando-a mais densa à medida que vai perdendo triacilgliceróis. Ao final desse processo, restam remanescentes de VLDL, ou lipoproteínas de densidade intermediária (IDL). Parte desse remanescente é captado pelo fígado e degradados; o restante é convertido em lipoproteína de baixa densidade (LDL), que possui 46 % de ésteres de colesterol. A LDL é captada por todas as células do organismo através do receptor para LDL (RLDL) (BROWN & GOLDSTEIN, 1983). A captação de colesterol mediada por receptores de LDL não gera células espumosas (precursoras da aterosclerose). Somente a LDL oxidada (lipoperoxidação e oxidação da apo B100) é aterogênica. Aumento do colesterol da LDL (LDL-C) plasmático condiciona o aumento da chance de haver LDL oxidada - esta é a relação entre hipercolesterolemia e aterogênese.

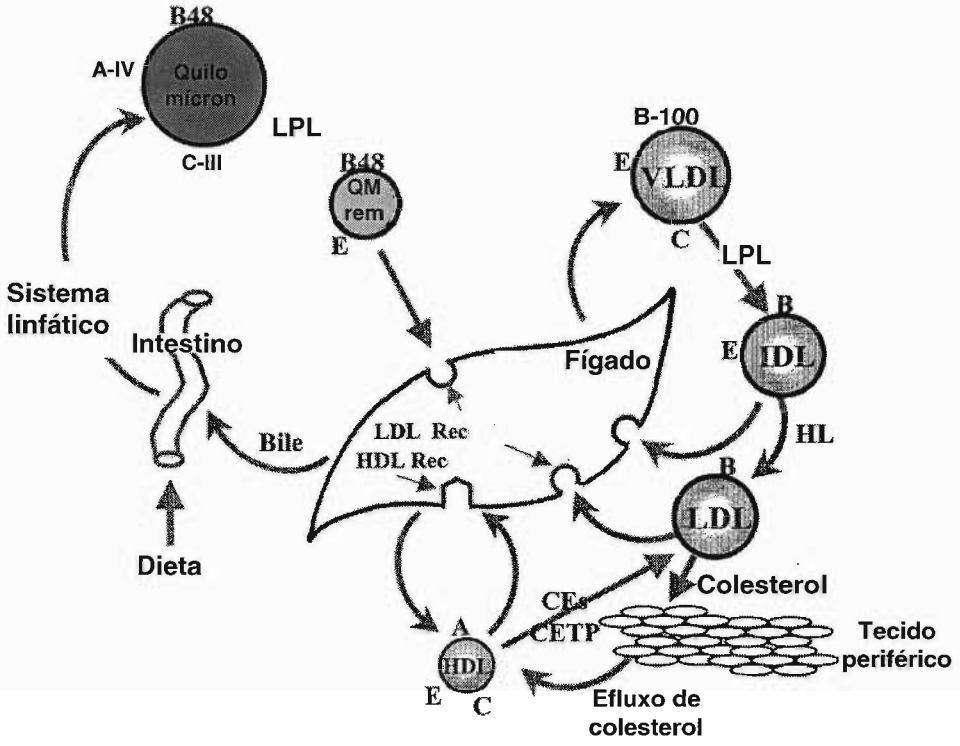

Figura 2.3 - Metabolismo de lipoproteínas. QM: remenescentes de quilomícrons; C-III: apolipoprotéina C-III; A-IV: apolipoproteína A-IV; B-48: apolipoproteína B-48; LPL: lipase lipoproteica; E: apolipoproteína E; VLVL: lipoproteína de muito baixa densidade; B-100: apolipoproteína B-100; C: apolipoproteína C; IDL: lipoproteína de densidade intermediária; HL: lipase hepática; LDL: lipoproteína de densidade baixa; HDL: lipoproteína de alta densidade; CE: éster de colesterol; A: apolipoproteína A; CEPT: proteína de transferência.
Fonte: modificado de Olson, 1998.

2.3.2.2 Transporte reverso dos lipídios para o fígado

As lipoproteínas de alta densidade (HDL) no plasma humano compreendem várias subpopulações de partículas com diferentes tamanhos, composições e potenciais anti-aterogênicos (RYE, CLAY & BARTER, 1999). As principais subclasses são lipoproteínas de alta densidade nascentes ($HDL_{nascentes}$), HDL_3 (mais densas e menores) e HDL_2 (menos densas e maiores) (LINSEL-NITSCHKE & TALL, 2005).

As $HDL_{nascentes}$ são sintetizadas no fígado e intestino delgado como partículas discóides ricas em apo A-I e fosfolipídios. Estas partículas de HDL possuem a habilidade de incorporar o colesterol e outros lipídios presentes

nos tecidos periféricos, sendo convertidas em HDL_3 (WANG *et al.*, 2004). Simultaneamente à absorção de lipídios, as HDL_3 acumulam apo A-II, apo C-I, apo C-II e apo E vindas das VLDL e IDL. O colesterol presente nas partículas de HDL são esterificados pela ação da enzima lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT), tendo como cofator a apo A-I (FIELDING & FIELDING, 1995). A HDL_3 troca ésteres de colesterol por triacilgliceróis das lipoproteínas que contém apo B, como VLDL, IDL e LDL sob ação da proteína de transferência, a CEPT, que enriquecida com TG torna-se HDL_2. A seguir é captada pelo fígado sendo metabolizada a sais biliares, concluindo o ciclo do transporte reverso do colesterol. Portanto, a HDL transporta o excesso de colesterol das células periféricas para ser eliminado via biliar, evitando ou diminuindo a formação de lesões ricas em lipídios na parede arterial, protegendo contra a aterosclerose (OLSON, 1998).

As partículas HDL_3 podem também captar o colesterol dos tecidos extra-hepáticos por meio de moléculas denominadas ABCA1, membros de uma grande família de transportadores. A proteína ABCA1, presente na célula rica em colesterol, interage com a apo A-I, a qual liga com o colesterol e o transporta à HDL, processo denominado efluxo de colesterol (BROOKS-WILSON *et al.*, 1999; BODZIOCH *et al.*, 1999; RUST *et al.*, 1999). Este mecanismo molecular é também responsável pelo efluxo de colesterol das células espumosas, mediado pela HDL e suas apolipoproteínas; representa um processo importante na prevenção ou reversão da aterosclerose. Estudos epidemiológicos revelaram a importante relação de baixas concentrações de HDL-C e o risco de desenvolvimento de aterosclerose (GORDON & RIFKIND, 1989; RUBINS, 1999).

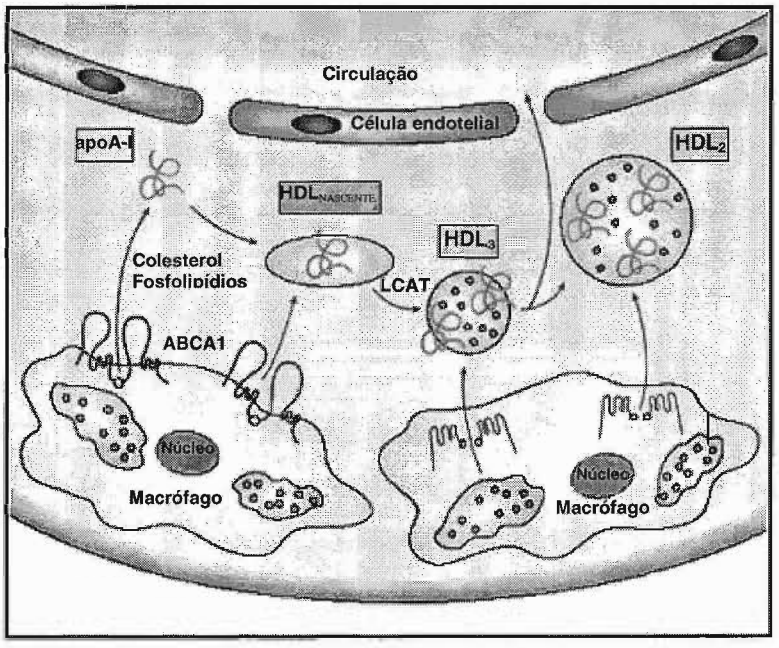

Figura 2.4 - Mecanismo do efluxo de colesterol da parede arterial. No espaço subendotelial, a apoA-I livre de lipídios ou pobre em lipídios pode ligar-se ao transportador ABCA1, presente na superfície dos macrófagos da parede arterial e promover o efluxo do colesterol livre e fosfolipídios destas células. Este processo resulta na formação de partículas de $HDL_{nascentes}$, as quais, pela ação da LCAT, incorporam colesterol das células formando HDL_3 (menor, partícula mais densa) ou HDL_2 (maior, partícula menos densa). A HDL após o enriquecimento com colesterol esterificado retorna a circulação.
Fonte: Linsel-Nitschke & Tall, 2005.

A concentração plasmática de HDL-C e de apolipoproteína A-I são inversamente correlacionados com a incidência de doença cardiovascular aterosclerótica (GORDON *et al.*, 1989). Baixas concentrações de HDL-C e apo A-I têm sido identificadas como o mais importante fator de risco para eventos coronários em pacientes com doença arterial coronariana (DAC) confirmada. (BOLIBAR *et al.*, 2000). Estudos em animais sustentam uma função causal direta que a apo A-I tem atividade protetora no desenvolvimento da aterosclerose (BADIMON, BADIMON & FUSTER, 1990; RUBIN *et al.*, 1991; LIU *et al.*, 1994; PASZTY *et al.*, 1994; PLUMP, SCOTT & BRESLOW, 1994; MIYAZAKI *et al.*, 1995; DUVERGER *et al.*, 1996; BENOIT *et al.*, 1999; RUBINS *et al.*, 1999).

Estudos *in vitro* mostraram que a capacidade antioxidante da HDL pode inibir a modificação da LDL frente ao processo oxidativo (HESSLER,

ROBERTSON & CHISOLM, 1979; PARTHASARATHY, BARNETT & FONG, 1990; NAVAB *et al.*, 1991; MAIER *et al.*, 1994; NAVAB *et al.*, 2000a; NAVAB *et al.*, 2000b). Estas propriedades antioxidante e anti-aterogênica podem ser atribuídas a várias moléculas associadas a HDL, como a acetil-hidrolase associada ao fator de ativação plaquetários (PAF-AH), paraoxonase-1 (PON1) e paraoxonase-3 (PON3) (MACKNESS, ARROL & DURRINGTON, 1991; DRAGANOV *et al.*, 2000; LUND-KATZ *et al.*, 2003).

2.4 Marcadores genéticos

A importância dos fatores genéticos que predispõem os indivíduos a doença arterial coronariana (DAC) tem sido demonstrada pelos estudos epidemiológicos prospectivos e angiográficos que propõem uma relação com fatores de risco ambientais. Alguns dos marcadores genéticos associados ao maior risco de desenvolvimento da doença cardiovascular estão listados na tabela 2.2.

Tabela 2.2 - Genes associados com o fenótipo doença cardiovascular

Símbolo gene	Nome gene	Referência
GNB3	Proteína ligadora do nucleotídeo guanina – polipeptídeo 3	Von Beckerath, 2003
NR3C1	Receptor de glicocorticóides	Lin, 2003
PON2	Paraoxonase 2	Chen, 2003
PON1	Paraoxonase 1	Chen, 2003
NOS3	Óxido nítrico sintase	Nassar, 2001
LPL	Lipoproteína Lipase	Stepanov, 1998
APOB	Apolipoproteína B	Stepanov, 1998
ECA	Enzima conversora de angiotensina-1	Alvarez, 2001
PAI-1	Inibidor do ativador do plasminogênio-1	Benes, 2001
LRP	Proteína relacionada ao receptor de lipoproteína	Benes, 2001
PPAR A	Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma alfa	Lacquemant, 2000
PAFAH	Fosfolipase A2 – grupo VII	Packard, 2000
IL-6	Interleucina 6	Vickers, 2002
PCR	Proteína C reativa	Vickers, 2002
HP	Haptoglobina	De Bacquer, 2001
HFE	Hemocromatose	Rasmussen, 2001
AGT	Angiotensinogênio	Rodriguez-Perez, 2001
ADRB3	Receptor β adrenérgico	Higashi, 1997
ADD1	Aducina-1 (a)	Morrison, 2002

Fonte: Gibbons *et al.*, 2004.

O entendimento de como cada componente genético e o ambiental contribuem para o desenvolvimento da DAC, permitirá esclarecer a interação entre ambos, e então proporcionar a prevenção da ocorrência. A identificação precoce dos marcadores genéticos, como os polimorfismos genéticos das apolipoproteínas, enzimas e receptores envolvidos no metabolismo lipídico, poderá dar oportunidade de intervenção, pré-clínica ou terapêutica, eficazes na causa primária com redução da alta morbidade e mortalidade associadas às doenças cardiovasculares (PEREIRA & KRIEGER, 2001).

Marcadores genéticos são alterações na seqüência do DNA que, isolados ou associados, estão relacionados com o fenótipo de uma doença específica. Estes marcadores podem ser denominados como: (1) mutações, quando a freqüência é menor que 1% e (2) polimorfismos, quando as alterações ocorrerem em mais de 1% da população. As mutações pontuais podem resultar em transição, quando há troca de uma purina por outra (A→G, G→A), ou de uma pirimidina por outra (T→C, C→T); ou resultarem em transversão, quando ocorre a substituição de uma purina por uma pirimidina (A→T, A→C, G→T, G→C), ou vice-versa.

As alterações relacionadas ao metabolismo lipoproteico estão localizadas nas apolipoproteínas (apo) e em seus receptores. Dentre as alterações genéticas identificadas podemos citar a presença de mutações e polimorfismos no gene da apo A, apo B, apo C, apo E, receptor da LDL (RLDL) e da proteína relacionada ao receptor de lipoproteína (LRP) (SALAZAR *et al.*, 2000a; SALAZAR *et al.*, 2000b; CAVALLI *et al.*, 2000; SALAZAR *et al.*, 2002; BARONI *et al.*, 2003; FORTI *et al.*, 2003).

As mutações podem ocorrer em um único nucleotídeo de um determinado gene (SNP), caracterizando uma doença específica ou em várias localizações, que provocam a mesma doença em diferentes indivíduos (GRAY, CAMPBELL & SPURR, 2000). Estas variabilidades podem introduzir ou excluir seqüências de restrição, caracterizadas, por

exemplo, como polimorfismos de tamanho de fragmento de restrição (PARSONS & HEFLICH, 1997; GRAY, CAMPBELL & SPURR, 2000;).

Os polimorfismos genéticos podem ser identificados utilizando a reação em cadeia pela polimerase (PCR) seguida de digestão com enzimas de restrição e análise de fragmento por separação eletroforética (RFLP), que caracterizam fragmentos de diferentes tamanhos ou por determinação de curva de desnaturação pela PCR em tempo real.

2.5 Paraoxonase (PON)

A paraoxonase (PON) é uma arilesterase (EC 3.1.1.2) e arildialquilfosfatase (EC 3.1.8.1), classificada pela Comissão de Nomenclaturas da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (NC-IUBMB) (http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme). É um grupo de enzimas pertencentes a uma família gênica, a qual, nos mamíferos, possui pelo menos três membros codificados pelos genes *PON1* (OMIM 168820), *PON2* (OMIM 602447) e *PON3* (OMIM 602720) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=omim). Estes genes estão localizados, em *loci* adjacentes, no braço longo do cromossomo 7 em humanos (banda q21.3-q22.1) (figura 2.6). Baseada nas seqüências de cDNA foi deduzida a seqüência proteica (HASSET *et al.*, 1991; ADKINS *et al.*, 1993) e constatou-se uma similaridade de pelo menos 65% entre PON1, 2 e 3 (PRIMO-PARMO *et al.*, 1996).

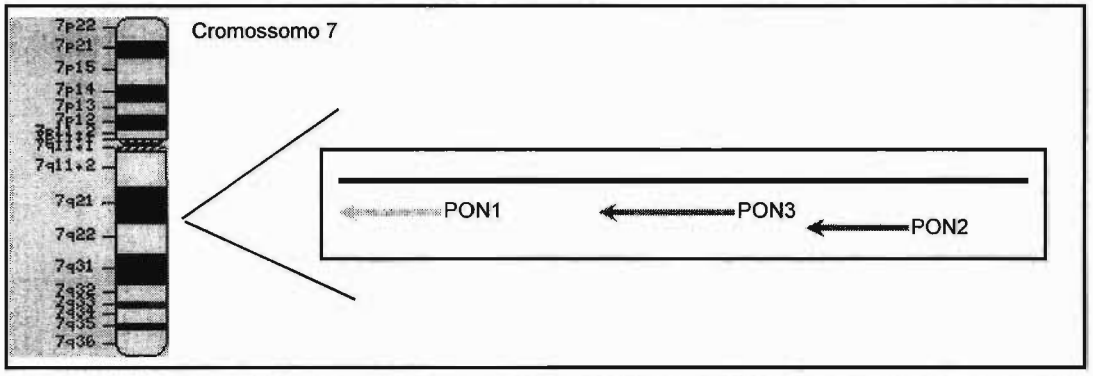

Figura 2.5 – Localização dos membros da família gênica *PON* (*PON1, PON2 e PON3*). Os três genes estão em *loci* adjacentes no braço longo do cromosso 7. Fonte: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi?taxid=9606&chr=7

Em humanos, a expressão de mRNA da PON1 é limitada ao fígado (MACKNESS, 1989) similar a PON3 (REDDY *et al.*, 2001). Por outro lado, a PON2 é mais amplamente expressa, sendo encontrada em uma variedade de tecidos, incluindo o coração, rins, fígado, pulmão, intestino delgado, baço, estômago e testículos (PRIMO-PARMO *et al.*, 1996; NG *et al.*, 2001). Além disso, diferente de PON1 e PON3, o mRNA de PON2 é também detectado em células da parede arterial (célula endotelial, célula muscular lisa) e macrófagos. Entretanto, enquanto PON1 e PON3 apresentam-se associadas à HDL na circulação, a proteína PON2 é indectada na HDL, LDL ou sobrenadante de células por *Western blot* (SORENSON *et al.*, 1999; NG *et al.*, 2001).

2.5.1 Paraoxonase 1 (PON1)

Foi inicialmente caracterizada por sua capacidade de hidrolisar organofosforados. O nome PON identifica a habilidade de hidrolisar o paraoxon, um metabólito do inseticida parathion. A PON1 é uma esterase dependente de cálcio, formada por 354 aminoácidos, com massa molecular de aproximadamente 45kDa (FURLONG *et al.*, 1989; HASSET *et al.*, 1991). Harel *et al.* (2004) descreveram a primeira cristalização e resolução da

estrutura tridimensional de um membro da família PON, uma variante da PON1, que pode ser observada na figura 2.6.

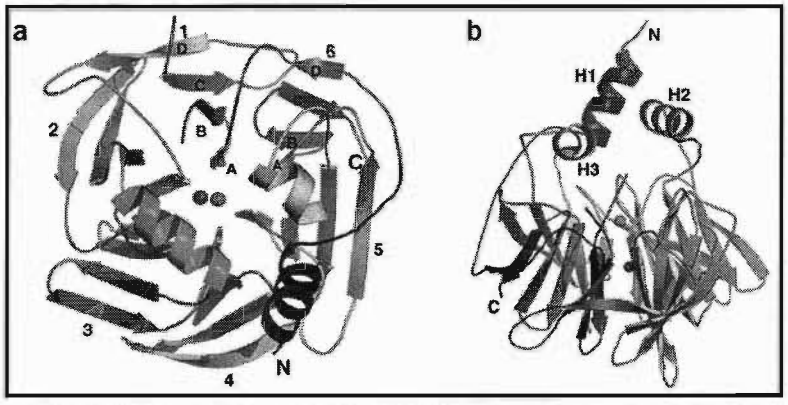

Figura 2.6 – Estrutura cristalográfica da PON1. (**a**) vista superior. (**b**) vista lateral.1-6: hélices; A-D: H1–H3: hélices superiores; N: resíduo N-terminal; C: resíduo C-terminal; círculos vermelho e verde: átomos de cálcio.
Fonte: Harel *et al.*, 2004.

Evidências obtidas recentemente, sugerem que o nome "PON" pode ser um nome impróprio, pois PON2 e PON3 não possuem significante atividade paraoxonase (DRAGANOV *et al.*, 2000; NG *et al.*, 2001; REDDY *et al.*, 2001). Até o momento, alguns substratos fisiológicos para esta proteína foram conhecidos, mas o mecanismo não foi totalmente identificado, permanecendo alvo de investigações freqüentes (AVIRAM *et al.*, 1998; SANGHERA *et al.*, 1998).

Quando, primeiramente, foi descoberta a habilidade da PON1 associada a HDL de retardar a oxidação de LDL, a localização especial da PON1 na HDL sugeriu que a enzima teria um papel fisiológico importante no metabolismo de lipídios e consequentemente, uma proteção contra o desenvolvimento da aterosclerose (MACKNESS, ARROL & DURRINGTON, 1991). Esta propriedade antioxidante foi, subsequentemente, sendo confirmada por vários estudos (NAVAB *et al.*, 1991; MACKNESS *et al.*, 1993; WATSON *et al.*, 1995; AVIRAM *et al.*, 1998). Foi demonstrado a relação inversa entre a atividade sérica da PON1 e peroxidação lipídica

(MALIN *et al.*, 2001b), assim como, a relação inversa da atividade e o risco de DCV (MACKNESS *et al.*, 2001; MACKNESS *et al.*, 2003). Os possíveis mecanismos pelos quais a PON1 protege contra aterosclerose, podem ser observados na tabela 2.3.

Tabela 2.3 - Evidências e possíveis mecanismos da propriedade antioxidante da PON1 humana

Evidências	Possíveis mecanismos
1. Protege a HDL da oxidação e preserva sua função	Aumentando efluxo de colesterol dos macrófagos
2. Protege a LDL da oxidação	Diminuindo a peroxidação dos lípides
3. Reduz os efeitos da LDL oxidada	Diminuindo fosfolípides citotóxicos e pro-inflamatórios Diminuindo a captação da LDL pelos macrófagos Diminuindo a migração de monócitos induzida pela LDL oxidada
4. Diminui lipoperóxidos nas lesões ateroscleróticas	...

Fonte: Durrington, Mackness & Mackness, 2001.

Estudos *in vivo* demonstraram que camundongos deficientes para o gene da paraoxonase 1 (*knockout*), desenvolveram aterosclerose quando submetidos a uma dieta aterogênica. As partículas de HDL, destes camundongos deficientes, em cultura de células de parede arterial, quando comparadas com HDL dos camundongos selvagens, falharam em prevenir a oxidação da LDL (SHIH *et al.*, 1998).

Analisando estes resultados dos estudos, *in vitro* e *in vivo*, pode-se aceitar a hipótese de que a PON1 protege contra aterogênese e contribui, expressivamente, com a capacidade antioxidante da HDL.

A PON1 possui dois polimorfismos freqüentes na região codificadora: leucina/metionina na posição 55 (*L55M*) (ADKINS *et al.*, 1993) e

glutamina/arginina na posição 192 (*Q192R*) (HUMBERT *et al.*, 1993). Ambos os polimorfismos foram associados com condições fisiopatológicas. O polimorfismo *L55M* foi associado com acidente vascular cerebral, doença arterial coronariana, variações na concentração plasmática de colesterol total e LDL-C, concentração de mRNA, proteína e atividade frente ao paraoxon da PON1 (MACKNESS *et al.*, 1997; LEVIEV, NEGRO & JAMES, 1997; SCHMIDT *et al.*, 1998; LEVIEV, DEAKIN & JAMES, 2001; MALIN, *et al.*, 2001a; FORTUNATO *et al.*, 2003).

O polimorfismo *Q192R* foi descrito como responsável pela modificação da taxa de hidrólise frente a vários substratos, incluindo: paraoxon, diazoxon, soman e sarin (DAVIES *et al.*, 1996; FURLONG *et al.*, 2002). Além disso, foi associado com doença arterial coronariana, acidente vascular cerebral, hipercolesterolemia familiar e diabete tipo 2 (HEGELE, BRUNT & CONNELLY, 1995; ODAWARA, TACHI & YAMASHITA, 1997; PFOHL *et al.*, 1999; IMAI *et al.*, 2000; VOETSCH *et al.*, 2002; CHEN *et al.*, 2003).

2.5.2 Paraoxonase 2 (PON2)

A PON2 é uma proteína expressa amplamente intracelularmente, com massa molecular de aproximadamente 44kDa (PRIMO-PARMO *et al.*, 1996). A alta similaridade observada nas seqüências de aminoácidos entre as proteínas das paraoxonases sugerem que PON2 pode possuir funções similares às da PON1. Recentemente, foi descrito que PON2 é expressa (mRNA e proteína) em células endoteliais e musculares lisas humanas (NG *et al.*, 2001). As células que expressaram PON2 foram capazes de reverter a modificação oxidativa da LDL minimamente oxidada (NG *et al.*, 2001). Estes dados sugerem que a PON2 pode atuar como antioxidante celular e pode ter uma função anti-aterogênica reduzindo o estresse celular oxidatixo (AVIRAM & ROSENBLAT, 2004).

Semelhante a PON1, a PON2 possui polimorfismos que estão associados com numerosas condições fisiopatalógicas. Estudos populacionais têm mostrado uma freqüente substituição do aminoácido serina do códon 311 pelo aminoácido cisteína, denominado polimorfismo *S311C* (SANGHERA *et al*, 1998; IMAI *et al*, 2000; LETELLIER *et al.*, 2002; CHEN, 2003; ROBERTESON, *et al.*, 2003) Este polimorfismo tem sido associado com doença arterial coronariana, acidente vascular cerebral em paciente com diabete melito e doença de Alzheimer (SANGHERA *et al.*, 1998; WANG *et al.*, 2003; CHEN *et al.*, 2003; MARTINELLI *et al.*, 2004; SHI *et al.*, 2004).

Poucos estudos relatam uma associação entre o polimorfismo *S311C* do gene PON2 a doença arterial coronariana e outros não mostram associações significativas (SANGHERA *et al.*, 1998; HEGELE, 1999; LEUS *et al.*, 2001), o que torna necessário uma melhor avaliação em diversas populações.

A ausência de estudos na população brasileira, em indivíduos jovens infartados, dos polimorfismos *L55M*, *Q192R* do gene da enzima paraoxonase 1 e o polimorfismo *S311C* do gene da paraoxonase 2 e a possível relação com a precocidade do evento agudo, nos levou a propor este estudo

3 OBJETIVOS

- Descrever a distribuição genotípica e a freqüência relativa dos alelos dos polimorfismos *L55M*, *Q192R* e *S311C* dos genes *PON* em indivíduos infartados e não infartados.

