

PAULO ROBERTO SANTOS FERREIRA

**Freqüência das mutações Gln192Arg e Leu55Met no gene da
paraoxonase 1 e das mutações Ser311Cis e A148G no gene
da paraoxonase 2 em brasileiros de diferentes origens
étnicas**

*DISSERTAÇÃO APRESENTADA À FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM*

Área de concentração: Alergia e
Imunopatologia

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Paulo
Bydlowski

São Paulo

2007

PAULO ROBERTO SANTOS FERREIRA

**Freqüência das mutações Gln192Arg e Leu55Met no
gene da paraoxonase 1 e das mutações Ser311Cis e
A148G no gene da paraoxonase 2 em brasileiros de
diferentes origens étnicas**

*DISSERTAÇÃO APRESENTADA À FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM CIÊNCIAS*

Área de concentração: Alergia e Imunopatologia
Orientador: Prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski

São Paulo

2007

*“Viva como se fosse morrer
amanhã, aprenda como se
fosse viver para sempre.”*

Mahatma Gandhi

Agradecimentos

- Ao **Prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski**, pela orientação, paciência, apoio e confiança.

- Ao **Prof. Dr. Paulo Alberto Otto**, pela atenção, paciência e valiosa colaboração na análise dos dados de genética de população.

- Ao **Prof. Dr. Raul Maranhão**, por permitir acesso ao seu laboratório para realizar a determinação da atividade enzimática.

- À **Prof^a. Maria Regina Alves Cardoso**, pela disponibilidade e auxílio nas análises estatísticas.

- Ao **Dr. Nairo Massakazu Sumita**, pela colaboração ao permitir a realização das dosagens do perfil lipídico em seu laboratório.

- À doutoranda e colega biomédica **Luciana Morganti Ferreira Maselli**, pela oportunidade, apoio, auxílio na parte de biologia molecular e momentos de discussão científica.

- Ao biólogo **Renato Barboza** pela atenção, paciência e disponibilidade a mim dispensadas quando das minhas várias idas ao laboratório de

Metabolismo de Lípidos no InCor para realização dos ensaios de determinação da atividade da paraoxonase.

- Aos colegas, alunos e funcionários da Superintendência de Pesquisa pelo dia a dia solidário.

- Às secretárias da Superintendência de pesquisa **Regina Maria Gil** e **Cleide Appolonio Menarbini**, pela atenção e auxílio.

- À secretária da pós-graduação **Tânia Joyce Mota**, pela disponibilidade, paciência e atenção.

- À bióloga **Adriana Caschera Leme**, pela compreensão e apoio a mim concedidos e a todos os colegas do laboratório clínico do hospital Israelita Albert Einstein, pela torcida.

- Aos meus pais **Roberto Sberviglieri Ferreira** e **Maria Regina dos Santos Ferreira**, minha avó **Edith Coelho dos Santos** e minha namorada **Ana Carolina de Oliveira**, pela dedicação, colaboração integral e apoio irrestrito, incondicional e incentivo incessante nessa árdua e longa jornada.

Sumário

RESUMO

SUMMARY

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 PARAOXONASE (PON).....	1
1.2 PON1.....	2
1.3 PON2.....	9
1.4 PON3.....	11
1.5 CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS ÉTNICOS EM POPULAÇÕES.....	13
1.6 OBJETIVO.....	16
2 CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
2.1 POPULAÇÃO ESTUDADA.....	17
2.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	17
2.3 REAGENTES	18
2.4 OBTENÇÃO DE DNA GENÔMICO A PARTIR DE CÉLULAS DE SANGUE PERIFÉRICO	18
2.5 QUANTIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO.....	20
2.6 GENOTIPAGEM PARA OS POLIMORFISMOS	20
2.7. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE BASAL DA PON1 SÉRICA.....	26
2.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
3. RESULTADOS.....	29
3.1 DISTRIBUIÇÃO DOS POLIMORFISMOS L55M E Q192R DO GENE PON1....	29
3.2 DISTRIBUIÇÃO DOS POLIMORFISMOS A148G E C311S DO GENE PON2..	34
3.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE BASAL DA PON1 SÉRICA.....	40
4 DISCUSSÃO	42
5 CONCLUSÃO	48
6 ANEXOS	49
5 REFERÊNCIAS	85