- Avaliar a associação entre os polimorfismos *L55M* e *Q192R* do gene *PON1* e o polimorfismo *S311C* do gene *PON2* com a doença arterial coronariana (DAC).

- Avaliar a influência do haplótipo do polimorfismo da PON1 na ocorrência do infarto.

- Descrever a associação entre os polimorfismos *L55M*, *Q192R* e *S311C* dos genes *PON* com os parâmetros bioquímicos (perfil lipídico, apo A-1 e apo B) em indivíduos infartados e não infartados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Casuística

Os indivíduos que fazem parte deste estudo foram triados por médicos da Seção de Coronárias do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, São Paulo, SP. Os indivíduos selecionados e interessados em participar do estudo foram informados sobre a utilização do material biológico e condições da pesquisa que constam no termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Após o consentimento do paciente realizou-se a coleta do material biológico.

A coleta de dados clínicos foi obtida por meio de anamnese clássica, sucedida pela realização de exame físico completo, eletrocardiograma (ECG), cineangiocoronariografia e coleta do material biológico (sangue).

A população deste trabalho é composta por dois grupos de indivíduos com as seguintes características:

1) **Grupo de estudo (GE):** constituído por 116 indivíduos, não relacionados geneticamente, de ambos os sexos (68% do sexo masculino e 32% do sexo feminino), com idade entre 18 a 45 anos, que sofreram infarto do miocárdio (IM). Os indivíduos apresentaram lesão significativa ($\geq$ 70%) em pelo menos uma artéria coronária principal documentado por cineangiocoronariografia.

2) **Grupo controle (GC):** constituído por 105 indivíduos, não relacionados geneticamente, de ambos os sexos (73% do sexo masculino e 27% do sexo feminino), com idade variando de 18 a 52 anos, saudáveis do ponto de vista clínico e laboratorial, com diagnóstico clínico e laboratorial negativo para IM, com exame ergonométrico normal.

4.1.1 Critérios de seleção

4.1.1.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos no estudo os indivíduos:

1) **Grupo de estudo (GE):** com ocorrência de IM, diagnosticado por história clínica, eletrocardiograma e alterações enzimáticas, idade igual ou inferior a 45 anos na época do episódio (GE);

2) **Grupo controle (GC):** sem ocorrência de IM com idade inferior a 52 anos (GC).

4.1.1.2 Critérios de exclusão para GE e GC

Foram excluídos os indivíduos com:

- miocardiopatias, incluindo Doença de Chagas;
- valvopatias;
- doenças congênitas;
- pericardiopatias;
- insuficiência renal crônica e hepática;
- distúrbio endócrino (hipotireoidismo ou hipertireoidismo);
- neoplasias;
- colagenoses;
- doenças hematológicas (anemia);
- hipercolesterolemia familiar;
- uso de anticoagulantes orais.

4.1.2 Aspectos éticos

O material biológico e os dados necessários para o desenvolvimento do trabalho foram cedidos pelo médico responsável Dr. Marcelo Ferraz Sampaio, pesquisador do projeto de origem da casuística o qual foi desenvolvido na Seção de coronárias do Instituto Dante Pazzanese de

Cardiologia. Este projeto de origem foi aprovado pelo CEP do instituto (CEP n.° 3039/2001) assim como as inclusões das análises dos polimorfismos *L55M* e *Q192R* do gene *PON1* e o polimorfismo *S311C* do gene *PON2* da enzima paraoxonase (05/11/2004). Posteriormente, o trabalho em tela foi avaliado e aprovado, em 06/12/2004, pelo CEP da FCF/USP (Protocolo n.° 274).

4.2 Material

4.2.1 Material biológico

Para as análises laboratoriais e moleculares, as amostras de sangue periférico foram coletadas dos indivíduos da população selecionada após jejum de 12 horas, utilizando o sistema de coleta a vácuo da seguinte forma:

- Dois tubos de 4,0 mL sem anticoagulante, que após centrifugação a 1050 x *g* por dez minutos em centrífuga CELM modelo LS 35 (Celm Ind., São Paulo, Brasil) foi obtido soro utilizado para exames bioquímicos do perfil lipídico, apolipoproteína A-I (apo A-I) e apolipoproteína B (apo B).

- Um tubo de 3,6 mL contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) como anticoagulante (1 mg/mL sangue) que após centrifugação a 1050 x *g* por dez minutos (centrífuga CELM modelo LS 35, Celm Ind., São Paulo, Brasil), para obtenção da camada de leucócitos. Foi utilizado para as técnicas de biologia molecular.

4.2.2 Reagentes

Triton X-100 foi adquirido da Rohm & Haas Co. (Philadelphia, PA, Estados Unidos); cloreto de sódio, etanol absoluto, ácido clorídrico fumegante, ácido acético glacial, cloreto de potássio, azul de bromofenol e etanol P.A. da Merck S.A. (Rio de Janeiro, RJ, Brasil); cloreto de magnésio, xilenocianol-FF e dodecil sulfato de sódio da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, Estados Unidos); ácido bórico, glicerol, EDTA, Tris ultra puro, agarose

ultra pura, marcadores de tamanho molecular de DNA a cada 10 pb, 50pb, 100 pb e 1Kb da Invitrogen (São Paulo, SP, Brasil); enzima DNA Polimerase e seu respectivo tampão de reação 10x da Biotools, B & M Labs, S.A. (Madrid, Espanha); as soluções de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) e o brometo de etídeo da GE Healthcare (São Paulo, SP, Brasil); enzimas de restrição *Nla* III, *Mbo* I e *Dde* I, e respectivos tampão de reação 10X da New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA, Estados Unidos). Os iniciadores (*primers*) foram sintetizados pela Invitrogen (São Paulo, SP, Brasil).

4.3 Métodos

4.3.1 Parâmetros bioquímicos

As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório Central do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, São Paulo, SP.

As determinações bioquímicas foram realizadas utilizando produtos da Roche Diagnóstica (Mannheim, Alemanha) e analisador automático da Roche modelo Hitachi 912 (Hitachi Ltda, Tóquio, Japão), cujas metodologias dos testes estão especificadas na tabela 4.1.

- **Perfil lipídico:** determinações das concentrações séricas de CT, HDL-C, TG, LDL-C e VLDL-C. As concentrações do CT, HDL-C e TG foram determinadas segundo os métodos da tabela 4.1. A concentração do LDL-C e VLDL-C foi calculada pela fórmula de Friedewald (FRIEDEWALD, LEVY & FREDRICKSON, 1972).

- **Apo A-I e apo B:** as concentrações séricas de apo A-I e apo B foram realizadas por métodos imunoturbidimétricos.

Tabela 4.1 - Metodologias para determinações bioquímicas utilizando produtos da Roche Diagnóstica.

Exame bioquímico	Princípio do teste	Produto	Referência
CT	Enzimático-colorimétrico	CHOD-PAP	FOSSATI & MEDICCI, 1974
HDL-C	Enzimático-colorimétrico	HDL-C Plus	KAKUYAMA, KIMURA & HASIGUCHI, 1994
TG	Enzimático-colorimétrico	GPO-PAP	FOSSATI & PRINCIPE, 1982
Apo A-I	Imunoturbidimétrico	Tina-quant®	RIFAI & KING., 1986
Apo B	Imunoturbidimétrico	Tina-quant®	RIFAI & KING., 1986

4.3.1.1 Interpretação clínica dos exames bioquímicos

Os exames bioquímicos analisados foram interpretados de acordo com os valores de referência da III Diretrizes Brasileiras Sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia (SANTOS, GIANNINI & FONSECA, 2001).

4.3.1.2 Controle de qualidade das análises laboratoriais

O controle de qualidade das determinações séricas foi realizado pela determinação concomitante de soros controle normal e alterado comerciais, da Roche Diagnóstica (Mannheim, Alemanha) e pela participação do Laboratório Central do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia no programa de controle de qualidade externo da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica (SBPC).

4.3.2 Técnicas de biologia molecular

As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico do Departamento de Análises Clínicas e

Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP/SP. A caracterização dos genótipos foi feita por amplificação da região polimórfica do gene, utilizando a técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR) seguida de digestão com enzima de restrição e análise de fragmento por separação eletroforética (RFLP).

4.3.2.1 Extração do DNA genômico dos leucócitos periféricos

Extraiu-se o DNA genômico a partir de sangue total pelo método de precipitação salina otimizado em nosso laboratório (SALAZAR *et al.*, 1998). As amostras de 1,0 mL de sangue total foram centrifugadas a 1.800 x *g* por cinco minutos, a temperatura ambiente, desprezando-se apenas o soro, mantendo a camada de células. Em seguida, foram adicionados 900 µL de tampão TM1 (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, KCl 10 mM, cloreto de magnésio 10 mM, EDTA 2 mM e Triton X-100 a 2,5%). Agitou-se vigorosamente, seguindo-se nova centrifugação por mais cinco minutos a 1800 x *g*. Desprezou-se o sobrenadante e repetiu-se por mais três vezes a lavagem do sedimento de leucócitos com tampão TM1 sem adição de Triton X-100. A lise celular dos leucócitos foi feita por adição de 200 µL de tampão TM2 (Tris-HCl a 10 mM, pH 8,0, KCl a 10 mM, cloreto de magnésio a 10 mM, EDTA a 2 mM, NaCl a 0,4 mM) e dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10 g/L, em banho de água a 56°C, por 15 minutos. Adicionou-se 60 µl de NaCl a 5 M, agitou-se vigorosamente e centrifugou-se por 10.700 x g por cinco minutos para a precipitação das proteínas. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e adicionando-se 1000 µL de etanol absoluto e manteve-se por 2 horas a –20°C, para a precipitação do DNA. Centrifugou-se por cinco minutos a 10.700 x g, à temperatura ambiente e desprezou-se o sobrenadante. O precipitado foi lavado 2 vezes com etanol a 70% e centrifugado por cinco minutos a 10.700 x g após cada lavagem. Desprezou-se o sobrenadante e o DNA precipitado foi seco por evaporação completa do etanol residual e ressuspendido com 100 µl de tampão TE (Tris-HCl a 10 mM e EDTA a 1

mM, pH 8,0), aquecido a 56°C por 10 minutos para completa dissolução e mantido a –20°C.

4.3.2.2 Quantificação do DNA genômico

A concentração do DNA foi determinada espectrofotometricamente a 260 nm no equipamento Beckman DU 640 (EUA). Para a leitura, 10,0 µL de DNA foram diluídos em 990,0 µL de solução alcalina (SAMBROOK, FRITSCH & MANIATIS, 1989).

4.3.2.3 Amplificação das regiões polimórficas dos genes da enzima paraoxonase (PON) pela PCR

Foram amplificadas as regiões que flanqueiam os sítios polimórficos *L55M* e *Q192R* do gene *PON1* e o sítio polimórfico *S311C* do gene *PON2* pela PCR. Utilizamos iniciadores modificados em nosso laboratório que foram previamente descritos por Adkins *et al.* (1993) para o polimorfismo *PON1-55* L→M; por Sanghera *et al.* (1998) para o polimorfismo *PON1-192* Q→R e por Humbert *et al.* (1993) para o polimorfismo *PON2-311* S→C. As seqüências oligonucleotídicas dos iniciadores utilizados na amplificação destes sítios polimórficos estão indicadas na tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Iniciadores utilizados na reação de PCR para amplificação das regiões polimórficas dos genes da paraoxonase.

Polimorfismo		Posição no gene (5'- 3')	Produto de PCR (pb)	Referência
PON1 L55M	*sense*	9414 – 9436*	270	ADKINS *et al.*, 1993
	anti-sense	9660 – 9683*		
PON1 Q192R	*sense*	17943 – 17970**	331	SANGHERA *et al.*, 1998
	anti-sense	18254 – 18273**		
PON2 S311C	*sense*	30074 – 30097***	294	HUMBERT *et al.*, 1993
	anti-sense	30344 – 30367***		

* Número de acesso AF539592 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank)
** Número de acesso AF539592 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank)
*** Número de acesso AY210982 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank)

As regiões que flanqueiam os sítios polimórficos foram amplificadas pela PCR segundo o protocolo: em tubos de 200 µL pipetou-se água ultra-pura estéril, tampão de PCR 10X (Tris-HCl 75 mM, pH 9,0; KCl 50 mM; $MgCl_2$ a 2,0 mM; $(NH_4)_2SO_4$ 20 mM), 200 nM de cada iniciador (GIBCO BRL-Life Technologies, São Paulo/SP, Brasil), 200 µM de cada deoxinucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) (Amersham Pharmacia Biotech/NJ, EUA), 1,0 U da enzima DNA polimerase (Biotools do Brasil, Rio de Janeiro, RJ) e 1,0 µL de DNA genômico obtendo-se um volume final de 50,0 µL.

Os tubos com os reagentes foram colocados no termociclador PTC-200 *Peltier Thermal Cycler* modelo PTC-200 (MJ Research, EUA). Cada polimorfismo utilizou o respectivo programa descrito nas tabelas 4.3, 4.4 e 4.5 com um total de 30 ciclos. Ao final do programa a reação foi interrompida por resfriamento a 4°C.

Tabela 4.3 - Condições utilizadas na PCR para amplificação do polimorfismo *L55M* do gene *PON1*.

Condições da PCR	Temperatura (°C)	Tempo (min)
Desnaturação inicial	98	3
Desnaturação	95	1
Hibridização	46	2
Extensão	72	1
Extensão final	72	10

Tabela 4.4 - Condições utilizadas na PCR para amplificação do polimorfismo *Q192R* do gene *PON1*.

Condições da PCR	Temperatura (°C)	Tempo (min)
Desnaturação inicial	98	3
Desnaturação	94	1
Hibridização	55	2
Extensão	72	1
Extensão final	72	10

Tabela 4.5 - Condições utilizadas na PCR para amplificação do polimorfismo *S311C* do gene *PON2*.

Condições da PCR	Temperatura (°C)	Tempo (min)
Desnaturação inicial	98	3
Desnaturação	94	1
Hibridização	52	1
Extensão	72	1
Extensão final	72	10

4.3.2.4 Análise dos produtos de amplificação pela PCR

Os produtos da PCR foram avaliados em gel de agarose 1%. O gel foi preparado em tampão Tris-Borato-EDTA (Tris-HCl 0,45 mM, ácido bórico 0,45 mM e EDTA 2,5 mM). Após sua solidificação aplicou-se 5 µL do produto da reação diluído em 2 µL de tampão de amostra (xilenocianol FF 0,25%, azul de bromofenol 0,25% e glicerol 30%). A separação eletroforética foi realizada a 100 V por 45 minutos utilizando uma fonte modelo EPS 200 (Pharmacia LKB, Uppsala, Suécia). Foi realizada a visibilização dos produtos amplificados corados com brometo de etídeo (0,5 mg/L) (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) sob luz ultravioleta em transluminador, utilizando-se como referência um padrão de tamanho molecular de DNA a cada 100 pb (Invitrogen, SP, Brasil). Os resultados foram documentados utilizando o sistema de fotodocumentação *ChemiImager™* 4400 *MultiImage™ Light Cabinet* e *software AlphaEase™* versão 4.0 (Alpha Innotech Corporation, CA, EUA).

4.3.2.5 Restrição enzimática dos produtos amplificados pela PCR

Polimorfismo L55M do gene PON1

Em tubos de 500 µL, pipetou-se 1 µL de tampão de reação 10X (Tris-acetato 20 mM, pH 7,9; acetato de potássio 50 mM; acetato de magnésio 10 mM; DTT 1 mM e 0,01% de BSA); 3 U de enzima de restrição *Nla*III; 8,7 µL

de produto da PCR obtendo-se um volume final de 10 µL. Incubou-se por 2 horas em banho de água a 37° C. Ao produto da digestão foi adicionado 2 µL de tampão de aplicação para eletroforese (azul de bromofenol a 0,25%, xilenocianol-FF a 0,25% e glicerol a 30%).

Polimorfismo Q192R do gene PON1

Em tubos de 500 µL, pipetou-se 1 µL de tampão de reação 10X (Tris-acetato 20 mM, pH 7,9; acetato de potássio 50 mM; acetato de magnésio 10 mM; DTT 1 mM e 0,01% de BSA); 3 U de enzima de restrição *Mbo*I; 8,8 µL de produto da PCR obtendo-se um volume final de 10 µL. Incubou-se por 2 horas em banho de água a 37° C. Ao produto da digestão foi adicionado 2 µL de tampão de aplicação para eletroforese (azul de bromofenol a 0,25%, xilenocianol-FF a 0,25% e glicerol a 30%).

Polimorfismo S311C do gene PON2

Em tubos de 500 µL, pipetou-se 1 µL de tampão de reação 10X (Tris-acetato 20 mM, pH 7,9; acetato de potássio 50 mM; acetato de magnésio 10 mM; DTT 1 mM e 0,01% de BSA); 3 U de enzima de restrição *Dde*I; 8,8 µL de produto da PCR obtendo-se um volume final de 10 µL. Incubou-se por 2 horas em banho de água a 37° C. Ao produto da digestão foi adicionado 2 µL de tampão de aplicação para eletroforese (azul de bromofenol a 0,25%, xilenocianol-FF a 0,25% e glicerol a 30%).

4.3.2.6 Análise dos fragmentos de restrição enzimática dos polimorfismos da PON1 e 2

As análises dos polimorfismos estão esquematizadas nas figuras abaixo.

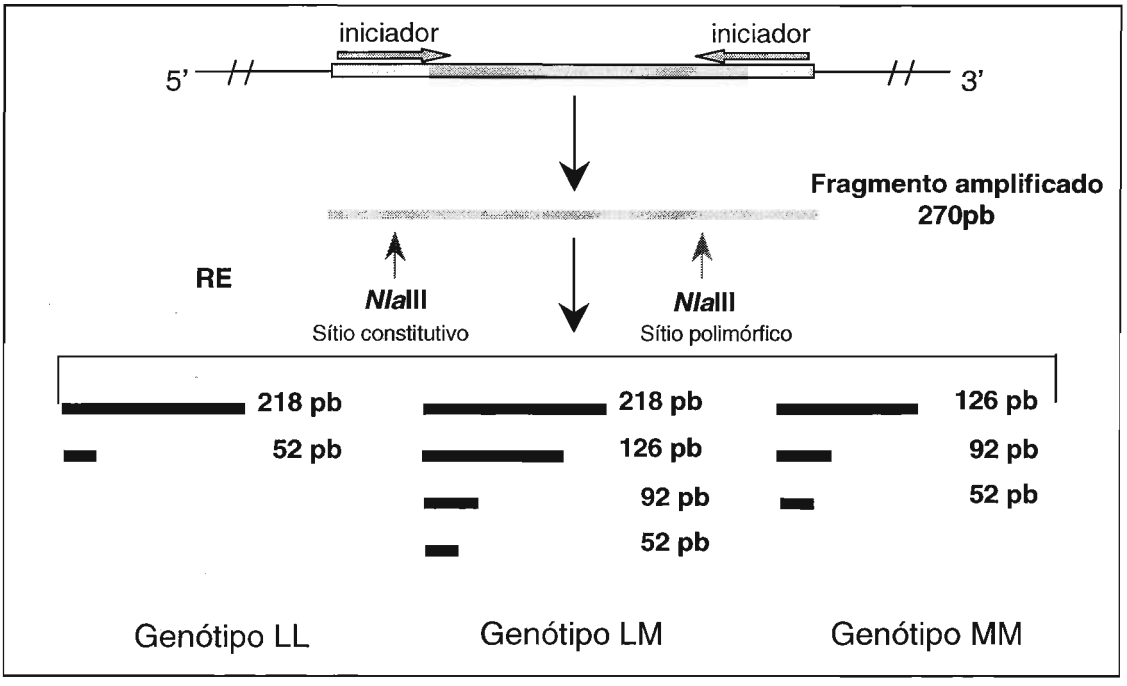

Figura 4.1 - Representação esquemática dos fragmentos com o polimorfismo *L55M* do gene *PON1* após restrição enzimática com *Nla*III. Os fragmentos de 218 e 52 representam os indivíduos com o genótipo LL; o genótipo MM é representado pelos fragmentos de 126, 92 e 52 pb e o genótipo heterozigoto LM é representado pelos fragmentos de 218, 126, 92 e 52 pb. PCR: reação em cadeia pela polimerase, RE: restrição enzimática, pb: pares de bases.

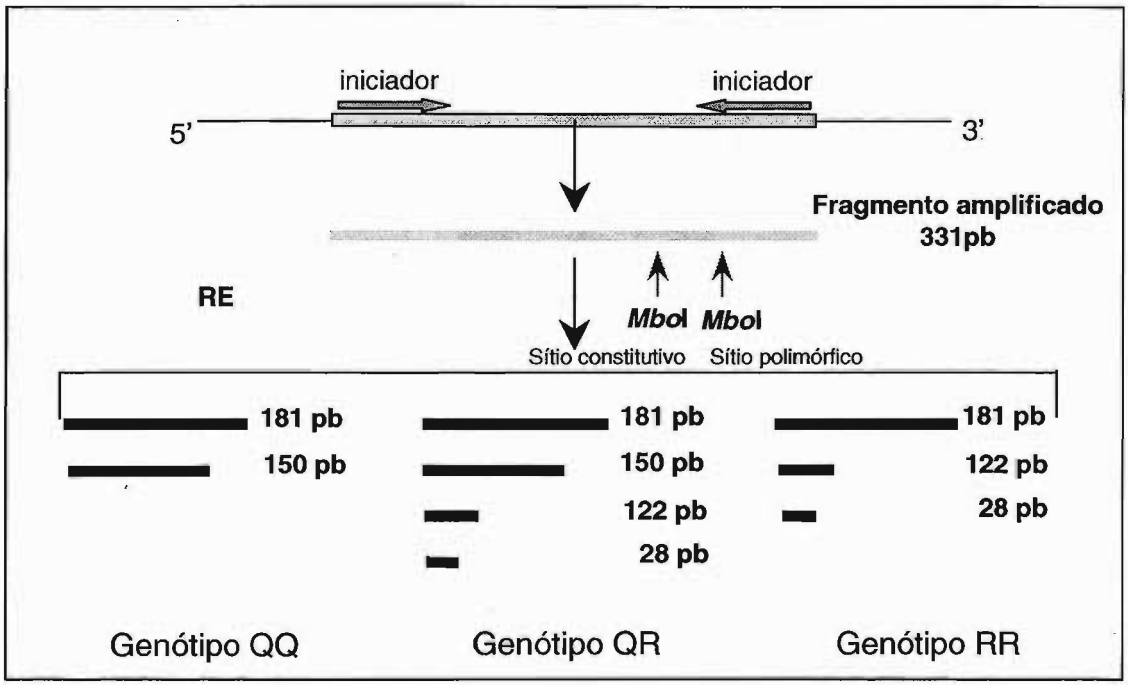

Figura 4.2 - Representação esquemática dos fragmentos com o polimorfismo *Q192R* do gene *PON1* após restrição enzimática com *Mbo*I. Os fragmentos de 181 e 150 pb representam os indivíduos com o genótipo QQ; o genótipo RR é representado pelos fragmentos de 181, 122 e 28 pb e o genótipo heterozigoto QR é representado pelos fragmentos de 181, 150, 122 e 28 pb. PCR: reação em cadeia pela polimerase, RE: restrição enzimática, pb: pares de bases.

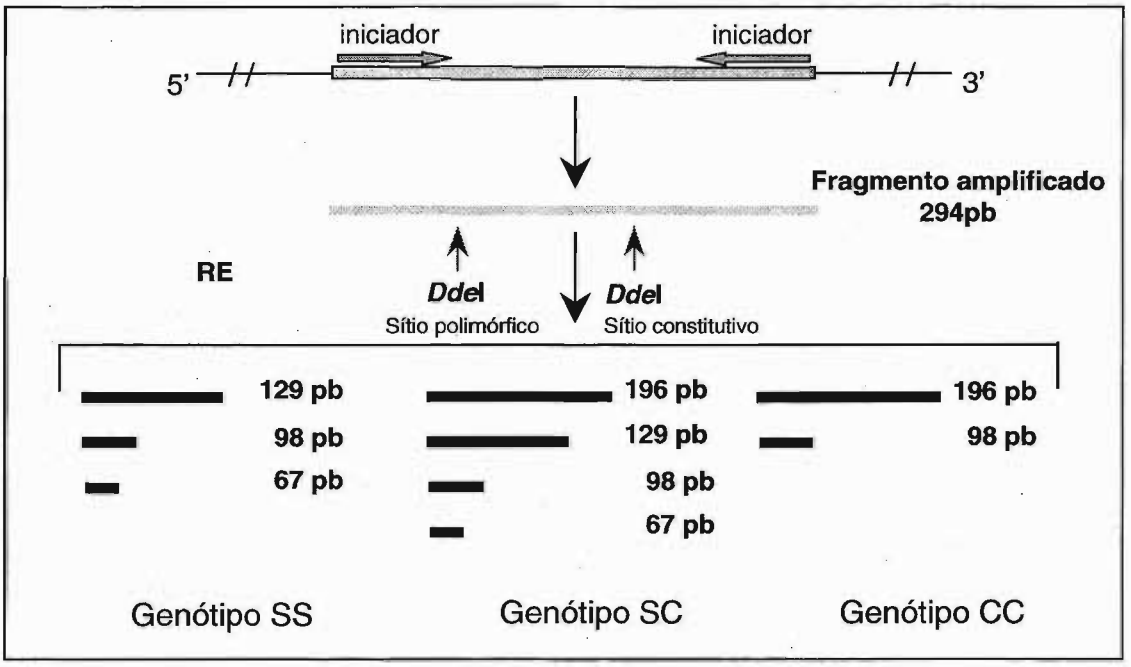

Figura 4.3 - Representação esquemática dos fragmentos com o polimorfismo *S311C* do gene *PON2* após restrição enzimática com *Dde*I. Os fragmentos de 129, 98 e 67 pb representam os indivíduos com o genótipo SS; o genótipo CC é representado pelos fragmentos de 196 e 98 pb e o genótipo heterozigoto SC é representado pelos fragmentos de 196, 129, 98 e 67 pb. PCR: reação em cadeia pela polimerase, RE: restrição enzimática, pb: pares de bases.

4.3.2.7 Controle de qualidade das análises moleculares

A possibilidade de contaminação dos reagentes utilizados na PCR foi excluída utilizando um branco de reação, tubo no qual são adicionados todos os reagentes da reação de amplificação, com exceção do ácido nucleico. O controle de qualidade da digestão enzimática foi feito pela análise do produto baseado nos sítios constitutivos escolhidos para esta finalidade. Além disso, para análise da restrição completa dos produtos de PCR foi aplicada, em um orifício do gel de avaliação dos produtos de restrição, uma amostra do produto de PCR não submetido à enzima de restrição.

A avaliação da reprodutibilidade das técnicas empregadas, foi controlada com a repetição aleatória de 10% das amostras analisadas.

4.3.3 Análise estatística

Os resultados foram analisados e apresentados na forma gráfica através do *software* SPSS versão 11.0 para Windows® (SPSS Inc., Chigaco, EUA) e SAS versão 6.12 para Windows® (SAS Institute Inc., Cary, EUA).

Inicialmente todas as variáveis foram analisadas descritivamente. As variáveis com distribuição assimétrica ou sem distribuição Norma foram transformadas em logaritmo (log_{10}). Para as variáveis contínuas, a análise foi feita através da observação dos valores mínimo e máximo, média e desvio-padrão. Para as variáveis categóricas foram calculadas as freqüências absolutas e relativas (%). Para comparar as variáveis categóricas foi utilizado o teste Qui-Quadrado (χ^2), assim como, para analisar a distribuição de freqüência dos genótipos e alelos e Equilíbrio Hardy–Weinberg para os polimorfismos entre os grupos estudados. Para comparação das variáveis contínuas, como idade e parâmetros laboratoriais, foi utilizado o teste *t* de Student. Para comparação dos diferentes genótipos foi utilizada a Análise de Variância simples (*one-way ANOVA*), seguida de teste de comparação múltipla de Turkey. Para analisar a relação conjunta entre as variáveis e os 2 grupos foi utilizada a Análise de Regressão Logística multivariada, com critério *Stepwise,* para seleção de variável. O nível de significância considerado para os testes estatísticos foi de 5%, ou seja, foi $p<0,05$.

5 RESULTADOS

As informações sobre os genótipos, dados biodemográficos, características clínicas, concentrações dos parâmetros bioquímicos dos indivíduos infartados pertencentes ao grupo de estudo (GE) e dos indivíduos do grupo controle (GC) estão relacionadas nos anexos 1 e 2, respectivamente.

5.1 Análise dos dados biodemográficos e características clínicas

Na tabela 5.1 estão apresentados os dados biodemográficos e características clínicas, incluindo prevalência de hipertensão arterial sistêmica, diabete melito, tabagismo e hipercolesterolemia, dos indivíduos do grupo controle (GC) e do grupo estudo (GE) envolvidos neste estudo.

Quando foram analisados os dados biodemográficos, observou-se que o número de indivíduos masculino e feminino nos grupos infartados e no grupo controle foram semelhantes: $\chi^2 = 0{,}73$ ($p = 0{,}394$); assim como a média de idade entre os dois grupos ($p = 0{,}646$). A hipertensão arterial sistêmica, diabete melito, tabagismo e da hipercolesterolemia foi significativamente maior nos pacientes com infarto do miocárdio em relação aos controles: $\chi^2 = 62{,}89$ ($p < 0{,}001$), $\chi^2 = 10{,}49$ ($p = 0{,}001$), $\chi^2 = 131{,}00$ ($p < 0{,}001$), $\chi^2 = 8{,}70$ ($p = 0{,}003$), respectivamente (tabela 5.1).

Tabela 5.1 - Dados biodemográficos e características clínicas dos indvíduos do grupo econtrole (GC) e do grupo estudo (GE).

	GC n = 105	GE n = 116	*p*
Sexo			
• Masculino	77 (73%)	79 (68%)	
• Feminino	28 (27%)	37 (32%)	0,394 *
Idade (anos)			
• Média ± DP	35 ± 9	34 ± 5	0,646 **
• Faixa	18 - 52	18 - 45	
Hipertensão arterial sistêmica[a]	1 (1%)	55 (47%)	**<0,001** *
Diabete melito[b]	0 (0%)	11 (9%)	**0,001** *
Tabagismo [c]	7 (7%)	97 (84%)	**<0,001** *
Hipercolesterolemia [d]	32 (30%)	58 (50%)	**0,003** *

n = número de indivíduos
Freqüência relativa entre parênteses
[a] Pressão arterial sistólica > 140 e diastólica > 90 mmHg; [b] indivíduos em tratamento com insulina ou hipoglicemiantes orais; [c] fumante ativo ou que tenha deixado de fumar nos últimos 12 meses ; [d] colesterol total > 200 mg/dL.
**p*-valores referentes ao teste qui-quadrado
***p*-valores referentes ao teste *t* de Student.

5.2 Análise dos parâmetros bioquímicos

Na tabela 5.2 estão apresentados os resultados (valores médios e desvios padrão) das determinações de colesterol total (CT), triacilgliceróis (TG), colesterol da lipoproteína de baixa densidade (LDL-C), colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL-C), colesterol da lipoproteína de alta densidade (HDL-C), apolipoproteína A-I (apo A-I) e apolipoproteína B (apo B) dos indivíduos do GE e GC estudados. Os valores médios das concentrações séricas do CT, TG LDL-C, VLDL-C e apo B foram significativamente superiores nos indivíduos do GE ($p < 0,001$), quando comparados aos do GC. Por outro lado, os valores médios das concentrações séricas do HDL-C e apo A-I dos indivíduos do GC foram

significativamente superiores ($p < 0,001$) do que os valores médios das concentrações séricas dos mesmos parâmetros bioquímicos dos indivíduos do GE.

Tabela 5.2 - Concentrações séricas dos parâmetros bioquímicos (média ± DP) dos indivíduos do grupo controle (GC) e do grupo de estudo (GE).

Parâmetros	GC (98)	GE (110)	*p**
CT (mg/dL)	184 ± 42	212 ± 53	**<0,001**
TG (mg/dL)	95 ± 47	181 ± 107	**<0,001**
LDL-C (mg/dL)	109 ± 36	130 ± 44	**<0,001**
VLDL-C (mg/dL)	20 ± 12	34 ± 18	**<0,001**
HDL-C (mg/dL)	56 ± 15	45 ± 13	**<0,001**
Apo A-I (mg/dL)	147 ± 25	124 ± 24	**<0,001**
Apo B (mg/dL)	85 ± 23	107 ± 27	**<0,001**

Número de indivíduos entre parênteses.
CT: colesterol total; TG: triacilgliceróis; HDL-C: colesterol da HDL; LDL-C: colesterol da LDL; VLDL-C: colesterol da VLDL; apo A-I: apolipoproteína A-1; apo B: apolipoproteína B.
**p*-valores referentes ao teste *t* de Student.

Na figura 5.1 estão apresentados os valores médios das concentrações dos parâmetros bioquímicos dos GC e GE.

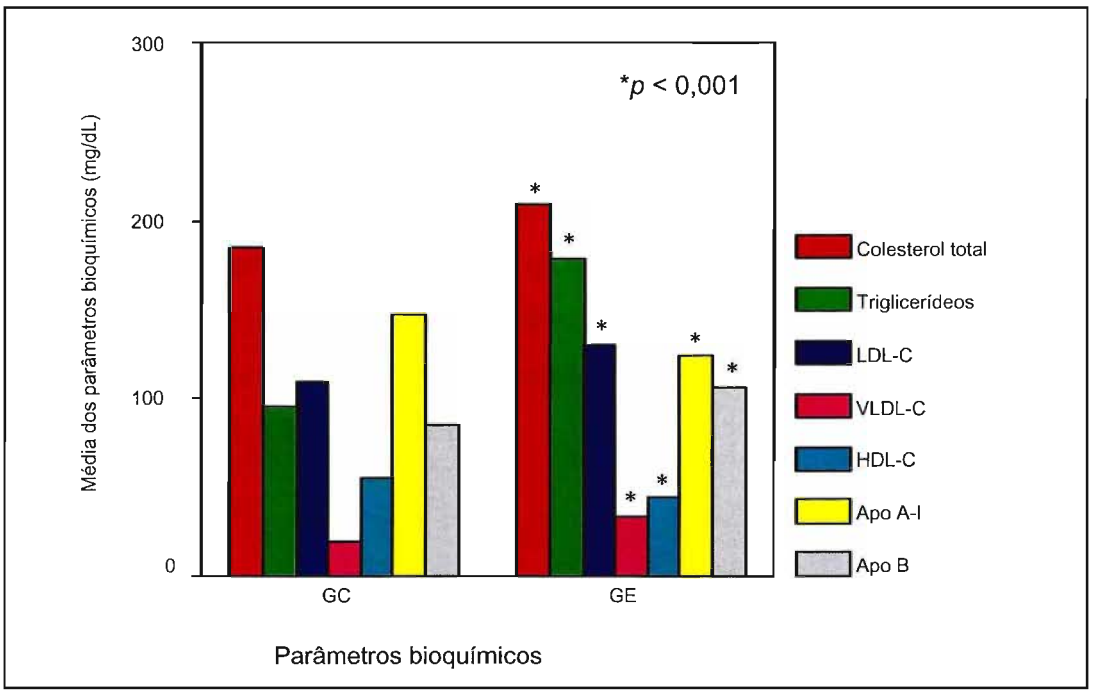

Figura 5.1- Perfil de parâmetros bioquímicos dos indivíduos agrupados de acordo com os GC e GE. LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade, VLDL-C: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade, HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade, Apo A-I: apolipoproteína A-I, Apo B: apolipoproteína B.

5.3 Análise do polimorfismo *L55M* do gene *PON1*

Na figura 5.2 ilustra-se a fotografia do gel de agarose, após a migração eletroforética, dos produtos de 270 pb resultantes de amplificação pela PCR das regiões que flanqueiam o sítio polimórfico *L55M* do gene *PON1*.

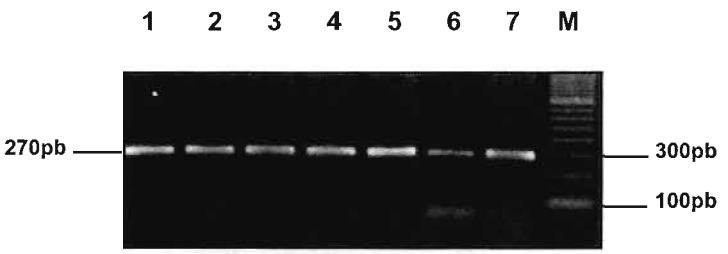

Figura 5.2 - Fotografia do gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo, sob luz U.V., dos produtos de amplificação da região polimórfica *L55M* do gene *PON1*. Colunas 1-7: produtos de PCR de 270pb; coluna M: marcador de tamanho molecular de DNA a cada 100 pb.

A figura 5.3 ilustra a fotografia do gel de agarose com os fragmentos após eletroforese encontrados nos polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição (RPLP) produzidos pela endonuclease de restrição *Nla*III. Na presença do polimorfismo *L55M* do gene *PON1* ocorrem os fragmentos de 126, 92 e 52 pb para indivíduos homozigotos (genótipo MM). Na ausência deste polimorfismo os indivíduos homozigotos são caracterizados pela presença dos fragmentos de 218 e 52 pb (genótipo LL). Para os heterozigotos (genótipo LM) observou-se a presença de quatro fragmentos de restrição: 218, 126, 92 e 52 pb.

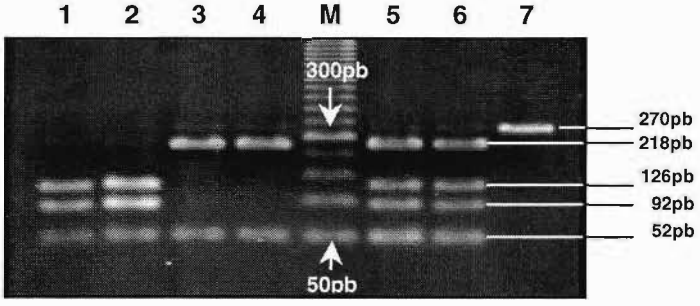

Figura 5.3 - Fotografia do gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo, sob luz U.V., dos fragmentos de restrição com a enzima *Nla*III da região polimórfica *L55M* do gene *PON1*. Colunas 1 e 2: presença de 3 bandas de 126, 92 e 52 pb que identificam os indivíduos homozigotos com o polimorfismo (genótipo MM); colunas 3 e 4: presença de 2 bandas de 218 e 52 pb que identificam os indivíduos homozigotos sem o polimorfismo (genótipo LL); coluna 5 e 6: presença de 4 bandas de 218, 126, 92 e 52 pb que identificam os indivíduos heterozigotos (genótipo LM); coluna M: marcador de tamanho molecular de DNA a cada 50 pb.

Na tabela 5.3 mostra se os resultados das distribuições das freqüências dos genótipos e dos alelos para o polimorfismo *L55M* do gene da *PON1* dos indivíduos pertencentes ao grupo de adultos jovens infartados (GE) comparados aos resultados observados para os indivíduos do grupo controle (GC). Para análise da hipótese de igualdade de proporções entre as freqüências observadas nos indivíduos dos grupos estudados (GE e GC) aplicou-se o teste qui-quadrado (χ^2). A análise das freqüências dos alelos mostrou que a freqüência do alelo L foi 0,73 no GE comparada a 0,69 do GC

(p = 0,324). Com relação aos genótipos, a freqüência destes também não foi significativamente diferente entre os grupos avaliados (p = 0,398), mesmo quando foi levado em consideração o caráter dominante do alelo L (genótipos LL + LM vs MM) (p = 0,969) ou seu caráter recessivo (genótipo LL vs LM + MM) (p = 0,398).

Tabela 5.3 - Distribuição das freqüências dos genótipos e dos alelos do polimorfismo *L55M* do gene *PON1* dos indivíduos do grupo de estudo (GE) e do grupo controle (GC).

Grupos	Freqüências de genótipos			Freqüências de alelos	
	LL	LM	MM	L	M
GE (116)	53% (62)	39% (45)	8% (09)	0,73	0,27
GC (105)	45% (47)	47% (50)	8% (08)	0,69	0,31
	p^* = 0,398 (χ^2 = 1,84; 2 *gl*)			p^* = 0,324 (χ^2 = 0,97; 1 *gl*)	

Número de indivíduos entre parênteses
* p-valores referentes ao teste qui-quadrado.

Quando se analisou a relação entre as freqüências gênicas e genotípicas, equilíbrio de Hardy-Weinberg, para o polimorfismo *L55M* do gene da *PON1* dos indivíduos pertencentes ao grupo de adultos jovens infartados (GE) e ao grupo controle (GC), observou-se que estas distribuições correspondiam a que se deveria esperar segundo o teorema. Para o teste de significância aplicamos o teste qui-quadrado (χ^2). Este resultado indica que a amostragem analisada é representativa da população, permitindo a comparação das freqüências entre os grupos avaliados.

Equilíbrio de Hardy-Weinberg:
GE: p = 0,834 (χ^2 = 0,04; 1 *gl*)
GC: p = 0,283 (χ^2 = 1,15; 1 *gl*)

A representação gráfica da distribuição dos genótipos para o polimorfismo *L55M* do gene da *PON1* dos indivíduos do grupo de estudo (GE) e controle (GC), pode ser observado na figura 5.4.

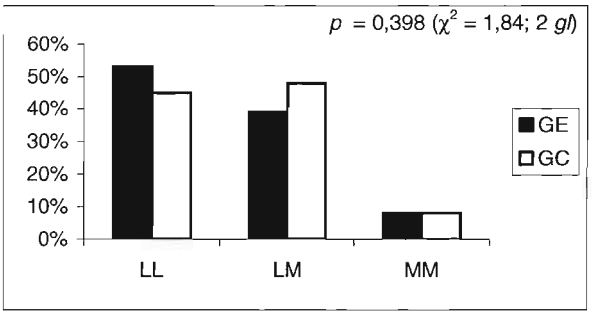

Figura 5.4 - Distribuição das freqüências dos genótipos (%) para o polimorfismo *L55M* do gene da *PON1* no grupo de estudo (GE) e controle (GC).

Na tabela 5.4 está demonstrada a análise da influência dos genótipos do polimorfismo *L55M* do gene da *PON1* sobre os parâmetros bioquímicos, tanto no grupo de indivíduos infartados (GE), quanto no grupo controle (GC).

Após a estratificação das concentrações séricas médias dos parâmetros bioquímicos dos indivíduos controles pelos genótipos da *PON1 L55M* observou-se haver diferença estatística significativa na concentração do triacilglicerol entre eles, sendo maior no genótipo LL. Quando a mesma análise foi feita nos indivíduos com infarto do miocárdio identificou que houve uma tendência de menor concentração do colesterol da HDL (HDL-C) nos genótipos LM e LL (p = 0,076). As concentrações da apolipoproteína A-I (apo A-I) foram significativamente maiores nos genótipos LL e LM (p = 0,012) (tabela 5.4).

Tabela 5.4 - Distribuição das concentrações séricas dos parâmetros bioquímicos (média ± DP) dos indivíduos adultos infartados jovens (GE), dos indivíduos do grupo controle (GC) e (GE+GC), de acordo com os genótipos do polimorfismo *L55M* do gene *PON1*.

Parâmetros	Grupos	LL	LM	MM	*p**
CT (mg/Dl)	GE (109)	205 ± 42 (45)	211 ± 49 (48)	220 ± 51 (16)	0,532
	GC (97)	200 ± 47 (26)	178 ± 43 (48)	180 ± 33 (23)	0,093
	GE + GC (206)	203 ± 44 (71)	195 ± 48 (96)	197 ± 45 (39)	0,662
TG (mg/dL)	GE (109)	164 ± 82 (45)	191 ± 112 (48)	184 ± 145 (16)	0,562
	GC (97)	115 ± 60 (26)	91 ± 41 (48)	82 ± 38 (23)	**0,036**
	GE + GC (206)	146 ± 78 (71)	141 ± 98 (96)	124 ± 108 (39)	0,407
LDL-C (mg/dL)	GE (109)	127 ± 45 (45)	132 ± 45 (48)	137 ± 41 (16)	0,670
	GC (97)	122 ± 41 (26)	105 ± 35 (48)	104 ± 29 (23)	0,130
	GE + GC (206)	125 ± 43 (71)	118 ± 43 (96)	117 ± 38 (39)	0,555
VLDL-C (mg/dL)	GE (109)	31 ± 15 (45)	36 ± 19 (48)	32 ± 23 (16)	0,499
	GC (97)	23 ± 12 (26)	20 ± 13 (48)	16 ± 8 (23)	0,161
	GE + GC (206)	28 ± 14 (71)	28 ± 18 (96)	23 ± 17 (39)	0,159
HDL-C (mg/dL)	GE (109)	44 ± 15 (45)	43 ± 10 (48)	52 ± 16 (16)	0,076
	GC (97)	55 ± 14 (26)	55 ± 15 (48)	60 ± 14 (23)	0,357
	GE + GC (206)	48 ± 16 (71)	49 ± 14 (96)	56 ± 15 (39)	**0,010**
APO A-I (mg/dL)	GE (109)	120 ± 25 (45)	123 ± 23 (48)	140 ± 23 (16)	**0,012**
	GC (97)	145 ± 23 (26)	146 ± 27 (48)	150 ± 25 (23)	0,738
	GE + GC (206)	129 ± 27 (71)	135 ± 27 (96)	146 ± 25 (39)	**0,005**
APO B (mg/dL)	GE (109)	108 ± 26 (45)	104 ± 28 (48)	106 ± 26 (16)	0,935
	GC (97)	91 ± 23 (26)	83 ± 23 (48)	81 ± 20 (23)	0,272
	GE + GC (206)	102 ± 26 (71)	94 ± 27 (96)	91 ± 25 (39)	0,119

Número de indivíduos entre parênteses.
CT: colesterol total; TG: triacilgliceróis; HDL-C: colesterol da HDL; LDL-C: colesterol da LDL; VLDL-C: colesterol da VLDL; APO A-I: apolipoproteína A-I; APO B: apolipoproteína B.
* *p*-valores referentes ao teste de ANOVA.

Quando foram feitas as comparações das concentrações dos parâmetros bioquímicos entre os genótipos (LL vs LM + MM) do polimorfismo *L55M* do gene da *PON1*, no grupo de indivíduos infartados (GE); observou-se não haver diferença estatística significativa (tabela 5.5). No entanto, verifica-se no grupo controle diferença entre os genótipos LL maiores valores de CT (p = 0,015), TG (p = 0,011); LDL-C (p = 0,028); VLDL-C (p = 0,025) e apo B (p = 0,048).

Tabela 5.5 - Distribuição das concentrações séricas dos parâmetros bioquímicos (média ± DP) dos indivíduos adultos infartados jovens (GE), dos indivíduos do grupo controle (GC), de acordo com os genótipos (LL vs LM + MM) do polimorfismo *L55M* do gene *PON1*.

Parâmetros	Grupos	LL	LM + MM	*p**
CT (mg/dL)	GE (113)	205 ± 42 (46)	216 ± 59 (67)	0,368
	GC (98)	203 ± 50 (27)	178 ± 39 (71)	**0,015**
TG (mg/dL)	GE (113)	168 ± 86 (46)	191 ± 115 (67)	0,587
	GC (98)	115 ± 58 (27)	87 ± 38 (71)	**0,011**
LDL-C (mg/dL)	GE (112)	130 ± 40 (46)	133 ± 44 (66)	0,793
	GC (98)	125 ± 44 (27)	104 ± 33 (71)	**0,028**
VLDL-C (mg/dL)	GE (111)	32 ± 16 (46)	35 ± 20 (65)	0,871
	GC (98)	23 ± 12 (27)	18 ± 12 (71)	**0,025**
HDL-C (mg/dL)	GE (112)	44 ± 15 (46)	46 ± 12 (66)	0,076
	GC (98)	55 ± 14 (27)	56 ± 15 (71)	0,686
APO A-I (mg/dL)	GE (111)	120 ± 25 (45)	130 ± 27 (66)	0,061
	GC (98)	145 ± 22 (27)	147 ± 26 (71)	0,732
APO B (mg/dL)	GE (111)	108 ± 26 (45)	106 ± 28 (66)	0,682
	GC (98)	92 ± 24 (27)	82 ± 22 (71)	**0,048**

Número de indivíduos entre parênteses.
CT: colesterol total; TG: triacilgliceróis; HDL-C: colesterol da HDL; LDL-C: colesterol da LDL; VLDL-C: colesterol da VLDL; APO A-I: apolipoproteína A-I; APO B: apolipoproteína B.
**p*-valores referentes ao teste *t* de Student.

5.4 Análise do polimorfismo Q192R do gene PON1

Na figura 5.5 observa-se a fotografia do gel de agarose, após a migração eletroforética, dos produtos de 331 pb resultantes de amplificação pela PCR das regiões que flanqueiam o sítio polimórfico *Q192R* do gene *PON1*.

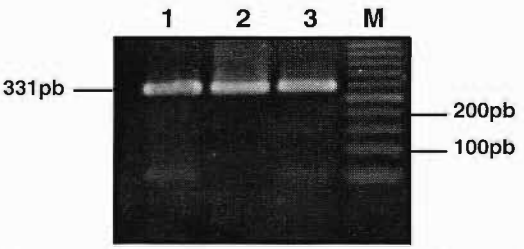

Figura 5.5 - Fotografia do gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo, sob luz U.V., dos produtos de amplificação da região polimórfica *Q192R* do gene *PON1*. Colunas 1-3: produtos de PCR de 331pb; coluna M: marcador de tamanho molecular de DNA a cada 50 pb.

A figura 5.6 ilustra a fotografia do gel de agarose a 2 % com os fragmentos de restrição da *Mbo*I encontrados nos polimorfismos de tamanho de fragmentos (RPLP). Na presença do polimorfismo *Q192R* do gene *PON1* tem-se os fragmentos de 181 e 122 pb para indivíduos homozigotos (genótipo RR). Na ausência deste polimorfismo os indivíduos homozigotos são caracterizados pela presença dos fragmentos de 181 e 150 pb (genótipo QQ). Para os heterozigotos (genótipo QR) observou-se a presença de três fragmentos de restrição: 181, 150 e 122 pb.

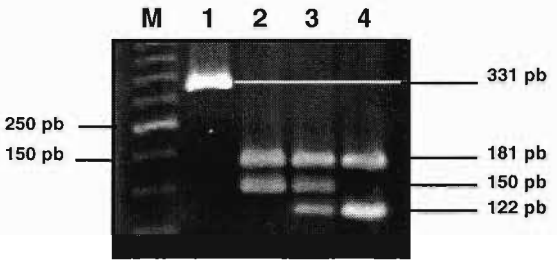

Figura 5.6 - Fotografia do gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo, sob luz U.V., dos fragmentos de restrição com a enzima *Mbo*I da região polimórfica *Q192R* do gene *PON1*. Colunas 1: produtos da PCR de 331pb; coluna 2: presença de 2 bandas de 181 e 150 pb que identificam os indivíduos homozigotos sem o polimorfismo (genótipo QQ); coluna 3: presença de 3 bandas de 181, 150 e 122 pb que identificam os indivíduos heterozigotos (genótipo QR); coluna 4: presença de 2 bandas de 181 e 122 pb que identificam os indivíduos homozigotos sem o polimorfismo (genótipo RR);coluna M: marcador de tamanho molecular de DNA a cada 50 pb.

Na tabela 5.6 estão apresentados os resultados das distribuições das freqüências dos genótipos e dos alelos para o polimorfismo *Q192R* do gene da *PON1* dos indivíduos pertencentes ao grupo de adultos jovens infartados (GE) comparados aos resultados observados para os indivíduos do grupo controle (GC). Para análise da hipótese de igualdade de proporções entre as freqüências observadas nos indivíduos dos grupos estudados (GE e GC) aplicamos o teste qui-quadrado (χ^2). A análise das freqüências dos alelos mostrou que a freqüência do alelo R foi 0,45 no GE comparada a 0,48 do GC (p = 0,557). Com relação aos genótipos, a freqüência destes também não foi significativamente diferente entre os grupos avaliados (p = 0,762),

mesmo quando foi levado em consideração o caráter dominante do alelo R (genótipos RR + QR vs QQ) (p = 0,461) ou seu caráter recessivo (genótipo RR vs QR + QQ) (p = 0,836).

Tabela 5.6 - Distribuição dos genótipos e freqüências dos alelos do polimorfismo *Q192R* do gene *PON1* nos indivíduos do grupo de estudo (GE) e do grupo controle (GC).

Grupos	Freqüências de genótipos			Freqüências de alelos	
	QQ	QR	RR	Q	R
GE (116)	30% (35)	50% (58)	20% (23)	0,55	0,45
GC (105)	26% (27)	53% (56)	21% (22)	0,52	0,48
	p^* = 0,762 (χ^2 = 0,54; 2 *gl*)			p^* = 0,557 (χ^2 = 0,35; 1 *gl*)	

Número de indivíduos entre parênteses
* *p*-valores referentes ao teste qui-quadrado (χ^2).