Resumo

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

Paraoxonase (PON) é uma família multigene de enzimas, a qual inclui PON1, PON2 e PON3. Investigações há mais de duas décadas vêm permitindo um melhor conhecimento da função dos genes da paraoxonase, em especial da PON1, no metabolismo de inseticidas organofosforados, lípidos oxidados e medicamentos. O principal local de síntese da PON1 é o fígado, e no soro encontra-se mais comumente associada à HDL-C. Exibe dois principais polimorfismos, posição 55 (L/M) e 192 (Q/R) que estão relacionados ao nível sérico e atividade enzimática respectivamente. A freqüência dos alelos do gene PON1 apresenta considerável variabilidade entre diferentes populações. São escassos os estudos sobre a PON2, porém sabe-se que é expressa em vários tecidos, sugerindo, dessa forma, que essa enzima tenha uma ação localizada (intracelular). Dois polimorfismos são os mais estudados no gene PON2, posições 148 (A/G) e 311 (C/S) e têm sido associados à numerosas condições fisiopatológicas como variações no metabolismo e níveis plasmáticos de lipoproteínas e glicose. Este trabalho tem por objetivos caracterizar as freqüências das mutações 192 (Q/R) e 55(L/M) no gene da PON1 e 311(C/S) e 148(A/G) no gene da PON2, bem como analisar a atividade das isoformas da enzima PON1 em uma população brasileira, da cidade de São Paulo, de diferentes origens étnicas. O estudo foi realizado entre 2005 e 2006 com 179 doadores de sangue, classificados etnicamente. Foi coletado sangue para extração do DNA genômico, para posterior determinação dos polimorfismos, através da técnica de PCR e soro para a determinação da atividade basal sérica da enzima paraoxonase. Os genótipos LL (46,4%) e LM (45,2%) na posição 55 (L55M) e QR (49,2%) na posição 192 (Q192R) do gene PON1 são os mais freqüentes na população total. Entre os doadores brancos, os genótipos mais freqüentes foram LM (51,9%) posição 55 e QR (45,6%) na posição 192. No caso dos doadores mulatos, LL (50,0%) e QR (52,8%) são os genótipos mais observados e para os doadores negros, os genótipos LL (69,7%) e QR (50,0%) nas posições 55 e 192 respectivamente. O alelo L é o mais freqüente nos três grupos étnicos, no entanto, em relação a freqüência alélica do polimorfismo da posição 192, o alelo Q predomina entre brancos e mulatos, já para os negros o alelo R é mais freqüente. No gene PON2, os genótipos mais freqüentes na população são AA (54,2%) na posição 148 (A148G) e CS (52,5%) na posição 311 (C311S). Quando comparadas as freqüências genotípicas do gene PON2 no polimorfismo da posição 148 (A/G) entre os três grupos étnicos, o genótipo AA foi o mais freqüente, em brancos (60,7%), mulatos (50,0%) e em negros (46,4%). Já para o polimorfismo da posição 311 (C/S), os doadores brancos têm o genótipo CS (46,8%) e SS (46,8%) como o de maior freqüência e nos doadores mulatos e negros o genótipo mais freqüente é CS com 56,9% e 57,1% respectivamente. Não houve diferença na distribuição alélica dos três grupos étnicos, sendo os alelos A e S os mais freqüentes. Em relação à atividade da enzima, as isoformas resultantes dos genótipos LL (posição 55) e RR (posição 192) apresentaram os valores das medianas significativamente maiores que as demais isoformas, sendo mais eficazes na hidrólise do *paraoxon*.