Quando se analisou a relação entre as freqüências gênicas e genotípicas, equilíbrio de Hardy-Weinberg, para o polimorfismo *Q192R* do gene da *PON1* dos indivíduos pertencentes ao grupo de adultos jovens infartados (GE) e ao grupo controle (GC), observou-se que estas distribuições correspondiam a que se espera segundo o teorema. Para o teste de significância aplicamos o teste qui-quadrado (χ^2).

Equilíbrio de Hardy-Weinberg:
GE: P = 0,907 (χ^2 = 0,014; 1 *gl*)
GC: P = 0,479 (χ^2 = 0,501; 1 *gl*)

A representação gráfica da distribuição dos genótipos para o polimorfismo *Q192R* do gene da *PON1* dos indivíduos do grupo de estudo (GE) e controle (GC), pode ser observado na figura 5.7.

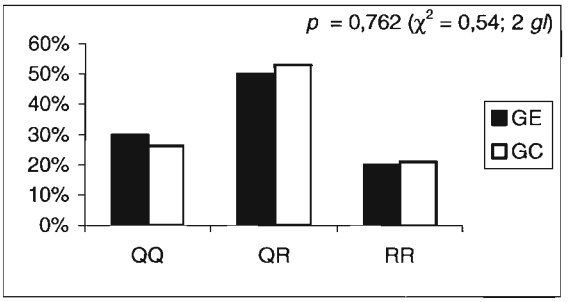

Figura 5.7 - Distribuição das freqüências dos genótipos (%) para o polimorfismo *Q192R* do gene da *PON1* no grupo de estudo (GE) e controle (GC).

Na tabela 5.7 podem ser observados os dados para a análise da influência dos genótipos do polimorfismo *Q192R* do gene da *PON1* sobre os parâmetros bioquímicos, tanto no grupo de indivíduos infartados (GE), quanto no grupo controle (GC).

As concentrações séricas médias dos parâmetros bioquímicos dos indivíduos controles estratificados pelos genótipos do polimorfismo *PON2 Q192R*, constatou-se não haver diferença estatística significativa em nenhum deles. Esta mesma análise nos pacientes com infarto do miocárdio identificou que apenas a concentração do colesterol da VLDL (VLDL-C) mostrou prevalência significativa entre os genótipos, sendo maiores concentrações nos genótipos QR e QQ ($p = 0,040$).

Tabela 5.7 - Distribuição das concentrações séricas dos parâmetros bioquímicos (média ± DP) dos indivíduos adultos infartados jovens (GE), indivíduos do grupo controle (GC) e (GE+GC), de acordo com os genótipos do polimorfismo *Q192R* do gene *PON1*.

Parâmetros	Grupos	QQ	QR	RR	p^*
CT (mg/dL)	GE (109)	205 ± 43 (33)	212 ± 47 (55)	198 ± 50 (21)	0,387
	GC (97)	179 ± 37 (25)	183 ± 49 (52)	197 ± 27 (20)	0,309
	GE + GC (206)	199 ± 44 (58)	198 ± 50 (107)	197 ± 40 (41)	0,931
TG (mg/dL)	GE (109)	184 ± 124 (33)	187 ± 94 (55)	150 ± 105 (21)	0,564
	GC (97)	87 ± 41 (25)	94 ± 45 (52)	109 ± 59 (20)	0,283
	GE + GC (206)	142 ± 108 (58)	142 ± 88 (107)	130 ± 87 (41)	0,905
LDL-C (mg/dL)	GE (109)	141 ± 42 (33)	126 ± 46 (55)	127 ± 42 (21)	0,288
	GC (97)	106 ± 31 (25)	107 ± 41 (52)	117 ± 27 (20)	0,504
	GE + GC (206)	126 ± 41 (58)	117 ± 44 (107)	122 ± 36 (41)	0,461
VLDL-C (mg/dL)	GE (109)	30 ± 15 (33)	38 ± 19 (55)	28 ± 17 (21)	**0,040**
	GC (97)	20 ± 17 (33)	19 ± 9 (55)	22 ± 12 (21)	0,646
	GE + GC (206)	25 ± 17 (25)	29 ± 18 (52)	25 ± 15 (20)	0,371
HDL-C (mg/dL)	GE (109)	46 ± 15 (58)	44 ± 12 (107)	45 ± 15 (41)	0,737
	GC (97)	53 ± 13 (25)	56 ± 15 (52)	58 ± 16 (20)	0,588
	GE + GC (206)	49 ± 14 (58)	50 ± 15 (107)	51 ± 16 (41)	0,885
APO A-I (mg/dL)	GE (109)	125 ± 27 (33)	125 ± 24 (55)	120 ± 24 (21)	0,635
	GC (97)	144 ± 23 (25)	147 ± 27 (52)	150 ± 24 (20)	0,717
	GE + GC (206)	134 ± 27 (58)	136 ± 28 (107)	134 ± 28 (41)	0,844
APO B (mg/dL)	GE (109)	109 ± 21 (33)	104 ± 30 (55)	106 ± 27 (21)	0,829
	GC (97)	83 ± 21 (25)	84 ± 25 (52)	91 ± 18 (20)	0,408
	GE + GC (206)	98 ± 25 (58)	94 ± 39 (107)	99 ± 24 (41)	0,727

Número de indivíduos entre parênteses.
CT: colesterol total; TG: triacilgliceróis; HDL-C: colesterol da HDL; LDL-C: colesterol da LDL; VLDL-C: colesterol da VLDL; APO A-I: apolipoproteína A-I; APO B: apolipoproteína B.
* *p*-valores referentes ao teste de ANOVA.

Quando foram feitas as comparações das concentrações dos parâmetros bioquímicos entre os genótipos (QQ vs QR + RR) do polimorfismo *Q192M* do gene da *PON1*, no grupo de indivíduos infartados (GE); observou-se não haver diferença estatística significativa (tabela 5.8).

Tabela 5.8 - Distribuição das concentrações séricas dos parâmetros bioquímicos (média ± DP) dos indivíduos adultos infartados jovens (GE), dos indivíduos do grupo controle (GC), de acordo com os genótipos (QQ vs QR + RR) do polimorfismo *Q192R* do gene *PON1*.

Parâmetros	Grupos	QQ	QR + RR	*p**
CT (mg/dL)	GE (111)	212 ± 44 (35)	211 ± 57 (76)	0,686
	GC (99)	179 ± 36 (27)	188 ± 46 (72)	0,466
TG (mg/dL)	GE (111)	182 ± 121 (35)	179 ± 97 (76)	0,910
	GC (99)	90 ± 44 (27)	97 ± 48 (72)	0,458
LDL-C (mg/dL)	GE (110)	139 ± 42 (34)	127 ± 42 (76)	0,134
	GC (99)	107 ± 31 (27)	111 ± 40 (72)	0,710
VLDL-C (mg/dL)	GE (109)	30 ± 15 (34)	35 ± 19 (75)	0,871
	GC (99)	21 ± 17 (27)	19 ± 10 (71)	0,807
HDL-C (mg/dL)	GE (110)	47 ± 15 (34)	44 ± 13 (76)	0,522
	GC (99)	53 ± 12 (27)	57 ± 15 (72)	0,311
APO A-I (mg/dL)	GE (109)	129 ± 32 (34)	124 ± 24 (75)	0,451
	GC (99)	145 ± 23 (27)	148 ± 26 (71)	0,564
APO B (mg/dL)	GE (109)	108 ± 21 (34)	104 ± 29 (75)	0,454
	GC (99)	84 ± 21 (27)	86 ± 23 (72)	0,733

Número de indivíduos entre parênteses.
CT: colesterol total; TG: triacilgliceróis; HDL-C: colesterol da HDL; LDL-C: colesterol da LDL; VLDL-C: colesterol da VLDL; APO A-I: apolipoproteína A-I; APO B: apolipoproteína B.
**p*-valores referentes ao teste *t* de Student.

5.5 Análise do polimorfismo *S311C* do gene *PON2*

Na figura 5.8 ilustra a fotografia do gel de agarose, após a migração eletroforética, dos produtos de 294 pb resultantes de amplificação pela PCR das regiões que flanqueiam o sítio polimórfico *S311C* do gene *PON2*.

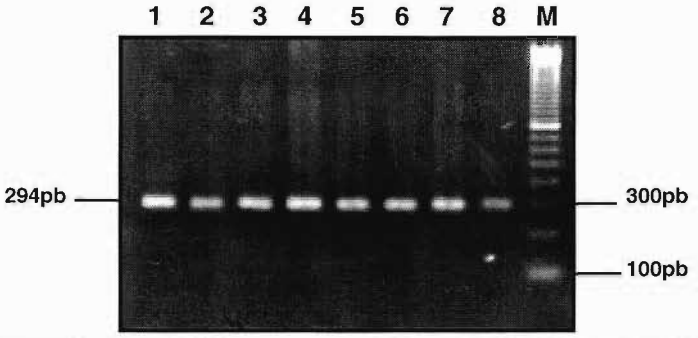

Figura 5.8 - Fotografia do gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo, sob luz U.V., dos produtos de amplificação da região polimórfica *S311C* do gene *PON2*. Colunas 1-8: produtos de PCR de 294pb; coluna M: marcador de tamanho molecular de DNA a cada 100 pb.

A figura 5.9 ilustra a fotografia do gel de agarose a 2 % % com os fragmentos de restrição da *Dde*I encontrados nos polimorfismos de tamanho de fragmentos (RPLP). Na presença do polimorfismo *S311C* do gene *PON2* tem-se os fragmentos de 196 e 98 pb para indivíduos homozigotos (genótipo CC). Na ausência deste polimorfismo os indivíduos homozigotos são caracterizados pela presença dos fragmentos de 129, 98 e 67 pb (genótipo SS). Para os heterozigotos (genótipo SC) observou-se a presença de quatro fragmentos de restrição: 196, 129, 98 e 67 pb.

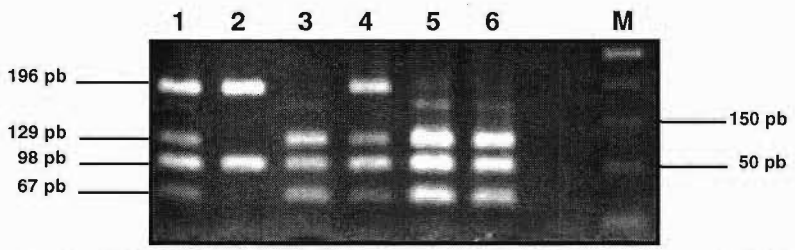

Figura 5.9 - Fotografia do gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo, sob luz U.V., dos fragmentos de restrição com a enzima *Mbo*I da região polimórfica *S311C* do gene *PON2*. Coluna 1 e 4: presença de 4 bandas de 196, 129, 98 e 67 pb que identificam os indivíduos heterozigotos (genótipo SC); coluna 2: presença de 2 bandas de 196 e 98 pb que identificam os indivíduos homozigotos com o polimorfismo (genótipo CC); coluna 3, 5 e 6: presença de 3 bandas de 129, 98 e 67 pb que identificam os indivíduos homozigotos sem o polimorfismo (genótipo SS); coluna M: marcador de tamanho molecular de DNA a cada 50 pb.

Na tabela 5.9 estão apresentados os resultados das distribuições das freqüências dos genótipos e dos alelos para o polimorfismo *S311C* do gene da *PON2* dos indivíduos pertencentes ao grupo de adultos jovens infartados (GE) comparados aos resultados observados para os indivíduos do grupo controle (GC). Para análise da hipótese de igualdade de proporções entre as freqüências observadas nos indivíduos dos grupos estudados (GE e GC) aplicamos o teste qui-quadrado (χ^2). A análise das freqüências dos alelos mostrou que a freqüência do alelo S foi 0,79 no GE comparada a 0,75 do GC (p = 0,255). Com relação aos genótipos, a freqüência destes também não foi significativamente diferente entre os grupos avaliados (p = 0,411), mesmo quando foi levado em consideração o caráter dominante do alelo S (genótipos SS + SC vs CC) (p = 0,240) ou seu caráter recessivo (genótipo SS vs SC + CC) (p = 0,369).

Tabela 5.9 - Distribuição dos genótipos e freqüências dos alelos do polimorfismo *S311C* do gene *PON2* nos indivíduos do grupo de estudo (GE) e do grupo controle (GC).

Grupos	Freqüências de genótipos			Freqüências de alelos	
	SS	SC	CC	S	C
GE (116)	61% (71)	36% (42)	3% (03)	0,79	0,21
GC (105)	55% (58)	39% (41)	6% (06)	0,75	0,25
	p^* = 0,411 (χ^2 = 1,78; 2 *gl*)			p^* = 0,255 (χ^2 = 1,29; 1 *gl*)	

Número de indivíduos entre parênteses
*p-valores referentes ao teste qui-quadrado (χ^2).

Quando se analisou a relação entre as freqüências gênicas e genotípicas, equilíbrio de Hardy-Weinberg, para o polimorfismo *S311C* do gene da *PON2* dos indivíduos pertencentes ao grupo de adultos jovens infartados (GE) e ao grupo controle (GC), observou-se que estas

distribuições correspondiam a que se espera segundo o teorema. Para o teste de significância aplicou-se o teste qui-quadrado (χ^2).

Equilíbrio de Hardy-Weinberg:
GE: $P = 0{,}2661$ ($\chi^2 = 1{,}2369$; 1 *gl*)
GC: $P = 0{,}7219$ ($\chi^2 = 0{,}1267$; 1 *gl*)

A representação gráfica da distribuição dos genótipos para o polimorfismo *S311C* do gene da *PON2* dos indivíduos do grupo de estudo (GE) e controle (GC), pode ser observado na figura 5.10.

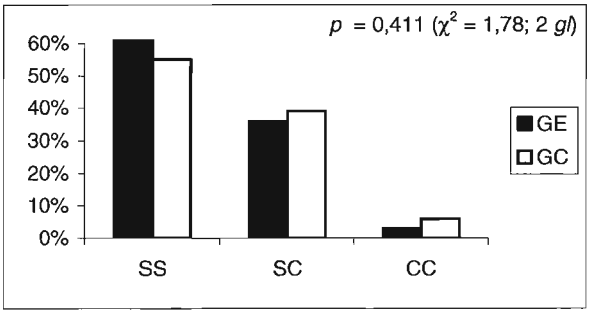

Figura 5.10 - Distribuição das freqüências dos genótipos (%) para o polimorfismo *S311C* do gene da *PON2* no grupo de estudo (GE) e controle (GC).

Na tabela 5.10 podem ser observados os dados para a análise da influência dos genótipos do polimorfismo *S311C* do gene da *PON2* sobre os parâmetros bioquímicos, tanto no grupo de indivíduos infartados (GE), quanto no grupo controle (GC). Também foi feita a análise da população total estudada (GE+GC).

Quando as concentrações séricas médias dos parâmetros bioquímicos dos pacientes infartados e dos controles foram estratificadas pelos genótipos da PON2 S311C, observou-se que não houve predominância das concentrações entre os genótipos do grupo controle e nem dos infartados.

Tabela 5.10 - Distribuição das concentrações séricas dos parâmetros bioquímicos (média ± DP) dos indivíduos adultos infartados jovens (GE), indivíduos do grupo controle (GC) e (GE+GC), de acordo com os genótipos do polimorfismo *S311C* do gene *PON2*.

Parâmetros	Grupos	SS	SC	CC	p^*
CT (mg/dL)	GE (109)	208 ± 46 (66)	212 ± 47 (40)	214 ± 74 (03)	0,997
	GC (97)	183 ± 42 (51)	182 ± 42 (40)	213 ± 47 (06)	0,243
	GE + GC (206)	198 ± 46 (117)	197 ± 47 (80)	213 ± 53 (09)	0,670
TG (mg/dL)	GE (109)	190 ± 120 (66)	158 ± 79 (40)	207 ± 79 (03)	0,402
	GC (97)	94 ± 48 (51)	93 ± 42 (40)	124 ± 71 (06)	0,302
	GE + GC (206)	148 ± 107 (117)	126 ± 71 (80)	152 ± 80 (09)	0,333
LDL (mg/dL)	GE (109)	128 ± 43 (66)	135 ± 46 (40)	123 ± 70 (03)	0,797
	GC (97)	108 ± 34 (51)	106 ± 38 (40)	136 ± 36 (06)	0,161
	GE + GC (206)	120 ± 41 (117)	121 ± 43 (80)	132 ± 46 (09)	0,704
VLDL (mg/dL)	GE (109)	33 ± 19 (66)	33 ± 16 (40)	42 ± 16 (03)	0,712
	GC (97)	20 ± 14 (51)	19 ± 8 (40)	25 ± 14 (06)	0,471
	GE + GC (206)	28 ± 18 (117)	26 ± 14 (80)	31 ± 16 (09)	0,779
HDL-C (mg/dL)	GE (109)	44 ± 14 (66)	46 ± 13 (40)	49 ± 15 (03)	0,801
	GC (97)	56 ± 16 (51)	57 ± 13 (40)	52 ± 18 (06)	0,708
	GE + GC (206)	49 ± 16 (117)	51 ± 14 (80)	51 ± 16 (09)	0,704
APO A-I (mg/dL)	GE (109)	124 ± 24 (66)	125 ± 24 (40)	137 ± 37 (03)	0,654
	GC (97)	146 ± 26 (51)	149 ± 25 (40)	144 ± 19 (06)	0,815
	GE + GC (206)	133 ± 27 (117)	137 ± 27 (80)	142 ± 24 (09)	0,527
APO B (mg/dL)	GE (109)	105 ± 24 (66)	108 ± 31 (40)	109 ± 34 (03)	0,944
	GC (97)	84 ± 20 (51)	85 ± 24 (40)	102 ± 28 (06)	0,182
	GE + GC (206)	96 ± 24 (117)	96 ± 30 (80)	104 ± 28 (09)	0,711

Número de indivíduos entre parênteses.
CT: colesterol total; TG: triacilgliceróis; HDL-C: colesterol da HDL; LDL-C: colesterol da LDL; VLDL-C: colesterol da VLDL; APO A-I: apolipoproteína A-I; APO B: apolipoproteína B.
* *p*-valores referentes ao teste de ANOVA.

Quando se comparou as concentrações dos parâmetros bioquímicos entre os genótipos (SS vs SC + CC) do polimorfismo *S311C* do gene da *PON2*, no grupo de indivíduos infartados (GE); observou-se não haver diferença estatística significativa (tabela 5.11).

Tabela 5.11 Distribuição das concentrações séricas dos parâmetros bioquímicos (média ± DP) dos indivíduos adultos infartados jovens (GE), dos indivíduos do grupo controle (GC), de acordo com os genótipos (SS vs SC + CC) do polimorfismo *S311C* do gene da *PON2*.

Parâmetros	Grupos	SS	SC + CC	*p**
CT (mg/dL)	GE (113)	211 ± 56 (69)	212 ± 47 (44)	0,800
	GC (99)	185 ± 105 (53)	186 ± 43 (46)	0,908
TG (mg/dL)	GE (113)	190 ± 118 (69)	169 ± 80 (44)	0,624
	GC (99)	94 ± 34 (53)	97 ± 47 (46)	0,656
LDL-C (mg/dL)	GE (112)	130 ± 40 (68)	133 ± 45 (44)	0,821
	GC (99)	110 ± 37 (53)	110 ± 38 (46)	0,997
VLDL-C (mg/dL)	GE (111)	33 ± 19 (67)	35 ± 16 (44)	0,508
	GC (99)	20 ± 14 (53)	19 ± 9 (46)	0,874
HDL-C (mg/dL)	GE (112)	45 ± 14 (68)	46 ± 13 (44)	0,527
	GC (99)	56 ± 16 (53)	56 ± 13 (46)	0,789
APO A-I (mg/dL)	GE (111)	125 ± 28 (68)	125 ± 25 (43)	0,976
	GC (99)	146 ± 26 (53)	148 ± 24 (46)	0,645
APO B (mg/dL)	GE (111)	106 ± 25 (68)	108 ± 31 (43)	0,707
	GC (99)	84 ± 20 (53)	87 ± 25 (46)	0,533

Número de indivíduos entre parênteses.
CT: colesterol total; TG: triacilgliceróis; HDL-C: colesterol da HDL; LDL-C: colesterol da LDL; VLDL-C: colesterol da VLDL; APO A-I: apolipoproteína A-I; APO B: apolipoproteína B.
**p*-valores referentes ao teste *t* de Student.

5.6 Análise dos haplótipos dos polimorfismos *L55M* e *Q192R* do gene *PON1*

Na tabela 5.12 e figura 5.11 estão apresentadas as distribuições dos haplótipos para a associação dos polimorfismos *L55M* e *Q192R* do gene *PON1* dos indivíduos do grupo de estudo e controle.

Tabela 5.12 - Distribuição dos genótipos e freqüências dos haplótipos dos polimorfismos *L55M* e *Q192R* do gene *PON1* nos indivíduos do grupo de estudo (GE) e do grupo controle (GC).

Haplótipos	Freqüências dos haplótipos	
	GE (111)	GC (98)
LL / QQ	12% (13)	7% (07)
LL / QR+RR	20% (22)	21% (20)
LM+MM / QQ	29% (32)	19% (19)
LM+MM / QR+RR	39% (44)	53% (52)
	p^{*} = 0,124 (χ^2 = 5,75; 3 *gl*)	

Número de indivíduos entre parênteses
*p-valores referentes ao teste qui-quadrado (χ^2).

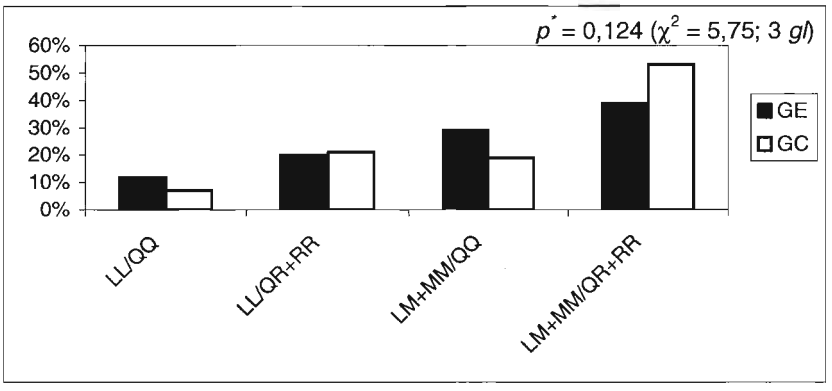

Figura 5.11 - Distribuição dos genótipos e freqüências dos haplótipos dos polimorfismos *L55M* e *Q192R* do gene *PON1* nos indivíduos do grupo de estudo (GE) e do grupo controle (GC).

Para avaliar a relação dos haplótipos dos polimorfismos do gene *PON1* nos valores das variáveis lipídicas, foi feito modelo de regressão logística univariada, considerando a junção dos genótipos. Foram feitas analises separadas para os indivíduos do grupo controle (GC) (tabela 5.13) e para os individuos do grupo de estudo (GE) (tabela 5.14). As variáveis foram categorizadas pelos valores dos percentis (P25 e P75) dos respectivos grupos.

Os indivíduos do grupo controle (GC) com o haplótipo PON1-55 LL e PON1-192 QR+RR possuem 3,1 vezes mais risco de apresentar concentrações séricas altas de colesterol total (>P75) do que os indivíduos com o haplótipo PON1-55 LM+MM e PON1-192 QR+RR (referência). Assim como, os indivíduos com os haplótipos PON1-55 LL e PON1-192 QR+RR (3,1 vezes) para altas concentrações de LDL-C (>P75), PON1-55 LL e PON1-192 QR+RR (3,9 vezes) e PON1-55 LL e PON1-192 QQ (6,4 vezes) para altas concentrações de apoB (P75), quando comparados aos indivíduos com o haplótipo PON1-55 LM+MM e PON1-192 QR+RR (referência) (tabela 5.13).

Os indivíduos do grupo de estudo (GE) não apresentaram nenhuma relação significativa dos haplótipos dos polimorfismos do gene *PON1* nos valores das variáveis lipídicas (tabela 5.14).

Tabela 5.13 - Resultados das análises de regressão logítica univariadas para a influência de *PON1-55* e *PON1-192* nas variáveis lipídicas do grupo controle (GC).

Parâmetros	Haplótipos	*p**	O.R.	IC 95% O.R.
CT > 209,0 (98)	LM+MM / QR+RR(ref.) (52)	----	1,00	----
	LM+MM / QQ (19)	0,953	0,00**	0,00 – 999,0
	LL / QR+RR (20)	**0,048**	**3,05**	1,01 – 9,20
	LL / QQ (7)	0,219	2,80	0,54 – 14,39
TG > 114,0 (98)	LM+MM / QR+RR(ref.) (52)	----	1,00	----
	LM+MM / QQ (19)	0,740	0,79	0,19 – 3,24
	LL / QR+RR (20)	0,164	2,26	0,72 – 7,13
	LL / QQ (7)	0,172	3,15	0,61 – 16,37
LDL-C > 135,0 (98)	LM+MM / QR+RR(ref.) (52)	----	1,00	----
	LM+MM / QQ (19)	0,952	0,00**	0,00 – 999,0
	LL / QR+RR (20)	**0,048**	**3,05**	1,01 – 9,20
	LL / QQ (7)	0,055	4,97	0,97 – 25,57
VLDL-C > 23,0 (98)	LM+MM / QR+RR(ref.) (52)	----	1,00	----
	LM+MM / QQ (19)	0,489	0,56	0,11 – 2,87
	LL / QR+RR (20)	0,112	2,57	0,80 – 8,26
	LL / QQ (7)	0,478	1,91	0,32 – 11,45
HDL-C ≤ 46,0 (98)	LM+MM / QR+RR(ref.) (52)	----	1,00	----
	LM+MM / QQ (19)	0,959	0,97	0,30 – 3,19
	LL / QR+RR (20)	0,868	0,91	0,28 – 2,95
	LL / QQ (7)	0,927	1,09	0,19 – 6,25
APO A-I ≤ 127,0 (98)	LM+MM / QR+RR(ref.) (52)	----	1,00	----
	LM+MM / QQ (19)	0,616	0,72	0,21 – 2,56
	LL / QR+RR (20)	0,868	0,91	0,28 – 2,95
	LL / QQ (7)	0,927	1,09	0.19 – 6,25
APO B > 98,0 (98)	LM+MM / QR+RR(ref.) (52)	----	1,00	----
	LM+MM / QQ (19)	0,224	0,27	0,03 – 2,25
	LL / QR+RR (20)	**0,019**	**3,91**	1,25 – 12,18
	LL / QQ (7)	**0,029**	**6,37**	1,21 – 33,52

Número de indivíduos entre parênteses
CT: colesterol total; TG: triacilgliceróis; HDL-C: colesterol da HDL; LDL-C: colesterol da LDL; VLDL-C: colesterol da VLDL; APO A-I: apolipoproteína A-I; APO B: apolipoproteína B: unidade de concentração expressa em mg/dL.
**Odds Ratio indeterminada
**p*-valores referentes à regressão logística univariada.