Descritores: 1.POLIMORFISMO GENÉTICO 2.GRUPOS ÉTNICOS 3.ENZIMAS/genética 4. FREQUENCIA DO GENE 5.VARIAÇÃO (GENÉTICA) 6.BRASIL.

Summary

Ferreira PRS *Frequency of Q192R and L55M polymorphisms of paraoxonase -1 gene (PON1), A148G and C311S of paraoxonase-2 gene (PON2) in different ethnic groups of brazilian population.*[dissertation]. São Paulo: Faculty of Medicine, University of São Paulo, SP (Brazil); 2007.

Paraoxonase (PON) is a multigene family of enzymes that include PON1, PON2 and PON3. Investigations at more than two decade coming to allow the best understanding of the function of the paraoxonase genes, in special of the PON1 in the metabolism organophosphate insecticides, oxidized lipids and drugs. The main place of PON1 synthesis is the liver, and in the serum is currently associated to HDL-C. Show two main polymorphisms, in the position 55 (L/M) and 192 (Q/R) that are relation with serum level and enzymatic activities, respectively. The allele frequency of PON1 genes shows variability in different populations. There is a few studies about PON2, but it is known that is expressed in many tissues, suggesting, the enzyme have a local action (intracellular). Two polymorphisms are the most studied in the PON2 gene, 148 (A/G) and 311 (C/S) positions and they have been associated to a lot of physiologic conditions like metabolisms chances and lipoprotein and glucose plasma level. This work have the objective to caracterizer the frequency of 192 (Q/R) and 55 (L/M) mutation in the PON1 gene and 311 (C/S) e 148 (A/G) mutations in the PON2 gene as well as to analyze the enzyme PON isoform activity in the brazilian population of São Paulo City, in different ethnics groups. The study was realized during 2005 to 2006 in 179 blood donor classified according to the ethnics. It was colleted the blood to DNA genomic extraction after to polymorphisms determination was utilized the PCR technique and the serum to determine the paraoxonase enzyme basal activity. The genotypes LL (46,4%) and LM (45,2%) in the 55 (L55M) positions and QR (49,2%) in the 192 (Q192R) position in the PON1 gene are the most frequently in the total population. Among the white donor, the genotypes most frequently were LM (51,9%) in the 55 position and QR (45,6%) in the 192 position. In mulatoes, LL (50,0%) and QR (52,8%) are the most observed genotypes and black donor, the genotypes LL (69,7%) and QR (50,0%) in the 55 and 192 positions, respectively. The L allele is the most frequently in the three ethnics groups, however, the relation of polymorphism allelic frequency in the position 192, the Q allele to predominate among mutates, and to the negroes the allele R is the most frequency. In the PON 2 gene, the most frequently genotypes are AA (54,2%) in the 148 (A148G) position and CS (52,5%) in the 311 (C311S) position. When they are compared with PON2 genotypes frequency in the polymorphisms of 148 (A/G) position among three ethnics groups AA was the most frequently, in the white (60,7%), mulatoes (50,0%) and negroes (46,4%). To the polymorphisms at 311 (C/S) positions is the most frequently in white donors have a genotype CS (46,8%) and SS (46, 8%) and in the mulatoes and negroes donors the most frequency genotypes is CS with 56,9% and 57,1% respectively. There aren't differences in the allelic distribution in the three ethnics groups, the A and S allelic are the most frequently. In relation to enzyme activity, the product of isoform to LL (55 position) and RR (192 position) genotypes to present the median level are significantly more than another isoforms, they are more efficient in the paraoxon hydrolyzes

Descriptors: 1.GENETIC POLIMORPHYSM 2.ETHNIC GROUPS
3.ENZYMES/genetic 4.GENE FREQUENCY 5.VARIATION (GENETICS) 6.BRAZIL.

1 INTRODUÇÃO

1.1 PARAOXONASE (PON)

A PON é uma família multigene de enzimas, a qual inclui PON1, PON2 e PON3, localizados adjacientemente no cromossomo 7q21-3 em humanos. Os genes PON são similares, apresentando grande homologia estrutural, aparentemente tendo sido originados pela duplicação gênica de um precursor evolucionário comum, possuindo nove éxons, oito íntrons e promotores “TATA-less”, o que sugere que esta família de enzimas possa contribuir para algumas importantes funções fisiológicas, independentemente da capacidade da PON1 de hidrolisar organofosfatos, carbamatos e ésteres aromáticos (LA DU et al., 1999, DRAGANOV et al., 2000; CAMPO et al., 2004). Entre as espécies de mamíferos, cada um dos três genes apresenta 79-90% de identidade em aminoácidos e 81-91% de identidade em nucleotídeos. Um aminoácido lisina no códon 106 está presente na PON1 (PRIMO-PARMO et al. 1996; LA DU et al., 1999) e ausente em todas as seqüências de DNA complementar (cDNA) de PON2 e PON3. Em humanos, PON1, PON2 e PON3 possuem aproximadamente 60% de identidade em aminoácidos e cerca de 70% de identidade em nucleotídeos (CAMPO et al., 2004). Do ponto de vista evolucionário, PON2 parece ser o membro mais antigo, seguido por PON3 e PON1 (DRAGANOV e LA DU, 2004). Apesar disso, a PON1, primeira a ser encontrada e mais estudada, foi descoberta através da sua capacidade de hidrolisar organofosfatos xenobióticos no soro humano. PON2 e PON3, mais

recentemente identificadas, ainda apresentam suas funções apenas superficialmente especuladas (MACKNESS et al., 2004). Sabe-se, no entanto, que PON2 e PON3 não exibem atividade paraoxonase ou arilesterase, mas assim como a PON1, ambas hidrolisam lactonas aromáticas, alifáticas de cadeia longa e possuem propriedades para prevenção da oxidação de lípidos na lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) e lipoproteína de alta densidade (HDL-C), e inativação de lípidos oxidados da LDL (DRAGANOV e LA DU, 2004; GETZ e REARDON, 2004).

Faz-se ainda necessário estabelecer a atuação de cada um destes três produtos gênicos na fisiologia e patologia humanas, bem como determinar-se as verdadeiras funções fisiológicas desta família de enzimas (LI et al., 2003).

1.2 PON1

PON1 é um membro de uma família de enzimas que é amplamente expressa em mamíferos, como: ratos, coelhos, camundongos e seres humanos, mas também foi observada em muitas outras espécies, incluindo *Caenorhabditis elegans* (DRAGANOV e LA DU, 2004). A PON1 sérica humana é uma proteína glicada constituída por 354 aminoácidos e com massa molecular entre 43 – 47 KDa (DURRINGTON et al., 2001). O principal local de síntese da PON1 é o fígado, e no soro encontra-se fortemente associada à HDL-C. Recentemente, foi demonstrado que menos de 5% da paraoxonase sérica estaria ligada à lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL-C) e que uma quantidade ainda menor estaria presente nos

quilomícrons (FUHRMAN et al., 2005; SORENSON et al., 1999, JAMES et al., 2004).

PON1 recebeu esta nomenclatura em função do *paraoxon*, metabólito tóxico do inseticida *parathion*, que é um de seus substratos mais bem estudados *in vitro*. No entanto, PON1 hidrolisa uma ampla variedade de substratos como: metabólitos ativos de vários outros inseticidas organofosforados (ex. *clorpirifos*, *oxon*, *diazoxon*); “agentes nervosos” (sarin, soman e VX); ésteres aromáticos (fenilacetato, tiofenilacetato e 2 – naftilacetato); uma variedade de lactonas aromáticas e alifáticas (dihidrocumarina, γ - butirólactona e homocisteína tiolactona) e também catalisa a reação reversa, “lactonização”, de γ - e δ - ácidos hidroxicarboxílicos (COSTA et al., 2003; DRAGANOV et al., 2004, LA DU, 1999; JAKUBOWSKI et al., 2000; BILLECKE et al.; 2000; TEIBER et al., 2003).