Tabela 5.14 - Resultados das análises de regressão logítica univariadas para a influência de *PON1-55* e *PON1-192* nas variáveis lipídicas do grupo controle (GE).

Parâmetros	Haplótipos	*p**	O.R.	IC 95% O.R.
CT > 235,0 (111)	LM+MM / QR+RR(ref.) (44)	----	1,00	----
	LM+MM / QQ (22)	0,839	0,88	0,26 – 2,95
	LL / QR+RR (32)	0,752	0,84	0,29 – 2,48
	LL / QQ (13)	0,888	0,90	0,21 – 3,87
TG > 238,0 (111)	LM+MM / QR+RR(ref.) (44)	----	1,00	----
	LM+MM / QQ (22)	0,705	0,80	0,26 – 2,49
	LL / QR+RR (32)	0,114	0,40	0,13 – 1,25
	LL / QQ (13)	0,258	0,39	0,08 – 2,00
LDL-C > 135,0 (110)	LM+MM / QR+RR(ref.) (44)	----	1,00	----
	LM+MM / QQ (21)	0,484	1,50	0,48 – 4,67
	LL / QR+RR (32)	0,752	0,84	0,29 – 2,48
	LL / QQ (13)	0,473	0,55	0,10 – 2,85
VLDL-C > 46,0 (109)	LM+MM / QR+RR(ref.) (43)	----	1,00	----
	LM+MM / QQ (21)	0,096	0,31	0,08 – 1,23
	LL / QR+RR (32)	0,068	0,35	0,11 – 1,08
	LL / QQ (13)	0,428	0,56	0,13 – 2,35
HDL-C ≤ 36,0 (98)	LM+MM / QR+RR(ref.) (44)	----	1,00	----
	LM+MM / QQ (21)	0,595	0,71	0,20 – 2,55
	LL / QR+RR (32)	0,548	1,36	0,50 – 3,75
	LL / QQ (13)	0,679	1,33	0,34 – 5,20
APO A-I ≤ 106,0 (98)	LM+MM / QR+RR(ref.) (44)	----	1,00	----
	LM+MM / QQ (21)	0,736	0,80	0,22 – 2,93
	LL / QR+RR (31)	0,229	1,87	0,68 – 5,18
	LL / QQ (13)	0,979	1,02	0,23 – 4,44
APO B > 126,0 (98)	LM+MM / QR+RR(ref.) (44)	----	1,00	----
	LM+MM / QQ (21)	0,759	1,22	0,35 – 4,21
	LL / QR+RR (31)	0,907	0,93	0,30 – 2,96
	LL / QQ (13)	0,439	1,73	0,43 – 6,92

Número de indivíduos entre parênteses
CT: colesterol total; TG: triacilgliceróis; HDL-C: colesterol da HDL; LDL-C: colesterol da LDL; VLDL-C: colesterol da VLDL; APO A-I: apolipoproteína A-I; APO B: apolipoproteína B: unidade de concentração expressa em mg/dL.
**p*-valores referentes à regressão logística univariada.

As tabelas 5.15 e 5.16, a seguir, apresentam os resultados das análises de regressão logística multivariadas para estudar a relação conjunta dos alelos dos três polimorfismos *L55M*, *Q192R* e *S311C* com as variáveis

depentes de interesse (parâmetros bioquímicos), nos grupos controle (GC) e grupo de estudo (GE), respectivamente.

Pelos resultados da tabela 5.15 (GC), verifica-se relação significativa dos alelos com as concentrações do colesterol total (CT), colesterol da LDL (LDL-C) e apolipoproteina B (apoB): os indivíduos LL (PON1-55) com 4,40 vezes mais risco (IC 95%: 1,45 – 13,34) de apresentar altas concentrações de CT (P75) do que os individuos LM+MM; os indivíduos LL (PON1-55) com 4,47 vezes mais risco (IC 95%: 1,47 – 13,61) de apresentar altas concentrações de LDL-C (P75) do que os individuos LM+MM; os indivíduos LL (PON1-55) com 6,92 vezes mais risco (IC 95%: 2,16 – 22,16) de apresentar altas concentrações de apoB (P75) do que os individuos LM+MM.

Pelos resultados da tabela 5.16 (GE), verifica-se relação significativa dos alelos com as concentrações do triacilglicerol (TG): os indivíduos LL (PON1-55) com 3,80 vezes mais risco (IC 95%: 1,45 – 13,34) de apresentar altas concentrações de TG (P75) do que os individuos LM+MM.

Tabela 5.15 - Resultados das análises de regressão logítica multivariadas para a influência dos alelos dos polimorfismos *L55M, Q192R* e *S311C* nos parametros lipídicos do grupo controle (GC).

Parâmetros	Haplótipos	*p**	O.R.	IC 95% O.R.
CT > 209,0 (99)	55 – LL+LM vs MM	0,506	1,70	0,36 – 8,02
	55 – MM+LM vs LL	**0,009**	**0,23**	0,0 – 0,69
	192 – QQ+QR vs RR	0,384	0,56	0,16 – 2,05
	192 – RR+QR vs QQ	0,245	2,19	0,58 – 8,25
	311 – SS+SC vs CC	0,198	0,29	0,04 – 1,90
	311 – CC+CS vs SS	0,876	0,92	0,32 – 2,65
TG > 114,0 (99)	55 – LL+LM vs MM	0,792	1,21	0,30 – 4,81
	55 – MM+LM vs LL	0,065	0,36	0,12 – 1,07
	192 – QQ+QR vs RR	0,515	0,65	0,18 – 2,35
	192 – RR+QR vs QQ	0,669	0,78	0,25 – 2,43
	311 – SS+SC vs CC	0,146	0,25	0,04 – 1,62
	311 – CC+CS vs SS	0,578	0,75	0,27 – 2,09
LDL-C > 135,0 (99)	55 – LL+LM vs MM	0,507	1,69	0,36 – 8,03
	55 – MM+LM vs LL	**0,008**	**0,22**	0,07 – 0,68
	192 – QQ+QR vs RR	0,403	0,58	0,16 – 2,10
	192 – RR+QR vs QQ	0,234	2,23	0,59 – 8,40
	311 – SS+SC vs CC	0,145	0,24	0,04 – 1,63
	311 – CC+CS vs SS	0,488	0,68	0,23 – 2,00
VLDL-C > 23,0 (99)	55 – LL+LM vs MM	0,530	1,64	0,35 – 7,69
	55 – MM+LM vs LL	0,090	0,38	0,12 – 1,16
	192 – QQ+QR vs RR	0,329	0,52	0,14 – 1,93
	192 – RR+QR vs QQ	0,929	1,06	0,31 – 3,68
	311 – SS+SC vs CC	0,160	0,26	0,04 – 1,69
	311 – CC+CS vs SS	0,929	1,05	0,36 – 3,07
HDL-C ≤ 46,0 (98)	55 – LL+LM vs MM	0,180	2,48	0,66 – 9,29
	55 – MM+LM vs LL	0,479	1,48	0,50 – 4,36
	192 – QQ+QR vs RR	0,446	0,62	0,18 – 2,13
	192 – RR+QR vs QQ	0,843	0,90	0,30 – 2,67
	311 – SS+SC vs CC	0,258	0,36	0,06 – 2,12
	311 – CC+CS vs SS	0,922	1,05	0,40 – 2,77
APO A-I ≤ 127,0 (98)	55 – LL+LM vs MM	0,646	1,34	0,39 – 4,59
	55 – MM+LM vs LL	0,857	1,10	0,38 – 3,25
	192 – QQ+QR vs RR	0,929	1,06	0,30 – 3,68
	192 – RR+QR vs QQ	0,630	1,31	0,43 – 3,97
	311 – SS+SC vs CC	0,582	0,59	0,09 – 3,83
	311 – CC+CS vs SS	0,625	0,79	0,30 – 2,07
APO B > 98,0 (98)	55 – LL+LM vs MM	0,775	0,81	0,18 – 3,54
	55 – MM+LM vs LL	**0,001**	**0,15**	0,05 – 0,46
	192 – QQ+QR vs RR	0,345	0,53	0,14 – 1,98
	192 – RR+QR vs QQ	0,993	0,99	0,29 – 3,43
	311 – SS+SC vs CC	0,186	0,26	0,04 – 1,91
	311 – CC+CS vs SS	0,902	0,94	0,32 – 2,73

Número de indivíduos entre parênteses
CT: colesterol total; TG: triacilgliceróis; HDL-C: colesterol da HDL; LDL-C: colesterol da LDL; VLDL-C: colesterol da VLDL; APO A-I: apolipoproteína A-I; APO B: apolipoproteína B: unidade de concentração expressa em mg/dL.
**p*-valores referentes à regressão logística multivariada.

Tabela 5.16 - Resultados das análises de regressão logítica multivariadas para a influência dos alelos dos polimorfismos *L55M*, *Q192R* e *S311C* nos parametros lipídicos do grupo de estudo (GE).

Parâmetros	Haplótipos	*p**	O.R.	IC 95% O.R.
CT > 235,0 (113)	55 – LL+LM vs MM	0,977	1,02	0,28 – 3,78
	55 – MM+LM vs LL	0,817	1,14	0,39 – 3,34
	192 – QQ+QR vs RR	0,837	0,87	0,24- 3,20
	192 – RR+QR vs QQ	0,811	1,13	0,41 – 3,09
	311 – SS+SC vs CC	0,795	0,72	0,06 – 8,88
	311 – CC+CS vs SS	0,675	1,21	0,50 – 2,95
TG > 238,0 (113)	55 – LL+LM vs MM	0,470	1,62	0,44 – 5,99
	55 – MM+LM vs LL	**0,033**	**3,81**	1,12 – 13,01
	192 – QQ+QR vs RR	0,481	0,60	0,14 – 2,52
	192 – RR+QR vs QQ	0,841	1,11	0,40 – 3,10
	311 – SS+SC vs CC	0,504	0,41	0,03 – 5,65
	311 – CC+CS vs SS	0,120	0,46	0,17 – 1,23
LDL-C > 153,0 (112)	55 – LL+LM vs MM	0,297	0,52	0,15 – 1,77
	55 – MM+LM vs LL	0,678	1,27	0,41 – 3,89
	192 – QQ+QR vs RR	0,580	0,69	0,18 – 2,59
	192 – RR+QR vs QQ	0,695	0,82	0,30 – 2,24
	311 – SS+SC vs CC	0,782	0,70	0,06 – 8,73
	311 – CC+CS vs SS	0,409	1,46	0,60 – 3,57
VLDL-C > 46,0 (111)	55 – LL+LM vs MM	0,315	2,06	0,50 – 8,45
	55 – MM+LM vs LL	0,200	2,10	0,68 – 6,53
	192 – QQ+QR vs RR	0,622	1,43	0,344 – 5,96
	192 – RR+QR vs QQ	0,207	1,99	0,68 – 5,80
	311 – SS+SC vs CC	0,735	0,64	0,05 – 8,33
	311 – CC+CS vs SS	0,591	0,77	0,30 – 1,99
HDL-C ≤ 36,0 (98)	55 – LL+LM vs MM	0,297	2,37	0,47 – 12,02
	55 – MM+LM vs LL	0,334	0,61	0,22 – 1,68
	192 – QQ+QR vs RR	0,413	1,71	0,47 – 6,17
	192 – RR+QR vs QQ	0,469	1,46	0,53 – 4,03
	311 – SS+SC vs CC	0,764	0,68	0,05 – 8,75
	311 – CC+CS vs SS	0,439	0,70	0,28 – 1,75
APO A-I ≤ 106,0 (98)	55 – LL+LM vs MM	0,265	2,54	0,49 – 13,02
	55 – MM+LM vs LL	0,760	0,85	0,29 – 2,48
	192 – QQ+QR vs RR	0,354	0,55	0,16 – 1,94
	192 – RR+QR vs QQ	0,671	1,26	0,43 – 3,68
	311 – SS+SC vs CC	0,980	999,0**	0,00 – 999,0
	311 – CC+CS vs SS	0,842	0,91	0,37 – 2,27
APO B > 126,0 (98)	55 – LL+LM vs MM	0,751	0,81	0,21 – 3,06
	55 – MM+LM vs LL	0,720	0,82	0,28 – 2,44
	192 – QQ+QR vs RR	0,990	1,01	0,26 – 3,91
	192 – RR+QR vs QQ	0,654	0,79	0,29 – 2,18
	311 – SS+SC vs CC	0,809	0,73	0,06 – 9,10
	311 – CC+CS vs SS	0,401	1,48	0,59 – 3,70

Número de indivíduos entre parênteses
CT: colesterol total; TG: triacilgliceróis; HDL-C: colesterol da HDL; LDL-C: colesterol da LDL; VLDL-C: colesterol da VLDL; APO A-I: apolipoproteína A-I; APO B: apolipoproteína B: unidade de concentração expressa em mg/dL.
**p*-valores referentes à regressão logística multivariada.
**Odds Ratio indeterminada.

6 DISCUSSÃO

Apesar de importantes avanços no entendimento de vários aspectos da fisiopatologia da aterosclerose, seu mecanismo ainda não é totalmente conhecido. Um grande número de fatores de risco como: tabagismo, altas concentrações de LDL-C, baixas concentrações de HDL-C, diabetes, hipertensão e fatores genéticos são conhecidos por predisporem à doença arterial coronariana (DAC). Portanto, a DAC é influenciada por fatores ambientais e/ou genéticos. A expectativa para identificação dos fatores de risco genéticos é a de aumentar o entendimento da base molecular da aterosclerose e assim diminuir a mortalidade, não apenas por meios terapêuticos mas também preventivos.

Baixas concentrações de HDL aumentam a susceptibilidade a aterosclerose, e consequentemente, a DAC (CASTELLI & ANDERSON, 1986; MILLER & MILLLER, 1975). A função da HDL depende, principalmente, das proteínas associadas a esta partícula. Deste modo, a PON1 sérica localizada na HDL, ligada firmemente a fração que contém apo A-I e apo J (BLATTER *et al.*, 1993), foi sugerida como um fator fortemente responsável pela função antioxidante da HDL (MACKNESS, ARROL & DURRINGTON, 1991; WATSON *et al.*, 1995). Esta função pode ser um importante mecanismo pelo qual a HDL inibe a oxidação da LDL e, consequentemente, protege contra aterosclerose (MACKNESS, ARROL & DURRINGTON, 1991; NAVAB *et al.*, 2000a; NAVAB *et al.*, 2000b). A PON2 também tem propriedades antioxidantes e é capaz de prevenir a peroxidação da LDL, mas diferente da PON1 e PON3, não está associada à HDL e pode somente exercer sua função antioxidante ao nível celular (NG *et al.*, 2001).

Modificações oxidativas na LDL são elementos importantes no desenvolvimento da aterosclerose (NAVAB *et al.*, 1991). Numerosos estudos sugerem que a modificação oxidativa da LDL inicia o desenvolvimento, na parede arterial, de células espumosas e estrias gordurosas, causando a aterosclerose (STEINBERG, 1989; WITZTUM & STEINBERG, 1991). O dano oxidativo ao sistema biológico vital pode levar ao aumento da expressão de genes inflamatórios que contribuem para o desenvolvimento de muitas doenças crônicas incluindo DAC, câncer e diabetes (NAVAB *et al.*, 1996; PAPAS, 1996).

Na última década, estudos mostraram que a PON possui uma função no metabolismo de lipídios, sugerindo a possibilidade de afetar o risco de aterosclerose e DAC. As enzimas paraoxonases humanas (PON), particularmente PON1 e PON2, foram implicadas na patogênese da aterosclerose (MACKNESS *et al.*, 1993b). Estudos revelaram que a PON1 tem propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. *In vitro*, PON diminuiu significativamente a geração de peróxido lipídico durante a oxidação da LDL e preserva a HDL da modificação por peróxido lipídico (MACKNESS, ARROL & DURRINGTON, 1991; WATSON *et al.*, 1995; MACKNESS, *et al.*, 1997; AVIRAM *et al.*, 1998; MACKNESS, DURRINGTON & MACKNESS, 1998). Estes achados foram confirmados, *in vivo*, com camundongos deficientes de PON1, que mostraram alta suscetibilidade à aterosclerose (SHIH *et al.*, 1998).

A base genética da variabilidade interindividual da atividade da PON tem sido atribuída aos polimorfismos nos genes que codificam para estas enzimas (HUMBERT *et al.*, 1993). PON1 tem dois polimorfismos comuns que resultam em substituições de aminoácidos. O primeiro envolve uma substituição de glutamina (Q) por arginina (R) na posição 192. O segundo polimorfismo envolve a substituição de leucina (L) por metionina (M) na posição 55. O polimorfismo da PON2 uma substituição serina (S) pela cisteína (C) no resíduo 311 tem sido associado com variações nas concentrações das lipoproteínas plasmáticas (BORIGHT *et al.*, 1998). As

funções fisiológicas da PON1 e PON2 permanecem desconhecidas. Os polimorfismos nos genes da PON também foram associados, *in vitro*, com diferentes suscetibilidades da LDL a oxidação (MACKNESS, ARROL & DURRINGTON, 1991).

Devido aos dados *in vitro* e *in vivo* que implicam a PON na prevenção da oxidação da LDL e devido ao importante fator que variação genética na PON possui na alteração do risco de DAC, seus polimorfismos foram adicionados a lista de genes que estão envolvidos nas formas de DAC (HEINECKE & LUSIS, 1998).

Por estas razões, o presente trabalho estudou a associação de 3 freqüentes polimorfismos genéticos da PON1 (OMIM 168820) e PON2 (OMIM 602447) com o risco para DAC na população brasileira. Neste estudo, foram avaliadas as freqüências dos genótipos e de alelos dos polimorfismos *L55M* (168820.0002), *Q192R* (168820.0001) do gene *PON1* e polimorfismo *S311C* (602447.0001) do gene *PON2* de indivíduos que sofreram infarto e controles, posteriormente, a influência desses polimorfismos sobre o perfil lipídico (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM&itool=toolbar).

Ao analisar a distribuição de genótipos para os três polimorfismos, verificou-se que as freqüências observadas, em ambos os grupos (GE e GC), foram similares as esperadas em condições de equilíbrio de Hardy-Weinberg (p.59, 64 e 70).

Ao analisar as freqüências relativas dos alelos para o polimorfismo *L55M* do gene *PON1*, verificou-se que a freqüência do alelo L (0,73) nos indivíduos infartados (GE) foi semelhante à observada nos controles (GC) (0,69) (p = 0,324). Comparando-se a freqüência do alelo L (0,69), no GC, com outras populações, observou-se que foi semelhante à encontrada em indivíduos da Inglaterra (0,66) (SALONEN *et al.*, 1999), Estados Unidos (0,61) (AYUB *et al.*, 1999), Alemanha (0,68 e 0,64) (CASCORBI *et al.*, 1999; GARDEMANN *et al.*, 2000), Costa Rica (0,74) (SEN-BANERJEE, SILES &

CAMPOS, 2000), Holanda (0,65) (HEIJMANS *et al.*, 2000), Itália (0,66) (ARCA *et al.*, 2002) e Espanha (0,61) (FERRE *et al.*, 2002). Porém, a freqüência do alelo L no grupo controle foi menor que a freqüência encontrada em indivíduos orientais controle japoneses (0,92; 0,94 e 0,91) (IMAI *et al.*, 2000; YAMADA *et al.*, 2002; ZAMA *et al.*, 1997) e chineses (0,96) (SANGHERA *et al.*, 1998).

Para o grupo de estudo, observou-se que a freqüência do alelo L (0,73) foi semelhante às encontradas em indivíduos com DAC dos Estados Unidos (0,71) (AYUB *et al.,* 1999), Alemanha (0,68 e 0,67) (CASCORBI *et al.*, 1999; GARDEMANN *et al.*, 2000), Costa Rica (0,74) (SEN-BANERJEE, SILES & CAMPOS, 2000) e Holanda (0,65) (HEIJMANS *et al.*, 2000). Ao se comparar com a população japonesa apresentou-se menor (0,92 e 0,94) (IMAI *et al.*, 2000; YAMADA *et al.*, 2002) e maior que às encontradas em indivíduos com DAC da Inglaterra (0,56) (SALONEN *et al.*, 1999), Itália (0,62) (ARCA *et al.*, 2002) e Espanha (0,61) (FERRE *et al.*, 2002). Nestes estudos o alelo raro foi o M, apresentando freqüências que variam de 0,04 a 0,39 na população saudável.

Embora, o polimorfismo *L55M* tenha sido associado, em vários estudos epidemiológicos, com derrame, doença arterial coronariana e variações na concentração plasmática de colesterol total e LDL-C (GARIN *et al.*, 1997; LEVIEV, NEGRO & JAMES, 1997; SCHMIDT *et al.*, 1998; SANGHERA *et al.*, 1998; SALONEN *et al.*, 1999; SCHMIDT *et al.*, 2000; MALIN *et al.*, 2001a; MALIN *et al.*, 2001c; LEVIEV, DEAKIN & JAMES, 2001; FORTUNATO *et al.*, 2003); outros autores não encontraram associação da variação genética com DAC (SANGHERA, SAHA & KAMBOH, 1998; AYUB *et al.*, 1999; CASCORBI *et al.*, 1999; IMAI *et al.*, 2000; GARDEMANN *et al.*, 2000; SEN-BANERJEE, SILES & CAMPOS, 2000; HEIJMANS *et al.*, 2000; YAMADA *et al.*, 2002; ARCA *et al.*, 2002; FERRE *et al.*, 2002). Em uma grande meta-análise, com 43 estudos de associações genéticas, envolvendo mais que 11.000 casos e 13.000 controles também não foi encontrada

associação significativa entre o alelo M do polimorfismo *L55M* e DAC (OR, *p* = 1,00; IC 95%: 0,95 – 1,06) (WHEELER *et al.*, 2004).

Em relação à análise da influência do polimorfismo *L55M*, sobre os parâmetros lipídicos, observou-se que os portadores do genótipo LL, do GC, apresentaram maiores concentrações de triacilgliceróis. Os indivíduos com o genótipo LL, no GE, apresentaram menores concentrações de apo A-I. Analisando esta população como um grupo único (GE+GC), os indivíduos com o genótipo LL apresentaram baixas concentrações de HDL-C e apo A-I. Na combinação de genótipos (LL e LM+MM), os portadores do genótipo LL apresentaram maiores concentrações de CT, TG, LDL-C, VLDL-C e apo B, mas somente os indivíduos do GC.

Para o polimorfismo *Q192R* do gene *PON1*, quando se analisou a freqüência do alelo Q (0,55) no grupo de estudo, observou-se que ela é semelhante à observada no GC (0,52). Ao comparar a freqüência do alelo Q (0,55) com outras populações, verificou-se que foi similar à encontrada em indivíduos com DAC dos Estados Unidos (0,56) (SERRATO & MARIAN, 1995), indianos (0,54) (SANGHERA *et al.*, 1997; SANGHERA *et al.*, 1998), holandeses (0,64) (HEIJMANS *et al.*, 2000), chineses (0,59) (WANG *et al.*, 2003) e em indivíduos com IM da Inglaterra (0,56) (AYUB *et al.*, 1999). A freqüência encontrada é menor que a observada em indivíduos com DAC da Inglaterra (0,70) (RICE *et al.*, 1997), Itália (0,70) (OMBRES *et al.*, 1998), Alemanha (0,73; 0,71) (CASCORBI *et al.*, 1999; GARDEMANN *et al.*, 2000), Japão (0,75) (IMAI *et al.*, 2000), Estados Unidos (0,81) (TURBAN *et al.*, 2001) e em indivíduos infartados da Franca (0,69) (HERRMANN *et al.*, 1996), Inglaterra (0,76) (SALONEN *et al.*, 1999), Espanha (0,73; 0,70; 0,69) (AUBO *et al.*, 2000; SENTI *et al.*, 2001; FERRE *et al.*, 2002;), Costa Rica (0,73) (SEN-BANERJEE, SILES & CAMPOS, 2000), Japão (0,66) (YAMADA *et al.*, 2002) e maior que a observada em indivíduos com DAC chineses (0,42; 0,35) (SANGHERA *et al.*, 1997; KO *et al.*, 1998) e japoneses (0,40) (SUEHIRO *et al.*, 1996).

Numerosos estudos foram conduzidos para determinar se indivíduos portadores da aloenzima PON1 192 R eram mais susceptíveis a DAC do que os portadores da aloenzima Q. Destes estudos, alguns mostraram haver associação dos alelos do polimorfismo *Q192R* e DAC (SERRATO & MARIAN, 1995; ZAMA *et al.*, 1997; ODAWARA *et al.*, 1997; SANGHERA *et al.*, 1997; SANGHERA *et al.*, 1998; IMAI *et al.*, 2000; SEN-BANERJEE, SILES & CAMPOS, 2000; WANG *et al.*, 2003), e outros não encontraram associação significativa (HERRMANN *et al.*, 1996; SUEHIRO *et al.*, 1996; RICE *et al.*, 1997; SANGHERA *et al.*, 1997; KO *et al.*, 1998; OMBRES *et al.*, 1998; CASCORBI *et al.*, 1999; HEIJMANS *et al.*, 2000; GARDEMANN *et al.*, 2000; SENTI *et al.*, 2001; YAMADA *et al.*, 2002; FERRE *et al.*, 2002). Uma meta-análise envolvendo mais que 11.000 casos e 13.000 controles também não encontrou associação significativa entre o alelo R do polimorfismo *Q192R* e DAC (OR, $p = 1,12$; IC 95%: 1,07 – 1,16) (WHEELER *et al.*, 2004).

Uma explicação para esta diferença de resultados seria a variação substancial das freqüências dos alelos em diferentes regiões geográficas do mundo, em diferentes etnias e até mesmo em população com mesma etnia (BROPHY *et al.*, 2001). Por exemplo, em japoneses saudáveis a freqüência do alelo Q varia de 0,38 a 0,67 e em chineses de 0,36 a 0,65 (SUEHIRO, 1996; YAMADA *et al.*, 2002; KO, 1998; WANG, 2003). Na América do Norte ocorre uma variação de 0,69 a 0,72 e na Europa de 0,67 a 0,74 (BROPHY *et al.*, 2001). Sanghera *et al.* (1997), avaliaram a distribuição do polimorfismo *Q192R* em dois grupos raciais, chineses e indianos, nascidos em Singapura, à freqüência do alelo R foi significativamente diferente entre os dois grupos (0,58 x 0,33; $p<0,0001$).

Embora existam evidências de que, *in vitro*, ambas as variações genéticas (*L55M* e *Q192R*) modulam a proteção da LDL pela paraoxonase contra a peroxidação lipídica, deve ser enfatizado que hábitos alimentares e fatores ambientais têm uma grande influência na preservação da atividade da paraoxonase (MACKNESS *et al.*, 2000; AVIRAM *et al.*, 1998). Consequentemente, estas influências podem sobrepor uma ligação potencial

entre alterações dependente de polimorfismo na atividade da paraoxonase e um aumento no risco cardiovascular. Esta suposição pode explicar porque a maioria dos estudos falhou em detectar uma associação da variação genética da PON e um aumento do risco cardiovascular (GARDEMANN *et al.*, 2000). Portanto, é provável que fatores ambientais ou estilo de vida possam mascarar ou induzir o potencial aterogênico do alelo R, estes achados são um exemplo do fenômeno difundido da modulação dos efeitos genéticos pelos fatores ambientais entre varias populações (SEN-BANERJEE, SILES & CAMPOS, , 2000). Estudos adicionais devem ser incluídos para investigar como é possível que os fatores ambientais modularem os efeitos genéticos.

Ao avaliar a influência do polimorfismo *Q192R* do gene da *PON1*, sobre o perfil lipídico de indivíduos com DAC e controle, verificou-se que não houve diferença significativa entre as concentrações séricas de lipídios de acordo com os genótipos. Exceto em relação à concentração de VLDL-C que foi estatisticamente significativa no GE, no qual os indivíduos com os genótipos QR apresentaram os maiores valores.

Neste estudo, as análises de relação entre polimorfismo PON1 e traços quantitativos indicaram que o polimorfismo no códon 192 não tem um efeito substancial no perfil lipídico plasmático. Embora, previamente, relataram que os genótipos *Q192R* têm associação significativa com o perfil lipídico em uma população isolada, Hutterite Brethren (HEGELE, BRUNT & CONNELLY, 1995); outros estudos mostraram associação negativa (HERRMANN *et al*, 1996; ANTIKAINEN *et al.*, 1996; ZAMA *et al.*, 1997; ODAWARA *et al.*, 1997; SANGHERA *et al.*, 1998; KO *et al.*, 1998). Por isso, estes estudos sugerem que o impacto deste polimorfismo no perfil lipídico varia dependendo da população em estudo e fatores não genéticos como diferenças étnicas e dieta. Estudos adicionais são necessários para esclarecer o entendimento do mecanismo de interação do ambiente e genes identificados neste estudo e revelar outros fatores ambientais que modificam o efeito do genótipo PON1 na DAC.

O mecanismo responsável pela associação entre o alelo L (*L55M*) ou o alelo R (*Q192R*) e um aumento de risco de IM é desconhecido. Estudos, *in vitro,* mostraram que a HDL ligada a PON55 MM/PON192 RR possui maior proteção contra peroxidação lipídica da LDL do que quando ligada a PON55 LL/PON192 QQ (MACKNESS *et al.*, 1997; MACKNESS, DURRINGTON & MACKNESS, 1998; MACKNESS, DURRINGTON & MACKNESS, 1998).

Posteriormente, neste estudo, foi analisada a associação dos haplótipos dos polimorfismos *L55M* e *Q192R* do gene *PON1*, com as variáveis lipídicas nos grupos de estudo e controle. As freqüências relativas dos haplótipos dos indivíduos do GE (LL/QQ=12; LL/QR+QR=20; LM+MM/QQ=29; LM+MM/QR+RR=39) foram similares às encontradas nos indivíduos do GC (LL/QQ=7; LL/QR+QR=21; LM+MM/QQ=19; LM+MM/QR+RR=53). Verificamos que os indivíduos portadores do haplótipo LL / QR+RR apresentaram valores superiores de colesterol total, LDL-C, apo B em comparação aos demais haplótipos do GC. Estes resultados confirmam os resultados dos genótipos individuais obtidos.

Quando avaliou-se a freqüência dos alelos no grupo controle para o polimorfismo *S311C* do gene *PON2*, observou-se que para o alelo S a freqüência encontrada nos indivíduos com DAC (0,79) foi semelhante à observada em indivíduos controles (0,75). Ao analisar a freqüência do alelo S (0,75) do GC com outras populações, observou-se que foi similar à encontrada em indivíduos do Japão (0,80) (IMAI *et al.*, 2000), Coréia (0,80) (HONG *et al.*, 2001) e Estados Unidos (CHEN *et al.*, 2003). A freqüência encontrada é menor que a observada em indivíduos com DAC chineses (0,83) e maior do que a observada em indianos (0,61) (SANGHERA *et al.*, 1998).

Quando estudou-se a influência do polimorfismo *S311C* sobre o perfil lipídico de indivíduos com DAC e controles, verificou-se que não houve diferença significativa entre as concentrações séricas de lipídios de acordo com os genótipos dos polimorfismos. Ao contrário, outros estudos evidenciaram a associação entre o polimorfismo *S311C* e variação na

concentração plasmática de lipoproteínas (HEGELE *et al.*, 1997; HEGELE *et al.*, 1998).

Com o objetivo de estudar a relação conjunta dos alelos dos três polimorfismos *L55M*, *Q192R* e *S311C* com as variáveis do perfil lipídico dos indivíduos dos grupos estudados, utilizou-se a análise de regressão logística multivariada. Verificamos que os indivíduos, do grupo controle, portadores do genótipo LL apresentaram maiores concentrações de colesterol total, LDL-C e apo B. Assim como para os indivíduos do grupo de estudo, onde os portadores do genótipo LL, apresentaram maiores concentrações de triacilgliceróis. Estes resultados confirmam os resultados dos genótipos individuais obtidos.

Embora, vários estudos foram capazes de demonstrarem associação entre um particular alelo da PON e o risco e/ou a severidade de certas doenças, principalmente aterosclerose, alguns outros estudos obtiveram resultados contraditórios. A controvérsia sobre os polimorfismos da PON1 pode ser devido, pelo menos em parte, a diferença na freqüência de alelos em diferentes populações étnicas.

7 CONCLUSÕES

- A distribuição genotípica e a freqüência relativa dos alelos dos polimorfismos *L55M*, *Q192R* e *S311C* do gene *PON* nos indivíduos infartados foram semelhantes às observadas nos indivíduos não infartados

- Não foi possível associar os polimorfismos *L55M*, *Q192R* e *S311C* do gene *PON* com a doença arterial coronariana na população estudada.

- As freqüências relativas dos haplótipos dos indivíduos infartados foram similares às encontradas nos indivíduos não infartados.

- O polimorfismo *L55M* do gene *PON1* está associado com variações da concentração sérica de apolipoproteína A-I em indivíduos infartados.

- O polimorfismo *S311C* do gene *PON2* não está associado com variações séricas do perfil lipídico, apo A-I e apo B em indivíduos infartados.

Referências bibliográficas[1]

ADKINS, S.; GAN, K.N.; MODY, M.; LA DU, B.N. Molecular basis for the polymorphic forms of human serum paraoxonase/arylesterase: glutamine or arginine at position 191, for the respective A or B allozymes. **Am J Hum Genet.**, v.3, p.598-608, 1993.

AMERICAN HEART ASSOCIATION. Heart disease and stroke statistics – 2005 update. Dallas: **AHA**, 2005. [catálogo]. Disponível em: http://www.americanheart.org/presenter.jhtml?identifier=3000090

ANTIKAINEN, M.; MURTOMAKI, S.; SYVANNE, M.; PAHLMAN, R.; TAHVANAINEN, E.; JAUHIAINEN, M.; FRICK, M.H.; EHNHOLM, C. The Gln-Arg191 polymorphism of the human paraoxonase gene (HUMPONA) is not associated with the risk of coronary artery disease in Finns. **J Clin Invest.**, v.98, p.883-5, 1996.

ARCA, M.; OMBRES, D.; MONTALI, A.; CAMPAGNA, F.; MANGIERI, E.; TANZILLI, G.; CAMPA, P.P.; RICCI, G.; VERNA, R.; PANNITTERI, G. PON1 L55M polymorphism is not a predictor of coronary atherosclerosis either alone or in combination with Q192R polymorphism in an Italian population. **Eur J Clin Invest.**, v.32, p.9-15, 2002.

ASSMANN, G.;CULLEN, P.; SCHULTE, H. The Munster Heart Study (PROCAM). Results of follow-up at 8 years. **Eur. Heart J.**, v.19, p.A2-11, 1998.

AUBO, C.; SENTI, M.; MARRUGAT, J.; TOMAS, M.; VILA, J.; SALA, J.; MASIA, R. Risk of myocardial infarction associated with Gln/Arg 192 polymorphism in the human paraoxonase gene and diabetes mellitus. The REGICOR Investigators. **Eur Heart J.**, v.21, p.33-8, 2000.

AVIRAM, M., ROSENBLAT, M., BISGAIER, C.L., NEWTON, R.S., PRIMO-PARMO, S.L., LA DU, B.N. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. **J Clin Invest.**, v.101, p.1581-90, 1998

AVIRAM, M.; ROSENBLAT, M.. Paraoxonases 1, 2, and 3, oxidative stress, and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. **Free Radic Biol Med.**, v.37, p.1304-16, 2004.

AYUB, A.; MACKNESS, M.I.; ARROL, S.; MACKNESS, B.; PATEL, J.; DURRINGTON, P.N. Serum paraoxonase after myocardial infarction. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v.19, p.330-5, 1999.

[1] As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR 6023/2000 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), e as abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstract Service Source Index (CASSI) 2002.

BADIMON, J.J.; BADIMON, L.; FUSTER, V. Regression of atherosclerotic lesions by high density lipoprotein plasma fraction in the cholesterol-fed rabbit. **J Clin Invest.**, v.85, p.1234-41, 1990.

BARONI, M.G.; BERNI, A.; ROMEO, S.; ARCA, M.; TESORIO, T.; SORROPAGO, G.; DI MARIO, U.; GALTON, D.J. Genetic study of common variants at the Apo E, Apo AI, Apo CIII, Apo B, lipoprotein lipase (LPL) and hepatic lipase (LIPC) genes and coronary artery disease (CAD): variation in LIPC gene associates with clinical outcomes in patients with established CAD. BMC. **Med Genet.**, v.1, p.8, 2003.

BENOIT, P.; EMMANUEL, F.; CAILLAUD, J.M.; BASSINET, L.; CASTRO, G.; GALLIX, P.; FRUCHART, J.C.; BRANELLEC, D.; DENEFLE, P.; DUVERGER, N. Somatic gene transfer of human ApoA-I inhibits atherosclerosis progression in mouse models. **Circulation**, v.99, p.105-10, 1999.

BLATTER MC.; JAMES RW.; MESSMER S.; BARJA F.; POMETTA D. Identification of a distinct human high-density lipoprotein subspecies defined by a lipoprotein-associated protein, K-45. Identity of K-45 with paraoxonase. **Eur J Biochem.**, v.211, p.871-9, 1993.

BODZIOCH, M.; ORSO, E.; KLUCKEN, J.; LANGMANN, T.; BOTTCHER, A.; DIEDERICH, W.; DROBNIK, W.; BARLAGE, S.; BUCHLER, C.; PORSCH-OZCURUMEZ, M.; KAMINSKI, WE.; HAHMANN, HW.; OETTE, K.; ROTHE, G.; ASLANIDIS, C.; LACKNER, K.J.; SCHMITZ, G. The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. **Nat Genet.**, v.22, p.347-51, 1999.

BOLIBAR, I.; VON ECKARDSTEIN, A.; ASSMANN, G.; THOMPSON, S. ECAT Angina Pectoris Study Group. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities. Short-term prognostic value of lipid measurements in patients with angina pectoris. The ECAT Angina Pectoris Study Group: European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities. **Thromb Haemost.**, v.84, p.955-60, 2000.

BORIGHT, A.P.; CONNELLY, P.W.; BRUNT, J.H.; SCHERER, S.W.; TSUI, L.C.; HEGELE, R.A. Genetic variation in paraoxonase-1 and paraoxonase-2 is associated with variation in plasma lipoproteins in Alberta Hutterites. **Atherosclerosis**, v.139, p.131-6, 1998.

BRAUNWALD, E. Unstable angina: an etiologic approach to management. **Circulation**, v.98, p.2219-22, 1998.

BROOKS-WILSON, A.; MARCIL, M.; CLEE, S.M.; ZHANG,L.H.; ROOMP, K.; VAN DAM, M.; YU, L.; BREWER, C.; COLLINS, J.A.; MOLHUIZEN, H.O.; LOUBSER, O.; OUELETTE, B.F.; FICHTER, K.; ASHBOURNE-EXCOFFON, K.J.; SENSEN, C.W.; SCHERER, S.; MOTT, S.; DENIS, M.; MARTINDALE, D.; FROHLICH, J.; MORGAN, K.; KOOP, B.; PIMSTONE, S.; KASTELEIN, J.J.; GENEST, J.JR.; HAYDEN, M.R. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. **Nat Genet.**, v.22, p.336-45, 1999.

BROPHY, V.H.; JAMPSA, R.L.; CLENDENNING, J.B.; MCKINSTRY, L.A.; JARVIK, G.P.; FURLONG, C.E. Effects of 5' regulatory-region polymorphisms on paraoxonase-gene (PON1) expression. **Am J Hum Genet.**, v.68, p.1428-36, 2001.

BROWN, M.S.; GOLDSTEIN, J.L. Lipoprotein receptors in the liver. Control signals for plasma holesterol traffic. **J Clin Invest.**, v.3, p.743-7, 1983.

CASCORBI, I.; LAULE, M.; MROZIKIEWICZ, P.M.; MROZIKIEWICZ, A.; ANDEL, C.; BAUMANN, G.; ROOTS, I.; STANGL, K. Mutations in the human paraoxonase 1 gene: frequencies, allelic linkages, and association with coronary artery disease. **Pharmacogenetics**, v.9, p.755-61, 1999.

CASTELLI, W.P. Lipids, risk factors and ischaemic heart disease. **Atherosclerosis**, v.124, supl.S, p.1-9, 1996.

CASTELLI, W.P.; ANDERSON, K. A population at risk. Prevalence of high cholesterol levels in hypertensive patients in the Framingham Study. **Am J Med.**, v.80, p.23-32,1986.

CAVALLI, S.A.; HIRATA, M.H.; SALAZAR, L.A.; DIAMENT, J.; FORTI, N.; GIANNINI, S.D.; NAKANDAKARE, E.R.; BERTOLAMI, M.C.; HIRATA, R.D. Apolipoprotein B gene polymorphisms: prevalence and impact on serum lipid concentrations in hypercholesterolemic individuals from Brazil. **Clin Chim Acta**, v.1-2, p.189-203, 2000.

CHEN, Q.; REIS, S.E.; KAMMERER, C.M.; MCNAMARA, D.M.; HOLUBKOV, R.; SHARAF, B.L.; SOPKO, G.; PAULY, D.F.; MERZ, C.N.; KAMBOH, M.I.; WISE STUDY GROUP. 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.**, v.72, p.13-22, 2003

DAVIES, H.G.; RICHTER, R.J.; KEIFER, M.; BROOMFIELD, C.A.; SOWALLA, J.; FURLONG, C.E. The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin. **Nat Genet.**, v.14, p.334-6, 1996.

DRAGANOV, D.I.; STETSON, P.L.; WATSON, C.E.; BILLECKE, S.S.; LA DU, B.N. Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation. **J Biol Chem.**, v.43, p.33435-42, 2000.

DURRINGTON, P.N.; MACKNESS, B.; MACKNESS, M.I. Paraoxonase and atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v.4, p.473-80, 2001.

DUVERGER, N.; KRUTH, H.; EMMANUEL, F.; CAILLAUD, J.M.; VIGLIETTA, C.; CASTRO, G.; TAILLEUX, A.; FIEVET, C.; FRUCHART, J.C.; HOUDEBINE, L.M.; DENEFLE, P. Inhibition of atherosclerosis development in cholesterol-fed human apolipoprotein A-I-transgenic rabbits. **Circulation**, v.94, p.713-7, 1996.

FERRE, N.; TOUS, M.; PAUL, A.; ZAMORA, A.; VENDRELL, J.J.; BARDAJI, A.; CAMPS, J.; RICHART, C.; JOVEN, J. Paraoxonase Gln-Arg(192) and Leu-Met(55) gene polymorphisms and enzyme activity in a population with a low rate of coronary heart disease. **Clin Biochem.**, v.35, p.197-203, 2002.

FIELDING, C,J.; FIELDING, P.E. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. **J Lipid Res.**, v.36, p.211-28, 1995.

FORTI, N.; SALAZAR, L.A.; DIAMENT, J.; GIANNINI, S.D.; HIRATA, M.H.; HIRATA, R.D. Genetic changes and cholesterolemia: new Brazilian studies. **Arq Bras Cardiol.**, v.5, p.565-71, 2003.

FORTUNATO G, RUBBA P, PANICO S, TRONO D, TINTO N, MAZZACCARA C, DE MICHELE M, IANNUZZI A, VITALE DF, SALVATORE F, SACCHETTI L. A paraoxonase gene polymorphism, PON 1 (55), as an independent risk factor for increased carotid intima-media thickness in middle-aged women. **Atherosclerosis**, v.167, p.141-8, 2003.

FOSSATI, P.; PRINCIPE, L. Serum triglicerides determined colorymetrically with an enzime of low-density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge. **Clin. Chem.**, v.28. p.2077-2080, 1982.

FOSSATI. P.; MEDICCI, R. Abstract Book. **International Symposium on Cholesterol Control and Cardiovascular Diseases: Prevention and Therapy**. Milan, Italy. Apud: Bayer Corporation, Diagnostic Division, Tarrytown, N.Y; Cholesterol-Fast Color [Bula], 1987.

FRIEDEWALD, W.T.; LEVY, R.I.; FREDRICKSON, D.S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clin. Chem.**, v.18. p.499-502, 1972.

FURLONG, C.E,; COLE, T.B.; JARVIK, G.P.; COSTA, L.G. Pharmacogenomic considerations of the paraoxonase polymorphisms. **Pharmacogenomics**, v.3, p.341-8, 2002.

FURLONG, C.E.; RICHTER, R.J.; SEIDELM S.L.; COSTA, L.G.; MOTULSKY, A.G. Spectrophotometric assays for the enzymatic hydrolysis of the active metabolites of chlorpyrifos and parathion by plasma paraoxonase/arylesterase. **Anal Biochem**, v.180, p.242-7, 1989.

FUSTER, V. Mechanisms leading to myocardial infarction: insights from studies of vascular biology. **Circulation**, v.4, p.2126-46, 1994.

GARDEMANN, A.; PHILIPP, M.; HESS, K.; KATZ, N.; TILLMANNS, H.; HABERBOSCH, W. The paraoxonase Leu-Met54 and Gln-Arg191 gene polymorphisms are not associated with the risk of coronary heart disease. **Atherosclerosis**, v.152, p.421-31, 2000.

GARIN, M.C.; JAMES, R.W.; DUSSOIX, P.; BLANCHE, H.; PASSA, P.; FROGUEL, P.; RUIZ, J. Paraoxonase polymorphism Met-Leu54 is associated with modified serum concentrations of the enzyme. A possible link between the paraoxonase gene and increased risk of cardiovascular disease in diabetes. **J Clin Invest.**, v.99, p.62-6, 1997.

GERRITY, R.G. The role of the monocyte in atherogenesis: II. Migration of foam cells from atherosclerotic lesions. **Am J Pathol.**, v.2, p.191-200, 1981.

GIBBONS, G.H.; LIEW, C.C.; GOODARZI, M.O.; ROTTER, J.I.; HSUEH, W.A.; SIRAGY, H.M.; PRATT, R.; DZAU, V.J. Genetic markers: progress and potential for cardiovascular disease. **Circulation**, v.109, p.47-58, 2004.

GOLDSTEIN, J.L.; HO, Y.K.; BASU, S.K.; BROWN, M.S. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.76, p.333-7, 1979.

GORDON, D.J.; PROBSTFIELD, J.L.; GARRISON, R.J.; NEATON, J.D.; CASTELLI, W.P.; KNOKE, J.D.; JACOBS, D.R,JR.; BANGDIWALA, S.; TYROLER, H.A. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. **Circulation**, v.79, p.8-15, 1989.

GORDON, D.J.; RIFKIND, B.M. High-density lipoprotein--the clinical implications of recent studies. **N Engl J Med.**, v.321, p.311-6, 1989.

GRAY, I.C.; CAMPBELL, D.A.; SPURR, N.K. Single nucleotide polymorphisms as tools in human genetics. **Hum Mol Genet.**, v.9, p.2403-8, 2000.

HAREL M; AHARONI A; GAIDUKOV L; BRUMSHTEIN B; KHERSONSKY O; MEGED R; DVIR H; RAVELLI R B G; MCCARTHY A; TOKER L; SILMAN I; SUSSMAN JL; TAWFIK DS. Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. **Nature Structural & Molecular Biology**, v.11, p.412-419, 2004.

HASSETT, C.; RICHTER, R.J.; HUMBERT, R.; CHAPLINE, C.; CRABB, J.W.; OMIECINSKI, C.J.; FURLONG, C.E. Characterization of cDNA clones encoding rabbit and human serum paraoxonase: the mature protein retains its signal sequence. **Biochemistry**, v.42, p.10141-9, 1991.

HEGELE RA; BRUNT JH; CONNELLY PW. A polymorphism of the paraoxonase gene associated with variation in plasma lipoproteins in a genetic isolate. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v.15, p.89-95, 1995.

HEGELE, R.A. Paraoxonase genes and disease. **Ann Med.**, v.31, p.217-24, 1999.

HEGELE, R.A.; CONNELLY, P.W.; SCHERER, S.W.; HANLEY, A.J.; HARRIS, S.B.; TSUI, L.C.; ZINMAN, B. Paraoxonase-2 gene (PON2) G148 variant associated with elevated fasting plasma glucose in noninsulin-dependent diabetes mellitus. **J Clin Endocrinol Metab.**, v.82, p.3373-7, 1997.

HEGELE, R.A.; HARRIS, S.B.; CONNELLY, P.W.; HANLEY, A.J.; TSUI, L.C.; ZINMAN, B.; SCHERER, S.W. Genetic variation in paraoxonase-2 is associated with variation in plasma lipoproteins in Canadian Oji-Cree. **Clin Genet.**, v.54, p.394-9, 1998.

HEIJMANS, BT.; WESTENDORP, R.G.; LAGAAY, A.M.; KNOOK, D.L.; KLUFT, C.; SLAGBOOM, P.E. Common paraoxonase gene variants, mortality risk and fatal cardiovascular events in elderly subjects. **Atherosclerosis**, v.149, p.91-7, 2000.

HEINECKE, J.W.; LUSIS, A.J. Paraoxonase-gene polymorphisms associated with coronary heart disease: support for the oxidative damage hypothesis? **Am J Hum Genet.**, v.62, p.20-4, 1998.

HERRMANN, S.M.; BLANC, H.; POIRIER, O.; ARVEILER, D.; LUC, G.; EVANS, A.; MARQUES-VIDAL, P.; BARD, J.M.; CAMBIEN, F. The Gln/Arg polymorphism of

human paraoxonase (PON 192) is not related to myocardial infarction in the ECTIM Study. **Atherosclerosis**, v.126, p.299-303, 1996.

HESSLER, J.R.; ROBERTSON, A.L.JR.; CHISOLM, G.M.3RD. LDL-induced cytotoxicity and its inhibition by HDL in human vascular smooth muscle and endothelial cells in culture. **Atherosclerosis**, v.32, p.213-29, 1979.

HONG, S.H.; SONG, J.; MIN, W.K.; KIM, J.Q. Genetic variations of the paraoxonase gene in patients with coronary artery disease. **Clin Biochem.**, v.34, p.475-81, 2001.

HUMBERT, R.; ADLER, D.A.; DISTECHE, C.M.; HASSETT, C.; OMIECINSKI, C.J.; FURLONG, C.E. The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. **Nat Genet.**, v.1, p.73-6, 1993.

IMAI Y; MORITA H; KURIHARA H; SUGIYAMA T; KATO N; EBIHARA A; HAMADA C; KURIHARA Y; SHINDO T; OH-HASHI Y; YAZAKI Y. Evidence for association between paraoxonase gene polymorphisms and atherosclerotic diseases.**Atherosclerosis**, v. 149, p. 435-42. 2000

KAKUYAMA, T.; KIMURA, S.; HASIGUCHI, Y. Fully automated determination of HDL-cholesterol from human serum with Hitachi 911. **Clin. Chem.**, Baltimore, v.40, p.A1104. [Abstract], 1994.

KANNEL, W.B. The Framingham Study: ITS 50-year legacy and future promise. **J Atheroscler Thromb.**, v.6, p.60-6, 2000.

KO, YL.; KO, YS.; WANG, S.M.; HSU, L.A.; CHANG, C.J.; CHU, P.H.; CHENG, N.J.; CHEN, W.J.; CHIANG, C.W.; LEE, Y.S. The Gln-Arg 191 polymorphism of the human paraoxonase gene is not associated with the risk of coronary artery disease among Chinese in Taiwan. **Atherosclerosis**, v.141, p.259-64, 1998.

LETELLIER, C.; DUROU, M.R.; JOUANOLLE, A.M.; LE GALL, J.Y.; POIRIER, J.Y.; RUELLAND, A. Serum paraoxonase activity and paraoxonase gene polymorphism in type 2 diabetic patients with or without vascular complications. **Diabetes Metab.**, v.28, p.297-304, 2002.

LEUS FR; ZWART M; KASTELEIN JJ; VOORBIJ HA. PON2 gene variants are associated with clinical manifestations of cardiovascular disease in familial hypercholesterolemia patients.**Atherosclerosis**, v. 154, p. 641-9, 2001

LEVIEV I; DEAKIN S; JAMES RW. Decreased stability of the M54 isoform of paraoxonase as a contributory factor to variations in human serum paraoxonase concentrations.**J Lipid Res**, v. 42, p. 528-35, 2001

LEVIEV I; NEGRO F; JAMES RW. Two alleles of the human paraoxonase gene produce different amounts of mRNA. An explanation for differences in serum concentrations of paraoxonase associated with the (Leu-Met54) polymorphism.**Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 17, p. 2935-9, 1997

LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, v.420, p.868-874, 2002.