Mazur, em 1946, foi o primeiro a descrever a hidrólise enzimática de compostos organofosforados por tecidos animais e durante a década de 50, Aldridge (1953a, 1953b) estudou a hidrólise do *paraoxon* no soro humano e no de outras espécies de mamíferos. Aldridge propôs que estas esterases, capazes de hidrolisar organofosfatos bem como ésteres aromáticos como o *p*-nitrofenil acetato, fossem chamadas “A - esterases” (paraoxonase) para distinguir destes, as “B - esterases”, representadas por serina carboxilesterases e colinesterases que são inibidas pelo *paraoxon* e outros organofosfatos. Só anos depois, Sorenson e colaboradores demonstraram

se tratar da mesma enzima que catalisava tanto a atividade paraoxonase como a arilesterase (PON1, EC 3.1.8.1) (SORENSEN et al., 1995).

Uma função fisiológica natural da PON1 seria o metabolismo de lípidos oxidados tóxicos tanto da lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) como de partículas da HDL-C. Mackness e colaboradores (MACKNESS et al., 1991) foram os primeiros a demonstrar que a PON1 humana purificada poderia inibir a oxidação da LDL-C *in vitro*. Outros estudos têm confirmado e complementado este achado, demonstrando que PON1 previne a formação de LDL-C oxidada e inativa fosfolípidos oxidados derivados da LDL-C uma vez que haja a formação destes (COSTA et al., 2003; COSTA et al., 2005). Mas essas propriedades não têm sido diretamente ligadas à atividade hidrolítica da PON1 (LUSIS, 2000; AVIRAM et al.; 1998; AHMED et al., 2001; MACKNESS et al., 1991). Um outro substrato fisiológico é a homocisteína tiolactona, que é um fator de risco conhecido em doenças vasculares ateroscleróticas. Apenas a PON1 apresenta atividade sérica homocisteína tiolactonase, porém numa taxa pequena (JAKUBOWSKI, 2000; AHARONI et al., 2004). Uma capacidade antiaterosclerótica também havia sido atribuída a uma atividade fosfolipase A2 (PLA2-like), mas essa observação foi posteriormente atribuída à contaminação ao invés de uma real atividade da PON1 (RODRIGO et al., 2001; TEIBER et al.; 2004; MARATHE et al., 2003).

Estudos utilizando proteínas recombinantes possibilitaram chegar à estrutura tridimensional do cristal de uma PON1 recombinante variante derivada de coelhos que é muito similar à de humanos, fato que proporcionou um melhor entendimento da estrutura e modo funcional da

PON1. A enzima parece possuir apenas um sítio ativo, e é composta por dois íons cálcio (Ca^{2+}), tendo um deles função estrutural e o outro, envolvido diretamente na função catalítica frente a substratos organofosfatos. Além disso, um aminoácido cisteína na posição 284 seria essencial na proteção da oxidação da LDL-C, função relacionada à propriedade antiaterogênica da enzima (HAREL et al., 2004; AHARONI et al., 2004; KHERSONSKY & TAWFIK, 2005).

A atividade da PON1 está presente já em recém-nascidos, atingindo os níveis encontrados em adultos a partir de 1 ano de vida. Estes níveis parecem se manter constantes por toda a vida (MACKNESS et al., 1998), não tendo sido relatadas diferenças de atividade da PON1 entre os sexos. Entretanto, já foi relatado que a atividade enzimática da PON varia de 10 a 40 vezes entre populações com diferentes formações étnicas, bem como se apresenta diminuída em pacientes portadores de certas patologias como diabetes, hipercolesterolemia familiar, doença cérebro-vascular, cirrose hepática, doença renal crônica, entre outras, podendo caracterizar, inclusive, fator de risco, apesar de dados ainda conflitantes (LI et al., 2003; MACKNESS et al., 2003; AYNACIOGLU et al., 1999). A atividade da PON pode estar diminuída no tabagismo, na gravidez, na menopausa e na dieta aterogênica podendo estar aumentada na ingestão moderada de álcool, polifénois e das vitaminas C e E (LI et al., 2003).