LINSEL-NITSCHKE, P.; TALL, A.R. HDL as a target in the treatment of atherosclerotic cardiovascular disease. **Nat Rev Drug Discov.**, v.3, p.193-205, 2005.

LIU, A.C.; LAWN, R.M.; VERSTUYFT, J.G.; RUBIN, E.M. Human apolipoprotein A-I prevents atherosclerosis associated with apolipoprotein[a] in transgenic mice. **J Lipid Res.**, v.34, p.2263-7, 1994.

LUND-KATZ, S.; LIU, L.; THUAHNAI, S.T.; PHILLIPS, M.C. High density lipoprotein structure. **Front Biosci.**, v.8, p.1044-54, 2003.

MACKNESS, B.; DAVIES, G.K.; TURKIE, W.; LEE, E.; ROBERTS, D.H.; HILL, E.; ROBERTS, C.; DURRINGTON, P.N.; MACKNESS, M.I. Paraoxonase status in coronary heart disease: are activity and concentration more important than genotype? **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v.21, p.1451-7, 2001.

MACKNESS, B.; DURRINGTON, P.; MCELDUFF, P.; YARNELL, J.; AZAM, N.; WATT, M.; MACKNESS, M. Low paraoxonase activity predicts coronary events in the Caerphilly Prospective Study. **Circulation**, v.107, p.2775-9, 2003.

MACKNESS, B.; MACKNESS, M.I.; ARROL, S.; TURKIE, W.; DURRINGTON, P.N. Effect of the molecular polymorphisms of human paraoxonase (PON1) on the rate of hydrolysis of paraoxon. **Br J Pharmacol**, v.122, p.265-8, 1997.

MACKNESS, M.I.; ABBOTT, C.; ARROL, S.; DURRINGTON, P.N. The role of high-density lipoprotein and lipid-soluble antioxidant vitamins in inhibiting low-density lipoprotein oxidation. **Biochem J.**, v.294, p.829-34, 1993a.

MACKNESS, B.; DURRINGTON, P.N.; MACKNESS, M.I. Human serum paraoxonase. **Gen Pharmacol.**, v.31, p.329-36, 1998.

MACKNESS, B.; DURRINGTON, P.N.; MACKNESS, M.I. Lack of protection against oxidative modification of LDL by avian HDL. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.247, p.443-6, 1998.

MACKNESS, B.; DURRINGTON, P.N.; MACKNESS, M.I. Polymorphisms of paraoxonase genes and low-density lipoprotein lipid peroxidation. **Lancet**, v.353, p.468-9, 1999.

MACKNESS, M.; BOULLIER, A.; HENNUYER, N.; MACKNESS, B.; HALL, M.; TAILLEUX, A.; DURIEZ, P.; DELFLY, B.; DURRINGTON, P.; FRUCHART, JC.; DUVERGER, N.; CAILLAUD, JM.; CASTRO, G. Paraoxonase activity is reduced by a pro-atherosclerotic diet in rabbits. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.269, p.232-6, 2000.

MACKNESS, M.I. 'A'-esterases. Enzymes looking for a role? **Biochem Pharmacol.**, v.3, p.385-90, 1989.

MACKNESS, M.I.; ARROL, S.; ABBOTT, C.; DURRINGTON, P.N. Protection of low-density lipoprotein against oxidative odification by high-density lipoprotein associated paraoxonase. **Atherosclerosis**, v.104, p.129-35, 1993b.

MACKNESS, M.I.; ARROL, S.; DURRINGTON, P.N. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. **FEBS Lett.**, v.1-2, p.152-4, 1991.

MAIER, J.A.; BARENGHI, L.; PAGANI, F.; BRADAMANTE, S.; COMI, P.; RAGNOTTI, G. The protective role of high-density lipoprotein on oxidized-low-density-lipoprotein-induced U937/endothelial cell interactions. **Eur J Biochem.**, v.221, p.35-41, 1994.

MALIN, R.; JARVINEN, O.; SISTO, T.; KOIVULA, T.; LEHTIMAKI, T. Paraoxonase producing PON1 gene M/L55 polymorphism is related to autopsy-verified artery-wall atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v.157, p.301-7, 2001a.

MALIN, R.; LAINE, S.; RANTALAIHO, V.; WIRTA, O.; PASTERNACK, A.; JOKELA, H.; ALHO, H.; KOIVULA, T.; LEHTIMAKI, T. Lipid peroxidation is increased in paraoxonase L55 homozygotes compared with M-allele carriers. **Free Radic Res**, v.34, p.477-84, 2001b.

MALIN, R.; LOIMAALA, A.; NENONEN, A.; MERCURI, M.; VUORI, I.; PASANEN, M.; OJA, P.; BOND, G.; KOIVULA, T.; LEHTIMAKI, T. Relationship between high-density lipoprotein paraoxonase gene M/L55 polymorphism and carotid atherosclerosis differs in smoking and nonsmoking men. **Metabolism**, v.50, p.1095-101, 2001c.

MANSUR, A.P.; FAVARATO, D.; SOUZA, M.F.; AVAKIAN, S.D.; ALDRIGHI, J.M.; CESAR, L.A.; RAMIRES, J.A.. Trends in death from circulatory diseases in Brazil between 1979 and 1996. **Arq. Bras. Cardiol.**,v.76, p.497-510, 2001.

MARTINELLI, N.; GIRELLI, D.; OLIVIERI, O.; STRANIERI, C.; TRABETTI, E.; PIZZOLO, F.; FRISO, S.; TENUTI, I.; CHENG, S.; GROW, M.A.; PIGNATTI, P.F.; CORROCHER, R. Interaction between smoking and PON2 Ser311Cys polymorphism as a determinant of the risk of myocardial infarction. **Eur J Clin Invest.**, v.34, p.14-20, 2004.

MENOTTI, A.; LANTI, M.; PUDDU, P.E.; KROMHOUT D. Coronary heart disease incidence in northern and southern, European populations: a reanalysis of the seven countries study for a European coronary risk chart. **Heart**, V.3, P.238-44, 2000.

MERKEL, M.; ECKEL, R.H.; GOLDBERG, I.J. Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation. **J Lipid Res.**, v.43, p.1997-2006, 2002.

MILLER, G.J.; MILLER, N.E. Plasma-high-density-lipoprotein concentration and development of ischaemic heart-disease. **Lancet**, v.1, p.16-9, 1975.

MILLER, N.E. The evidence for the antiatherogenicity of high density lipoprotein in man. **Lipids**, v. 13, p. 914-9, 1978.

MIYAZAKI, A.; SAKUMA, S.; MORIKAWA, W.; TAKIUE, T.; MIAKE, F.; TERANO, T.; SAKAI, M.; HAKAMATA, H.; SAKAMOTO, Y.; NATIO, M.; ET AL. Intravenous injection of rabbit apolipoprotein A-I inhibits the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v.15, p.1882-8, 1995.

MORTALITY rates after 10.5 years for participants in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. Findings related to a priori hypotheses of the trial. The Multiple Risk Factor Intervention Trial Research Group. **JAMA**, v.13, p.1795-801, 1990.

NAVAB, M.; ANANTHRAMAIAH, G.M.; REDDY, S,T.; VAN LENTEN, B.J.; ANSELL, B.J.; FONAROW, G.C.; VAHABZADEH, K.; HAMA, S.; HOUGH, G.; KAMRANPOUR, N.; BERLINER, J.A.; LUSIS, A.J.; FOGELMAN, A.M. The oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL. **J Lipid Res.**, v.45, p.993-1007, 2004.

NAVAB, M.; BERLINER, J.A.; SUBBANAGOUNDER, G.; HAMA, S.; LUSIS, A.J.; CASTELLANI, L.W.; REDDY, S.; SHIH, D.; SHI, W.; WATSON, A.D.; VAN LENTEN, B.J.; VORA, D.; FOGELMAN, A.M. HDL and the inflammatory response induced by LDL-derived oxidized phospholipids. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v.21, p.481-8, 2001.

NAVAB, M.; BERLINER, J.A.; WATSON, A.D.; HAMA, S.Y.; TERRITO, M.C.; LUSIS, A.J.; SHIH, D.M.; VAN LENTEN, B.J.; FRANK, J.S.; DEMER, L.L.; EDWARDS, P.A.; FOGELMAN, A.M. The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v.16, p.831-42, 1996.

NAVAB, M.; HAMA, S.Y.; ANANTHARAMAIAH, G,M.; HASSAN, K.; HOUGH, G.P.; WATSON, A.D.; REDDY, S.T.; SEVANIAN, A.; FONAROW, G.C.; FOGELMAN, A.M. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: steps 2 and 3. **J Lipid Res.**, v.41, p.1495-508, 2000a.

NAVAB, M.; HAMA, S.Y.; COOKE, C.J.; ANANTHARAMAIAH, G.M.; CHADDHA, M.; JIN, L.; SUBBANAGOUNDER, G.; FAULL, K.F.; REDDY, S.T.; MILLER, N.E.; FOGELMAN, A.M. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: step 1. **J Lipid Res.**, v.41, p.1481-94, 2000b.

NAVAB, M.; IMES, S.S.; HAMA, S.Y.; HOUGH, G.P.; ROSS, L.A.; BORK, R.W.; VALENTE, A.J.; BERLINER, J.A.; DRINKWATER, D.C.; LAKS, H.; ET AL. Monocyte transmigration induced by modification of low density lipoprotein in cocultures of human aortic wall cells is due to induction of monocyte chemotactic protein 1 synthesis and is abolished by high density lipoprotein. **J Clin Invest.**, v.6, p.2039-46, 1991.

NG, C.J.; WADLEIGH, D.J.; GANGOPADHYAY, A.; HAMA, S.; GRIJALVA, V.R.; NAVAB, M.; FOGELMAN, A.M.; REDDY, S.T. 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.**, v.48, p.44444-9, 2001.

ODAWARA, M.; TACHI, Y.; YAMASHITA, K. Paraoxonase polymorphism (Gln192-Arg) is associated with coronary heart disease in Japanese noninsulin-dependent diabetes mellitus. **J Clin Endocrinol Metab.**, v.7, p.2257-60, 1997.

OLSON, R.E. Discovery of the lipoproteins, their role in fat transport and their significance as risk factors. **J Nutr.**, v.128, supl.2, p.439S-443S, 1998.

OMBRES, D.; PANNITTERI, G.; MONTALI, A.; CANDELORO, A.; SECCARECCIA, F.; CAMPAGNA, F.; CANTINI, R.; CAMPA, P.P.; RICCI, G.; ARCA, M. The gln-Arg192 polymorphism of human paraoxonase gene is not associated with coronary artery disease in italian patients. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v.18, p.1611-6, 1998.

PAI, J.K.; PISCHON, T.; MA, J.; MANSON, J.E.; HANKINSON, S.E.; JOSHIPURA, K.; CURHAN, G.C.; RIFAI, N.; CANNUSCIO, C.C.; STAMPFER, M.J.; RIMM, E.B. Inflammatory markers and the risk of coronary heart disease in men and women. **N Engl J Med.**, v.25, p.2599-610, 2004.

PAPAS, A.M. Determinants of antioxidant status in humans. **Lipids**, v.31, supl.S, p.77-82, 1996.

PARSONS, B.L.; HEFLICH, R.H. Genotypic selection methods for the direct analysis of point mutations. **Mutat Res.**, v.387, p.97-121, 1997.

PARTHASARATHY, S.; BARNETT, J.; FONG, L.G. High-density lipoprotein inhibits the oxidative modification of low-density lipoprotein. **Biochim Biophys Acta**, v.1044, p.275-83, 1990.

PASZTY, C.; MAEDA, N.; VERSTUYFT, J.; RUBIN, E.M. Apolipoprotein AI transgene corrects apolipoprotein E deficiency-induced atherosclerosis in mice. **J Clin Invest.**, v.94, p.899-903, 1994.

PEPINE, C.J. The effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on endothelial dysfunction: potential role in myocardial ischemia. **Am. J. Cardiol.**, v.82, p.23S-27S, 1998.

PEREIRA, A.C.; KRIEGER, J.E. Biologia e genética molecular aplicadas ao diagnótico e tratamento da hipertensão: novos paradigmas, antigos problemas. **Rev. Bras. Hipertens.**, v.8, p.105-13, 2001.

PFOHL M; KOCH M; ENDERLE MD; KUHN R; FULLHASE J; KARSCH KR; HARING HU. Paraoxonase 192 Gln/Arg gene polymorphism, coronary artery disease, and myocardial infarction in type 2 diabetes. **Diabetes**, v.48, p.623-7, 1999.

PLUMP, A.S.; SCOTT, C.J.; BRESLOW, J.L. Human apolipoprotein A-I gene expression increases high density lipoprotein and suppresses atherosclerosis in the apolipoprotein E-deficient mouse. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v.91, p.9607-11, 1994.

PRIMO-PARMO; S.L.; SORENSON; R.C.; TEIBER; J.; LA DU; B.N. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. **Genomics**, v.3, p.498-507, 1996.

REDDY, S.T.; WADLEIGH, D.J.; GRIJALVA, V.; NG, C.; HAMA, S.; GANGOPADHYAY, A.; SHIH, D.M.; LUSIS, A.J.; NAVAB, M.; FOGELMAN, A.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.**, v.4, p.542-7, 2001.

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

RICE, G.I.; OSSEI-GERNING, N.; STICKLAND, M.H.; GRANT, P.J. The paraoxonase Gln-Arg 192 polymorphism in subjects with ischaemic heart disease. **Coron Artery Dis.**, v.8, p.677-82, 1997.

RIFAI, N.; BACHORIK, P.S.; ALBERS, J.J. Lipids, lipoproteins, and apolipoproteins. In: BURTIS, C.A., ASHWOOD, E.R., eds. Tietz textbook of clinical chemistry, 3.ed. Philadelphia: W.B. Saunder, 1999:809-861.

RIFAI, N.; KING, M.E. Immunoturbidimetric assays of apolipoproteins A, AI, AII, and B in serum. **Clin. Chem.**, v.32, n.6, p.957-961, 1986.

ROBERTSON, K.S.; HAWE, E.; MILLER, G.J.; TALMUD, P.J.; HUMPHRIES, S.E; NORTHWICK PARK HEART STUDY II. Human paraoxonase gene cluster polymorphisms as predictors of coronary heart disease risk in the prospective Northwick Park Heart Study II. **Biochim Biophys Acta**, v.1639, p.203-12, 2003.

ROSS, R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. **N. Engl. J. Med.**, v.340, p.115-26, 1999.

ROSS, R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. **Nature**, v.362, p.801-9, 1993.

RUBIN, E.M.; KRAUSS, R.M.; SPANGLER, E.A.; VERSTUYFT, J.G.; CLIFT, S.M. Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein AI. **Nature**, v.353, p.265-7, 1991.

RUBINS, H.B.; ROBINS, S.J.; COLLINS, D.; FYE, C.L.; ANDERSON, J.W.; ELAM, M.B.; FAAS, F.H.; LINARES, E.; SCHAEFER, E.J.; SCHECTMAN, G.; WILT, T.J.; WITTES, J. Gemfibrozil for the secondary prevention of coronary heart disease in men with low levels of high-density lipoprotein cholesterol. Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Cholesterol Intervention Trial Study Group. **N Engl J Med.**, v.341, p.410-8, 1999.

RUST, S.; ROSIER, M.; FUNKE, H.; REAL, J.; AMOURA, Z.; PIETTE, J.C.; DELEUZE, J.F.; BREWER, H.B.; DUVERGER, N.; DENEFLE, P.; ASSMANN, G. Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. **Nat Genet.**, v.22, p.352-5, 1999.

RYE, K.A.; CLAY, M.A.; BARTER, P.J. Remodelling of high density lipoproteins by plasma factors. **Atherosclerosis**, v145, p.227-38, 1999.

SALAZAR, L.A.; HIRATA, M.H.; CAVALLI, S.A.; MACHADO, M.O.; HIRATA, R.D.C. Optimized procedure for DNA isolation from fresh and criopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. **Clin. Chem.**, v.44, p.1748-1750, 1998.

SALAZAR, L.A.; CAVALLI, S.A.; HIRATA, M.H.; DIAMENT, J.; FORTI, N.; GIANNINI, S.D.; NAKANDAKARE, E.R.; BERTOLAMI, M.C.; HIRATA, R.D. Polymorphisms of the low-density lipoprotein receptor gene in Brazilian individuals with heterozygous familial hypercholesterolemia. **Braz J Med Biol Res.**, v.11, p.1301-4, 2000b.

SALAZAR, L.A.; HIRATA, M.H.; CAVALLI, S.A.; NAKANDAKARE, E.R.; FORTI, N.; DIAMENT, J.; GIANNINI, S.D.; BERTOLAMI, M.C.; HIRATA, R.D. Molecular basis

of familial hypercholesterolemia in Brazil: Identification of seven novel LDLR gene mutations. **Hum Mutat.**, v.4, p.462-3, 2002.

SALAZAR, L.A.; HIRATA, M.H.; FORTI, N.; DIAMENT, J.; GIANNINI, S.D.; ISSA, J.S.; HIRATA, R.D. Pvu II intron 15 polymorphism at the LDL receptor gene is associated with differences in serum lipid concentrations in subjects with low and high risk for coronary artery disease from Brazil. **Clin Chim Acta**, v.1-2, p.75-88, 2000a.

SALONEN, J.T.; MALIN, R.; TUOMAINEN, T.P.; NYYSSONEN, K.; LAKKA, T.A.; LEHTIMAKI, T. Polymorphism in high density lipoprotein paraoxonase gene and risk of acute myocardial infarction in men: prospective nested case-control study. **BMJ.**, v.319, p.487-9, 1999.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.R.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2.ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. P.E10-E14.

SANGHERA, D.K.; ASTON, C.E.; SAHA, N.; KAMBOH, M.I. DNA polymorphisms in two paraoxonase genes (PON1 and PON2) are associated with the risk of coronary heart disease. **Am J Hum Genet.**, v.1, p.36-44, 1998.

SANGHERA, D.K.; SAHA, N.; ASTON, C.E.; KAMBOH, M.I. Genetic polymorphism of paraoxonase and the risk of coronary heart disease. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v.17, p.1067-73, 1997.

SANGHERA, D.K.; SAHA, N.; KAMBOH, M.I. The codon 55 polymorphism in the paraoxonase 1 gene is not associated with the risk of coronary heart disease in Asian Indians and Chinese. **Atherosclerosis**, v.136, p.217-23, 1998.

SANTOS, R.D; GIANNINI, S.D.; FONSECA, F.A.H. III Diretrizes Brasileiras Sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq. Bras. Cardiol.**, v.77, supl.3, p.1-48, 2001.

SCHMIDT H; SCHMIDT R; NIEDERKORN K; GRADERT A; SCHUMACHER M; WATZINGER N; HARTUNG HP; KOSTNER GM Paraoxonase PON1 polymorphism leu-Met54 is associated with carotid atherosclerosis: results of the Austrian Stroke Prevention Study. **Stroke**, v.29, p.2043-8, 1998.

SCHMIDT, R.; SCHMIDT, H.; FAZEKAS, F.; KAPELLER, P.; ROOB, G.; LECHNER, A.; KOSTNER, G.M.; HARTUNG, H.P. MRI cerebral white matter lesions and paraoxonase PON1 polymorphisms: three-year follow-up of the austrian stroke prevention study. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v.20, p.1811-6, 2000.

SEN-BANERJEE, S.; SILES, X.; CAMPOS, H. Tobacco smoking modifies association between Gln-Arg192 polymorphism of human paraoxonase gene and risk of myocardial infarction. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v.20, p.2120-6, 2000.

SENTI, M.; TOMAS, M.; VILA, J.; MARRUGAT, J.; ELOSUA, R.; SALA, J.; MASIA, R. Relationship of age-related myocardial infarction risk and Gln/Arg 192 variants of the human paraoxonase1 gene: the REGICOR study. **Atherosclerosis**, v.156, p.443-9, 2001.

SERRATO, M.; MARIAN, A.J. A variant of human paraoxonase/arylesterase (HUMPONA) gene is a risk factor for coronary artery disease. **J Clin Invest.**, v.96, p.3005-8, 1995.

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**, v. 120, p. 201-4, 2004

SHIH, D.M.; GU, L.; XIA, Y.R.; NAVAB, M.; LI, W.F.; HAMA, S.; CASTELLANI, L.W.; FURLONG, C.E.; COSTA, L.G.; FOGELMAN, A.M.; LUSIS, A.J. Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. **Nature**, v.6690, p.284-7, 1998.

SORENSON, R.C.; BISGAIER, C.L.; AVIRAM, M.; HSU, C.; BILLECKE, S.; LA DU, B.N. 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.**, v.9, p.2214-25, 1999.

STAMLER, J.; WENTWORTH, D.; NEATON, J.D. Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? Findings in 356,222 primary screenees of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). **JAMA**, v.256, p.2823-8, 1986.

STEINBERG, D. The cholesterol controversy is over. Why did it take so long? **Circulation**, v.80, p.1070-8, 1989.

STEINBRECHER, U.P. Receptors for oxidized low density lipoprotein. **Biochim Biophys Acta**, v.3, p.279-98, 1999.

SUEHIRO, T.; NAKAUCHI, Y.; YAMAMOTO, M.; ARII, K.; ITOH, H.; HAMASHIGE, N.; HASHIMOTO, K. Paraoxonase gene polymorphism in Japanese subjects with coronary heart disease. **Int J Cardiol.**, v.57, p.69-73, 1996.

SUNDSTROM, J.; SULLIVAN, L.; SELHUB, J.; BENJAMIN, E.J.; D'AGOSTINO, R.B.; JACQUES, P.F.; ROSENBERG, I.H.; LEVY, D.; WILSON, P.W.; VASAN, R.S.; FRAMINGHAM HEART STUDY. Relations of plasma homocysteine to left ventricular structure and function: the Framingham Heart Study. **Eur Heart J.**, v.6, p.523-30, 2004.

TURBAN, S.; FUENTES, F.; FERLIC, L.; BRUGADA, R.; GOTTO, A.M.; BALLANTYNE, C.M.; MARIAN, A.J. A prospective study of paraoxonase gene Q/R192 polymorphism and severity, progression and regression of coronary atherosclerosis, plasma lipid levels, clinical events and response to fluvastatin. **Atherosclerosis**, v.154, p.633-40, 2001.

VOETSCH, B.; BENKE, K.S.; DAMASCENO, B.P.; SIQUEIRA, L.H.; LOSCALZO, J. Paraoxonase 192 Gln-->Arg polymorphism: an independent risk factor for nonfatal arterial ischemic stroke among young adults. **Stroke**, v.33, p.1459-64, 2002.

WANG, N.; LAN, D.; CHEN, W.; MATSUURA, F.; TALL, A.R. ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v.101, p.9774-9, 2004.

WANG, X.; FAN, Z.; HUANG, J.; SU, S.; YU, Q.; ZHAO, J.; HUI, R.; YAO, Z.; SHEN, Y.; QIANG, B.; GU, D. Extensive association analysis between polymorphisms of PON gene cluster with coronary heart disease in Chinese Han population. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v.23, p.328-34, 2003.

WATSON, A.D.; BERLINER, J.A.; HAMA, S.Y.; LA DU, B.N.; FAULL, K.F.; FOGELMAN, A.M.; NAVAB, M. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. **J Clin Invest.**, v.96, p.2882-91, 1995.

WHEELER, J.G.; KEAVNEY, B.D.; WATKINS, H.; COLLINS, R.; DANESH, J. Four paraoxonase gene polymorphisms in 11212 cases of coronary heart disease and 12786 controls: meta-analysis of 43 studies. **Lancet**, v.363, p.689-95, 2004.

WITZTUM, J.L.; STEINBERG, D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. **J Clin Invest.**, v.88, p.1785-92, 1991.

YAMADA, Y.; IZAWA, H.; ICHIHARA, S.; TAKATSU, F.; ISHIHARA, H.; HIRAYAMA, H.; SONE, T.; TANAKA, M.; YOKOTA, M. Prediction of the risk of myocardial infarction from polymorphisms in candidate genes. **N Engl J Med.**, v.347, p.1916-23, 2002.

ZAMA, T.; MURATA, M.; MATSUBARA, Y.; KAWANO, K.; AOKI, N.; YOSHINO, H.; WATANABE, G.; ISHIKAWA, K.; IKEDA, Y. A 192Arg variant of the human paraoxonase (HUMPONA) gene polymorphism is associated with an increased risk for coronary artery disease in the Japanese. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v.17, p.3565-9, 1997.

Anexos

Anexo 1 - Características dos genótipos, dados biodemográficos, dados clínicos e concentrações séricas dos parâmetros bioquímicos dos indivíduos do grupo controle (GC n =105).