1.2.1 Polimorfismos do Gene PON1

A atividade da PON1 é influenciada parcialmente por polimorfismos genéticos. A substituição do aminoácido glutamina (Q) por uma arginina (R) na posição 192, origina duas aloenzimas cujas atividades são substrato dependentes. Assim, substratos como *paroxon* e *fenitroxon*, organofosfatos amplamente empregados como inseticidas, são hidrolisados mais rapidamente pela aloenzima R. Outros, como o fenilacetato, são hidrolisados igualmente por ambas e outros ainda, como *diazoxon* e gases nervosos como *soman* e *sarin* são mais rapidamente hidrolisados pela aloenzima Q. Esta última, a isoforma PON1-Q, *in vitro*, promove melhor proteção da LDL-C contra o acúmulo de peróxidos lipídicos (MACKNESS et al., 2003). Por sua vez, o alelo R parece constituir fator de risco independente para doença coronariana, em função justamente da menor capacidade antioxidativa. Vários estudos independentes realizados em diferentes populações vêm indicando esse dado (SERRATO & MARIAN, 1995; SANGHERA et al., 1998; DURRINGTON et al., 2001; AYNACIOGLU & KEPEKCI, 2000; IMAI et al., 2000; GNASSO et al., 2002), entretanto em outras populações isso não tem sido observado (ANTIKAINEN et al., 1996; HERRMANN et al., 1996; SUEHIRO et al., 1996; GARIN et al., 1997; OMBRES et al., 1998).

Experimentos empregando camundongos *PON1 knockout* já demonstraram uma maior susceptibilidade à toxicidade por organofosfatos, bem como à aterosclerose produzida por dieta aterogênica nestes animais (SHIH et al., 1998).

O gene da PON1 possui ainda um outro polimorfismo exônico, na posição 55, resultante da troca de um aminoácido metionina (M) por uma

leucina (L). Esta conformação parece estar relacionada a estabilidade da molécula e aos níveis plasmáticos da PON1. Vários estudos relacionam a presença da isoforma M a baixos níveis da enzima. Isto se deve provavelmente ao fato da leucina ocupar um ponto estratégico na estrutura da enzima, bem como a sua interação com aminoácidos “vizinhos” os quais estão ligados com os dois íons cálcio presentes na PON1. (AVIRAM et al., 1998; MACKNESS et al., 2000; LEVIEV et al., 2001; COSTA et al., 2005; HAREL et al., 2004).

Além destes dois polimorfismos, mais de 160 polimorfismos já foram descritos neste gene. Alguns em regiões codificadoras, outros em íntrons e regiões reguladoras, necessitando serem mais bem caracterizados e afetando, provavelmente, a eficiência de *splicing*, a estabilidade do mensageiro ou a eficiência da poliadenilação (Costa *et al.*, 2005).

1.2.1.1 Distribuição em populações dos polimorfismos genéticos de PON1 nas posições L55M e Q192R

As primeiras investigações da distribuição dos polimorfismos genéticos de PON 1 entre populações foram realizadas através da determinação da atividade enzimática tendo como substrato o *paraoxon*, e os fenótipos e frequências alélicas foram deduzidos através da distribuição quantitativa dos valores (GELDMACHER-V. MALLINCKRODT et al., 1983; ROY et al., 1991; LA DU et al., 1986). Atualmente, esses estudos são

realizados através da amplificação do DNA e subsequente digestão do produto da PCR por enzimas de restrição (SCACCHI et al., 2003).