Nº	ID	*L55M*	*R192Q*	*S311C*	S	IDD	HAS	DM	TAB.	CT	TG	LDL-C	VLDL-C	HDL-C	apoA-I	apoB
1	**R1**	MM	QQ	SS	M	35	N	N	N	172	58	114	12	46	110	57
2	**R2**	LM	RR	SC	F	17	N	N	S	151	63	78	13	60	142	58
3	**R4**	LL	RR	SC	M	36	N	N	N	190	108	128	22	40	116	98
4	**R5**	LM	RR	SS	M	37	N	N	S	211	93	137	19	55	160	91
5	**R6**	LM	QQ	SS	M	45	N	N	N	144	48	95	10	39	112	81
6	**R8**	LM	QQ	SS	M	40	N	N	N	149	99	84	20	45	148	64
7	**R10**	LM	QQ	SS	M	38	N	N	N	216	97	142	19	55	145	96
8	**R11**	LM	QQ	SS	M	39	N	N	N	197	130	111	92	26	111	92
9	**R12**	LL	RR	SC	M	34	N	N	N	176	86	93	17	66	147	77
10	**R13**	LL	RR	CC	M	49	N	N	N	213	209	139	42	32	127	107
11	**R14**	LM	QQ	SC	M	52	N	N	N	187	77	106	15	66	164	89
12	**R15**	LM	QQ	SC	M	51	N	N	N	127	70	61	14	52	145	58
13	**R16**	LL	QQ	CC	M	49	N	N	N	255	146	164	29	62	161	111
14	**R17**	LM	QQ	SS	M	31	N	N	N	170	76	111	15	44	124	95
15	**R18**	LM	QQ	SS	M	31	N	N	N	116	55	43	11	62	146	36
16	**R20**	LL	QQ	SC	M	26	N	N	N	173	140	102	28	43	128	81
17	**R21**	LL	QQ	SS	M	49	N	N	N	238	72	170	14	54	153	103
18	**R22**	LL	QQ	SS	M	43	N	N	N	243	60	136	12	95	192	80
19	**R23**	LM	QQ	SS	F	47	N	N	N	168	73	83	15	70	162	67
20	**R26**	LM	QQ	SC	M	31	N	N	N	141	96	76	19	46	129	67
21	**R27**	LL	RR	SS	M	37	N	N	N	228	243	136	49	43	130	99
22	**R28**	LL	QQ	SC	M	44	N	N	...	133	50	52	10	71	163	36
23	**R29**	MM	QQ	SS	M	23	N	N	N	172	93	105	19	48	135	85
24	**R35**	LL	QQ	SS	M	27	N	N	N	144	86	80	17	47	120	74
25	**R37**	LM	QQ	SC	M	40	N	N	N	209	52	131	10	68	159	97
26	**R39**	LM	QQ	SS	F	35	N	N	N	250	74	124	15	111	216	84
27	**R40**	LM	QQ	SS	M	46	N	N	N	209	84	121	17	71	173	92
28	**R41**	LM	QQ	SS	M	29	N	N	N	174	77	95	15	64	158	75
29	**R42**	LL	QQ	SS	M	36	N	N	S	202	116	143	23	36	112	105
30	**R43**	LM	RR	SC	M	33	N	N	N	190	76	131	15	44	123	107
31	**R44**	LL	QQ	SS	M	48	N	N	N	330	236	223	47	60	173	136
32	**R45**	LL	QQ	SC	F	...	...	...	...	183	110	111	22	50	126	77
33	**R48**	MM	QQ	SS	M	41	N	N	N	149	65	87	13	49	134	75
34	**R49**	LM	QQ	CC	M	40	N	N	S	279	200	193	40	46	147	149
35	**R50**	LM	QQ	SC	F	40	N	N	N	177	49	118	10	49	125	93
36	**R51**	LL	QQ	SC	M	29	N	N	N	158	103	98	21	39	114	84
37	**R53**	MM	QQ	SS	F	43	N	N	N	...	...	...	...	...	...	...
38	**R54**	LM	QQ	SS	F	19	N	N	N	206	87	118	17	71	181	91
39	**R55**	LM	QQ	SC	M	30	N	N	N	165	103	97	21	47	149	85
40	**R56**	LL	QQ	SC	M	40	N	N	N	248	79	173	16	59	168	119
41	**R57**	LL	RR	SS	M	42	N	N	N	161	193	71	39	51	174	69
42	**R58**	LM	QQ	SS	M	28	N	N	N	151	196	78	39	34	127	80
43	**R59**	LM	QQ	SC	F	38	N	N	N	156	135	89	27	40	139	78
44	**R60**	LM	QQ	SS	M	34	N	N	N	151	75	79	15	57	157	64
45	**R61**	MM	QQ	SS	F	47	N	N	N	207	116	135	23	49	147	102

ID: identificação dos indivíduos; *L55M*, *R192Q* e *S311C*: polimorfismos; LL, LM, MM, QQ, QR, RR, SS, SC, e CC: genótipos; S: sexo; F: feminino; M: masculino; IDD: idade; HAS: hipertensão arterial sistêmica; DM: diabetes mellitus; TAB: tabagismo; N: ausente; S: presente; CT: colesterol total; TG: triacilgliceróis; LDL-C: colesterol da LDL; VLDL-C: colesterol da VLDL; HDL-C: colesterol da HDL; apoA-I: apolipoproteína A-I; apoB: apolipoproteínas B.

Anexo 1 - Continuação: Características dos genótipos, dados biodemográficos, dados clínicos e concentrações séricas dos parâmetros bioquímicos dos indivíduos do grupo controle (GC n =105).

Nº	ID	*L55M*	*R192Q*	*S311C*	S	IDD	HAS	DM	TAB.	CT	TG	LDL-C	VLDL-C	HDL-C	apoA-I	apoB
46	**R63**	LM	QQ	SS	M	48	N	N	N	159	66	94	13	52	143	76
47	**R64**	LM	QQ	SS	M	43	N	N	N	196	70	140	14	42	119	111
48	**R65**	LM	QQ	SC	M	34	N	N	N	166	87	74	17	75	195	72
49	**R66**	LL	QQ	SS	F	21	N	N	N	173	43	94	9	70	169	78
50	**R68**	LL	QQ	SS	M	48	N	N	N	203	104	121	21	61	135	93
51	**R69**	LM	QQ	SC	M	22	N	N	N	166	76	94	15	57	145	73
52	**R70**	LL	QQ	SC	M	43	N	N	N	215	131	140	26	49	143	111
53	**R71**	LM	QQ	SS	F	43	N	N	N	206	73	115	15	76	190	85
54	**R72**	LL	QQ	SC	M	41	N	N	N	241	109	153	22	66	167	117
55	**R73**	LM	QQ	SC	F	40	N	N	N	214	192	127	38	49	165	123
56	**R75**	LM	QQ	SS	M	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
57	**R76**	LM	QQ	SS	M	18	N	N	N	...	...	...	...	...	...	...
58	**R77**	LL	RR	SS	F	20	N	N	N	...	...	...	...	...	...	...
59	**R78**	LM	QQ	SC	F	18	N	N	S	...	...	...	...	...	...	...
60	**R79**	LL	RR	SS	F	19	N	N	N	...	...	...	...	...	...	...
61	**R81**	LM	QQ	SS	M	23	N	N	N	165	79	97	16	52	132	76
62	**R82**	LL	QQ	SC	F	40	N	N	N	119	53	51	11	57	121	50
63	**R83**	LL	QQ	SS	M	37	N	N	N	201	74	126	15	60	151	99
64	**R84**	LM	QQ	SS	M	29	N	N	N	123	54	60	11	52	133	54
65	**R85**	MM	RR	SC	M	30	N	N	N	177	53	107	11	59	144	87
66	**R86**	MM	RR	SS	M	43	N	N	N	189	76	122	15	52	136	86
67	**R87**	LM	QQ	CC	F	25	N	N	N	159	59	107	12	40	126	75
68	**R88**	LM	QQ	SS	M	31	N	N	N	183	114	121	23	39	107	91
69	**R89**	MM	RR	SS	F	41	N	N	N	204	56	100	11	93	199	74
70	**R92**	LM	QQ	SS	M	34	N	N	N	233	117	156	23	54	151	108
71	**R93**	MM	RR	SS	M	30	N	N	S	239	213	141	43	55	160	126
72	**R95**	LM	QQ	SS	M	42	S	N	N	217	131	138	26	53	168	110
73	**R98**	LM	QQ	CC	M	39	N	N	S	170	78	107	16	47	132	91
74	**R99**	LM	RR	SS	M	31	N	N	N	186	131	119	26	41	126	96
75	**R101**	LL	QQ	SS	M	40	N	N	N	170	66	104	13	53	140	87
76	**R103**	MM	RR	CC	M	33	N	N	N	199	53	106	11	82	170	76
77	**R105**	MM	QQ	SS	M	25	N	N	N	105	34	51	7	47	132	47
78	**R106**	LM	QQ	SC	M	25	N	N	N	160	67	94	13	53	152	67
79	**R107**	MM	QQ	SC	M	37	N	N	N	176	54	97	11	68	170	66
80	**R108**	LM	QQ	SC	F	35	N	N	N	173	64	92	13	68	185	75
81	**R109**	LL	QQ	SC	M	27	N	N	N	225	222	143	44	38	133	120
82	**R111**	LM	QQ	SC	M	30	N	N	N	185	105	94	21	70	169	67
83	**R112**	MM	QQ	SC	F	21	N	N	N	191	88	100	18	73	181	74
84	**R113**	MM	QQ	SC	F	39	N	N	N	217	72	144	14	59	148	60
85	**R114**	LM	QQ	SC	M	19	N	N	N	131	56	80	11	40	113	95
86	**R115**	MM	QQ	SC	F	43	N	N	N	151	64	68	13	70	150	67
87	**R116**	MM	RR	SC	M	31	N	N	N	233	122	169	24	40	130	126
88	**R117**	LM	QQ	SC	M	28	N	N	N	135	185	66	37	32	86	65
89	**R118**	MM	RR	SC	M	40	N	N	N	228	87	140	17	71	175	103
90	**R119**	LM	QQ	SC	M	24	N	N	N	129	51	67	10	52	116	56

ID: identificação dos indivíduos; *L55M*, *R192Q* e *S311C*: polimorfismos; LL, LM, MM, QQ, QR, RR, SS, SC, e CC: genótipos; S: sexo; F: feminino; M: masculino; IDD: idade; HAS: hipertensão arterial sistêmica; DM: diabetes mellitus; TAB: tabagismo; N: ausente; S: presente; CT: colesterol total; TG: triacilgliceróis; LDL-C: colesterol da LDL; VLDL-C: colesterol da VLDL; HDL-C: colesterol da HDL; apoA-I: apolipoproteína A-I; apoB: apolipoproteínas B.

Anexo 1 - Continuação: Características dos genótipos, dados biodemográficos, dados clínicos e concentrações séricas dos parâmetros bioquímicos dos indivíduos do grupo controle (GC n =105).

Nº	ID	*L55M*	*R192Q*	*S311C*	S	IDD	HAS	DM	TAB.	CT	TG	LDL-C	VLDL-C	HDL-C	apoA-I	apoB
91	**R120**	MM	QQ	SS	M	41	N	N	N	190	123	127	25	38	109	96
92	**R121**	LM	RR	SS	M	41	N	N	N	191	89	114	18	59	151	92
93	**R122**	MM	RR	SS	M	33	N	N	N	169	81	75	16	78	178	67
94	**R123**	MM	QQ	SS	F	...	...	...	...	155	112	83	22	50	148	80
95	**R124**	LM	QQ	SS	F	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
96	**R125**	MM	QQ	SC	F	28	N	N	N	170	99	90	20	60	180	87
97	**R126**	MM	RR	SS	M	26	N	N	N	159	70	87	14	58	125	84
98	**R127**	LM	QQ	SC	M	31	N	N	N	180	67	86	13	81	182	80
99	**R128**	MM	QQ	SC	F	...	...	...	...	173	54	86	11	76	182	91
100	**R131**	LM	QQ	SC	M	...	...	...	...	345	176	242	35	68	181	159
101	**R132**	LL	QQ	SS	F	...	...	...	...	130	68	63	14	53	133	57
102	**R133**	LM	QQ	SS	F	...	...	...	...	140	53	89	11	40	103	66
103	**R134**	LM	QQ	SS	M	...	...	...	...	114	36	46	7	61	146	47
104	**R135**	MM	QQ	SS	M	...	...	...	...	122	42	62	8	52	116	56
105	**R136**	LL	RR	SS	M	...	...	...	...	241	72	155	14	72	179	101

ID: identificação dos indivíduos; *L55M*, *R192Q* e *S311C*: polimorfismos; LL, LM, MM, QQ, QR, RR, SS, SC, e CC: genótipos; S: sexo; F: feminino; M: masculino; IDD: idade; HAS: hipertensão arterial sistêmica; DM: diabetes mellitus; TAB: tabagismo; N: ausente; S: presente; CT: colesterol total; TG: triacilgliceróis; LDL-C: colesterol da LDL; VLDL-C: colesterol da VLDL; HDL-C: colesterol da HDL; apoA-I: apolipoproteína A-I; apoB: apolipoproteínas B.

Anexo 2 - Características dos genótipos, dados biodemográficos, dados clínicos e concentrações séricas dos parâmetros bioquímicos dos indivíduos jovens infartados (GE n =116).

Nº	ID	*L55M*	*R192Q*	*S311C*	S	IDD	HAS	DM	TAB.	CT	TG	LDL-C	VLDL-C	HDL-C	apoA-I	apoB
1	**P1**	MM	QQ	SC	F	32	S	N	S	183	60	91	12	76	152	75
2	**P2**	LM	QQ	SS	M	33	S	N	S	268	162	181	32	55	162	137
3	**P3**	LM	QQ	SC	M	35	N	N	S	224	155	148	31	45	141	126
4	**P4**	LM	QQ	SS	F	37	S	N	N	206	99	138	20	48	152	127
5	**P5**	LL	QQ	SC	F	34	S	N	S	233	175	183	36	50	121	140
6	**P6**	LM	QQ	SC	F	37	N	N	S	208	134	165	27	48	95	88
7	**P7**	LL	RR	SS	M	34	N	N	S	282	82	237	16	29	84	142
8	**P8**	LM	QQ	SS	F	34	N	N	S	212	222	121	44	47	141	120
9	**P9**	LL	RR	SS	M	25	N	N	S	196	198	122	40	34	104	115
10	**P10**	LL	RR	SC	F	37	S	N	S	172	71	121	14	37	105	91
11	**P11**	LM	QQ	SS	M	21	S	N	N	157	134	...	...	...	...	...
12	**P12**	LL	RR	SS	M	34	N	N	S	136	71	128	23	34	98	122
13	**P13**	LL	RR	SS	M	31	S	N	N	231	358	116	72	43	134	133
14	**P14**	MM	QQ	SS	M	40	S	N	S	311	528	232	22	57	151	135
15	**P15**	LL	RR	SC	M	37	S	N	S	249	135	183	27	39	110	121
16	**P17**	LL	QQ	SS	F	35	S	N	S	184	106	113	21	50	128	85
17	**P18**	LL	QQ	SS	F	28	S	N	S	215	110	146	22	47	129	111
18	**P19**	LL	QQ	SC	F	34	S	N	S	166	103	118	21	27	87	88
19	**P20**	LM	QQ	SS	F	38	N	N	S	170	166	92	33	45	136	69
20	**P21**	LL	QQ	SS	M	38	S	N	N	274	184	148	37	89	182	137
21	**P22**	LL	QQ	SC	M	39	S	N	S	233	229	152	46	35	119	145
22	**P23**	LL	QQ	SS	F	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
23	**P24**	LM	QQ	SS	M	34	S	N	S	189	301	89	60	40	140	101
24	**P25**	LL	QQ	SS	M	36	N	S	S	218	101	137	20	61	134	98
25	**P26**	LM	QQ	SS	M	38	N	N	S	329	344	229	69	31	120	136
26	**P27**	MM	QQ	SS	M	37	N	N	S	193	70	132	14	47	134	133
27	**P28**	LM	QQ	SS	F	34	S	N	S	251	509	201	12	38	127	110
28	**P29**	LL	QQ	SS	M	33	N	N	S	214	145	146	29	39	129	123
29	**P30**	LL	RR	SC	F	38	S	N	S	215	363	101	73	41	...	...
30	**P31**	LM	QQ	SC	M	45	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
31	**P32**	LL	QQ	SC	M	34	S	N	S	258	222	181	44	33	90	155
32	**P33**	MM	QQ	SS	M	34	S	S	S	331	476	184	95	52	135	98
33	**P34**	LL	QQ	SS	M	32	S	N	S	256	161	0	32	36	99	147
34	**P35**	LM	QQ	SS	M	39	N	N	S	238	130	178	26	34	91	130
35	**P36**	MM	QQ	SS	F	40	N	N	S	161	88	86	18	57	133	73
36	**P37**	MM	RR	SC	M	36	S	N	S	235	300	125	60	50	140	119
37	**P38**	LL	RR	SS	M	40	S	N	S	135	68	82	14	39	96	81
38	**P39**	LM	QQ	SC	M	33	S	N	S	178	229	93	46	39	108	56
39	**P41**	LM	QQ	SS	M	37	N	N	S	165	110	103	22	40	106	26
40	**P42**	LL	QQ	CC	M	30	N	N	N	137	226	56	46	35	112	70
41	**P43**	LM	QQ	SS	M	38	N	N	S	169	349	58	70	41	115	71
42	**P44**	LL	QQ	SC	M	39	N	N	S	188	100	97	20	71	160	80
43	**P45**	LL	QQ	SS	F	24	N	N	S	258	126	184	25	49	122	120
44	**P46**	LL	QQ	SS	M	36	N	N	S	199	111	139	22	38	97	120
45	**P47**	LL	QQ	SC	M	38	S	N	N	161	194	68	39	54	129	70

ID: identificação dos indivíduos; *L55M*, *R192Q* e *S311C*: polimorfismos; LL, LM, MM, QQ, QR, RR, SS, SC, e CC: genótipos; S: sexo; F: feminino; M: masculino; IDD: idade; HAS: hipertensão arterial sistêmica; DM: diabetes mellitus; TAB: tabagismo; N: ausente; S: presente; CT: colesterol total; TG: triacilgliceróis; LDL-C: colesterol da LDL; VLDL-C: colesterol da VLDL; HDL-C: colesterol da HDL; apoA-I: apolipoproteína A-I; apoB: apolipoproteínas B.

Anexo 2 - Continuação. Características dos genótipos, dados biodemográficos, dados clínicos e concentrações séricas dos parâmetros bioquímicos dos indivíduos jovens infartados (GE n =116).

Nº	ID	*L55M*	*R192Q*	*S311C*	S	IDD	HAS	DM	TAB.	CT	TG	LDL-C	VLDL-C	HDL-C	apoA-I	apoB
46	**P48**	LL	QQ	SS	M	34	N	N	S	210	137	141	19	27	96	117
47	**P49**	LM	QQ	SS	F	36	S	N	S	194	138	129	28	37	101	119
48	**P50**	LM	QQ	SC	F	18	N	N	N	206	74	139	15	52	118	107
49	**P51**	LM	QQ	SS	M	38	N	N	S	209	258	126	52	31	96	100
50	**P52**	LL	RR	SC	M	38	N	N	S	141	84	83	17	41	103	72
51	**P53**	LL	RR	SC	M	28	N	N	S	181	148	106	30	45	126	103
52	**P54**	LL	QQ	SC	M	38	S	N	S	181	249	90	50	41	126	104
53	**P55**	LL	RR	SC	M	37	N	N	S	261	284	171	57	33	94	162
54	**P56**	MM	QQ	SS	F	24	N	N	S	...	...	...	...	...	...	...
55	**P57**	LM	QQ	SS	M	38	N	N	S	314	283	213	57	44	130	133
56	**P59**	LM	QQ	CC	M	35	S	N	S	219	275	118	55	46	119	122
57	**P60**	LL	QQ	SS	M	26	N	N	S	170	321	72	64	34	113	71
58	**P61**	LL	RR	SS	M	37	N	S	S	249	419	178	22	49	136	134
59	**P62**	LM	QQ	SC	M	35	S	N	S	245	162	177	32	36	93	143
60	**P63**	LM	QQ	SC	F	34	S	N	S	226	111	164	22	40	98	126
61	**P64**	LM	QQ	SC	M	36	S	N	S	160	76	94	16	50	107	76
62	**P66**	LM	QQ	SC	M	36	N	N	S	136	50	73	10	53	128	52
63	**P67**	LM	QQ	SS	F	38	S	N	S	182	244	91	49	42	120	108
64	**P68**	LM	QQ	SS	F	35	N	S	S	238	310	143	62	33	99	123
65	**P69**	LM	QQ	SS	M	33	N	N	S	184	104	124	21	39	106	106
66	**P70**	LL	RR	SS	M	36	N	N	S	281	98	166	20	95	177	110
67	**P71**	LM	QQ	SS	M	36	S	S	S	180	349	75	70	35	111	97
68	**P72**	LM	QQ	SS	M	35	S	N	S	166	294	81	59	26	83	95
69	**P73**	LL	RR	SS	F	21	S	N	S	203	104	135	21	47	117	87
70	**P74**	LM	QQ	SS	M	34	S	N	S	187	111	120	22	45	117	106
71	**P75**	LL	QQ	SS	M	37	N	N	S	148	238	77	48	23	90	71
72	**P76**	LL	QQ	SS	M	22	N	N	S	195	114	108	23	64	139	80
73	**P77**	LM	QQ	SC	M	32	N	N	S	175	163	101	33	41	136	71
74	**P78**	LM	QQ	SC	M	28	S	N	N	211	199	129	40	42	131	99
75	**P79**	LL	QQ	SS	M	17	N	N	N	213	200	132	40	41	146	96
76	**P80**	LL	QQ	SS	M	36	N	N	N	170	77	95	15	60	149	66
77	**P81**	LL	QQ	SC	M	31	S	N	S	294	181	234	36	24	92	152
78	**P82**	LM	QQ	SS	M	36	N	S	S	487	275	147	...	58	127	171
79	**P84**	LL	RR	SS	F	39	N	N	S	205	115	136	23	46	132	112
80	**P85**	LL	RR	SS	F	38	N	N	S	182	101	102	20	60	121	101
81	**P87**	LL	QQ	SS	M	45	S	N	S	183	319	84	64	35	131	94
82	**P90**	MM	QQ	SS	M	39	S	N	S	217	141	157	28	32	106	114
83	**P92**	LL	QQ	SC	M	38	N	N	N	197	106	131	21	45	132	83
84	**P93**	MM	QQ	SC	F	40	S	N	S	213	124	95	25	93	196	69
85	**P94**	LM	QQ	SS	M	27	N	N	N	188	57	103	11	74	169	91
86	**P95**	LL	RR	SS	F	40	N	N	S	197	174	118	35	44	140	108
87	**P97**	LL	RR	SS	F	35	S	N	S	151	126	86	25	40	126	90
88	**P98**	LM	QQ	SC	M	39	N	N	S	171	158	103	32	36	107	89
89	**P99**	LM	QQ	CC	F	40	S	N	S	285	120	196	24	65	180	134
90	**P101**	LM	QQ	SS	M	35	N	N	S	235	301	142	60	33	102	118

ID: identificação dos indivíduos; *L55M*, *R192Q* e *S311C*: polimorfismos; LL, LM, MM, QQ, QR, RR, SS, SC, e CC: genótipos; S: sexo; F: feminino; M: masculino; IDD: idade; HAS: hipertensão arterial sistêmica; DM: diabetes mellitus; TAB: tabagismo; N: ausente; S: presente; CT: colesterol total; TG: triacilgliceróis; LDL-C: colesterol da LDL; VLDL-C: colesterol da VLDL; HDL-C: colesterol da HDL; apoA-I: apolipoproteína A-I; apoB: apolipoproteínas B.

Anexo 2 - Continuação. Características dos genótipos, dados biodemográficos, dados clínicos e concentrações séricas dos parâmetros bioquímicos dos indivíduos jovens infartados (GE n =116).

Nº	ID	*L55M*	*R192Q*	*S311C*	S	IDD	HAS	DM	TAB.	CT	TG	LDL-C	VLDL-C	HDL-C	apoA-I	apoB
91	**P103**	LL	RR	SS	F	36	S	N	N	208	117	139	23	46	118	96
92	**P105**	LM	QQ	SS	F	30	N	N	S	174	63	116	13	45	115	90
93	**P106**	LM	QQ	SC	F	31	N	N	S	170	65	115	13	42	105	102
94	**P109**	LM	QQ	SC	M	38	N	N	S	246	3	146	61	39	118	119
95	**P110**	LM	QQ	SS	F	39	S	S	S	191	146	126	30	35	107	105
96	**P112**	LM	QQ	SC	M	29	N	N	S	292	271	204	54	34	132	141
97	**P113**	MM	QQ	SC	M	35	S	N	S	245	138	178	28	39	122	140
98	**P114**	MM	QQ	SS	F	37	S	S	S	219	100	158	20	41	149	119
99	**P115**	LM	QQ	SC	M	36	N	N	S	247	335	137	67	43	143	145
100	**P116**	LM	QQ	SC	M	38	S	S	S	369	229	262	46	61	181	164
101	**P117**	MM	QQ	SS	M	33	S	S	S	229	296	132	59	38	134	119
102	**P118**	LM	QQ	SC	M	39	S	N	S	172	276	70	55	47	151	83
103	**P119**	LM	QQ	SS	M	38	S	N	S	193	86	131	17	45	130	90
104	**P120**	MM	QQ	SS	M	28	N	N	S	209	173	121	35	53	151	103
105	**P121**	MM	QQ	SC	F	24	S	S	N	267	203	173	41	53	145	140
106	**P122**	MM	QQ	SS	M	32	S	N	S	191	121	117	24	50	150	90
107	**P124**	LM	RR	SS	M	23	N	N	N	123	35	49	7	67	161	48
108	**P125**	LM	QQ	SS	M	39	N	N	S	220	445	168	22	30	107	101
109	**P126**	LM	QQ	SC	F	40	S	N	S	195	233	112	47	36	123	116
110	**P128**	MM	QQ	SC	M	32	N	N	S	190	65	115	13	62	157	92
111	**P131**	LL	QQ	SS	M	35	N	N	N	179	156	130	31	18	55	113
112	**P132**	LM	QQ	SC	M	35	N	N	S	223	140	150	28	45	130	112
113	**P133**	LM	QQ	SC	F	...	S	N	S	186	98	117	20	49	131	85
114	**P134**	LL	QQ	SS	M	38	S	N	S	245	233	140	47	58	155	129
115	**P135**	MM	RR	SS	M	36	N	N	N	132	59	90	12	30	92	69
116	**P137**	MM	RR	SS	F	34	N	N	S	...	...	...	...	...	...	...

ID: identificação dos indivíduos; *L55M*, *R192Q* e *S311C*: polimorfismos; LL, LM, MM, QQ, QR, RR, SS, SC, e CC: genótipos; S: sexo; F: feminino; M: masculino; IDD: idade; HAS: hipertensão arterial sistêmica; DM: diabetes mellitus; TAB: tabagismo; N: ausente; S: presente; CT: colesterol total; TG: triacilgliceróis; LDL-C: colesterol da LDL; VLDL-C: colesterol da VLDL; HDL-C: colesterol da HDL; apoA-I: apolipoproteína A-I; apoB: apolipoproteínas B.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Ofício CEP nº 144/2004

São Paulo, 07 de dezembro de 2004.

Ilmo(a). Sr(a).
Érika Miguel de Souza

Vimos informar que o Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 06 de dezembro p.p., **APROVOU** o projeto "Polimorfismos genéticos da enzima paraoxonase com fator de risco na doença arterial coronariana em adultos jovens" (Protocolo nº 274) apresentado por Vossa Senhoria, devendo apenas, no prazo de 60 dias:
1) Informar os critérios de inclusão e exclusão dos sujeitos da pesquisa.
2) Informar a fonte financiadora do projeto.
3) Garantir também o resultado desta pesquisa aos indivíduos que consentiram participar da pesquisa do Dr. Marcelo F.Sampaio, cedente do material biológico.

Lembramos que após a execução de 50% do cronograma do projeto, deverá ser apresentado um relatório parcial, de acordo com o Artigo 18 – item C, da Portaria FCF-111/97.

Atenciosamente,

Profª. Drª. Valentina Porta
Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa da FCF/USP

Orientador: Prof. Mário Hiroyuki Hirata
FBC

Av. Prof. Lineu Prestes, nº 580, Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091-3677 - Fax (11) 3031-8986 - e-mail: cepfcf@usp.br