As freqüências alélicas da PON1 têm grande variedade entre as populações humanas. O alelo R parece ser mais freqüente na África Central, particularmente entre alguns aborígenes e algumas populações de regiões isoladas. Foi observada em japoneses e chineses uma maior freqüência desse alelo (variando de 58% a 65%). Já o alelo Q parece ser mais freqüente em regiões temperadas da Europa e da América do Norte, entretanto, estudos adicionais seriam necessários para determinar se esta distribuição estaria relacionada com migrações populacionais, influências climáticas, bem como com fatores ambientais (DRAGANOV e LA DU, 2004; LI et al., 2003; IMAI et al., 2000; KO et al., 1998). Em 2003, uma pesquisa sobre a distribuição mundial do polimorfismo 192 na PON1 também apresentou o alelo R como o de maior freqüência na maioria das populações estudadas, inferindo, por este motivo, que talvez este fosse o alelo ancestral. Neste estudo, o alelo Q apresentou freqüência mais alta apenas em europeus e tribos asiáticas, sem, contudo, ser possível justificar esta distribuição alélica (SCACCHI et al., 2003).

Em relação às isoformas L e M são raros os dados acerca de sua distribuição nas diversas populações no mundo. Um estudo realizado em chineses e japoneses mostra o alelo L como o mais freqüente nessas populações (SUEHIRO et al., 2000, SANGHERA et al., 1998; ZHANG et al., 2006).

Na seção de anexos (Anexo H), há dois quadros com resultados de diversos estudos da distribuição das frequências alélicas dos polimorfismos do gene da PON1(L55M e Q192R) em diferentes populações.

1.3 PON2

Ainda são escassas as informações obtidas nos estudos sobre a PON2. Sabe-se que o RNA mensageiro da PON2 é amplamente expresso em diversos tecidos humanos, incluindo coração, cérebro, fígado, rim, pulmão, testículos, placenta que codifica uma proteína com massa molecular de aproximadamente 44 KDa (Ng et al., 2001; CAMPO et al., 2004; LI et al., 2003). A enzima PON2 (EC 3.1.8.1) parece possuir propriedades antioxidantes similares à PON1, entretanto, seu substrato *in vivo* ainda não foi identificado (CAMPO et al., 2004). Já foi relatado que a PON2 é capaz de diminuir o estresse oxidativo intracelular além de prevenir a oxidação da LDL-C mediada por células (Ng et al., 2001). Células que expressam PON2 em excesso são menos capacitadas para oxidar a LDL-C e apresentam um menor nível de estresse oxidativo intracelular quando expostas aos fosfolípidos oxidados ou peróxido de hidrogênio. Pelo fato da distribuição não ocorrer somente em células, mas também em diversos tecidos, a PON2 parece atuar na redução do estresse oxidativo intracelular ou no estresse oxidativo localizado (LI et al., 2003; AVIRAM et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2004). Assim, uma função da PON2 deve ser a ação antioxidante intracelular, protegendo as células do estresse oxidativo. Contudo, o

mecanismo pelo qual a PON2 exerce essa função é desconhecido e requer maiores estudos (Ng et al., 2001).

1.3.1 Polimorfismos do Gene PON2

PON2 é o segundo membro do conjunto de genes paraoxonase no cromossomo 7q21. 3-22. 1. O gene humano da PON2 exibe dois polimorfismos em comum, ambos causados por substituição de aminoácidos (Ng et al., 2001; LI et al., 2003). Os resíduos afetados estão na posição 148 e 311. Os alelos codificam glicina ou alanina no códon 148 (G148A) e cisteína ou serina no códon 311 (C311S) (LI et al., 2003).

Vários estudos mostram a associação entre polimorfismos na PON2 e variações nas lipoproteínas plasmáticas. O polimorfismo A148G está associado com variações nos níveis de colesterol total e LDL-C, níveis plasmáticos de glicose basal e variação de peso em recém-nascidos (HEGELE et al., 1997; HEGELE et al. 1998; LI et al., 2003). Enquanto polimorfismos na posição 311 têm sido associados com doença arterial coronariana, infarto isquêmico em pacientes com diabetes *mellitus* tipo 2 e redução de massa óssea em mulheres pós-menopausa (CHEN et al., 2003; KAO et al., 2002, WANG et al., 2003).

1.3.1.1 Distribuição em populações dos polimorfismos genéticos de PON2 nas posições A148G e C311S

Há poucos estudos em relação à distribuição alélica dos polimorfismos da PON2 no mundo (ACUÑA et al., 2004). Para a posição 148, indicam uma baixa frequência do alelo G em asiáticos e Oji-Cree (tribo indígena canadense) (HEGELE et al., 1997; ZHANG et al., 2006)

Na posição 311, o alelo S é o mais frequente nas populações afro-americanas, caucasianas e asiáticas, e não foram observadas diferenças na frequência alélica (CHAN et al., 2000; SANGHERA et al., 1998; HONG et al. 2001; ZHANG et al., 2006; LEUS et al., 1999, MOTTI et al. 2001; BORIGHT et al., 1998).

1.3.2 Associação de Polimorfismos nos genes da PON1 e PON2

Um polimorfismo comum que ocorre no códon 311 no gene da PON2, caracterizado pela troca do aminoácido cisteína (C) por serina (S), parece interagir com o alelo PON1-192R sendo, assim, fator de risco para doença coronariana (SANGHERA et al., 1998). Por outro lado, em estudo realizado por Leus et al., observou-se que o risco para doença coronariana associada ao alelo PON2 Ser311 estaria limitada aos indivíduos portadores do genótipo PON1 Leu/Leu 55/ Gln/Gln 192/ PON2 Ser/Ser 311 (LEUS et al., 2001).

1.4 PON3

A enzima PON3 (EC 3.1.8.1) é uma glicoproteína de 40-kDa com atividade esterase dependente de cálcio. Tem a capacidade de catalisar a hidrólise de um amplo espectro de substratos como: ésteres aromáticos,

lactonas e agentes farmacológicos. A PON3 é capaz de hidrolisar substratos de certas drogas como as derivadas das lactonas, como a mevastatina, lovastatina, espironolactonas, membros de 5 ou 6 anéis e lactonas com substitutos alifáticos. Por muito tempo, foi atribuída à PON1 uma atividade do tipo estatinase no plasma humano (BILLECKE et al., 2000), mas em 2004, Draganov e La Du verificaram que essa atividade era na verdade resultante de pequenas quantidades de PON3 extraídas de um preparo de PON1 purificada (DRAGANOV e LA DU, 2004).

Assim como a PON1, a PON3 encontra-se associada à fração de HDL-C, porém ausente na LDL-C, sendo que o sítio primário da expressão parece estar no fígado, apesar de já terem sido detectadas quantidades significativas do mRNA da PON3 no rim (CAMPO et al., 2004; LU et al., 2005). Ensaio *in vitro* demonstram que PON1 e PON3 inibem a oxidação de lípidos na LDL-C, e assim reduzem os níveis de lípidos oxidados que estão envolvidos no início do processo aterosclerótico (REDDY et al., 2001, DRAGANOV et al., 2000; LA DU, 2001; MACKNESS et al., 2001). Em contraste com a PON1, PON3 teria uma atividade arilesterase muito limitada, ausência da atividade paraoxonase, mas pode hidrolisar lactonas com maior rapidez. (Ng et al., 2001; DRAGANOV et al., 2000; LA DU, 2001)

Draganov et al, em 2000, demonstraram que a atividade sérica da PON3 no coelho, também está fortemente associada à fração HDL-C, sendo mais eficaz que a PON1 de coelho na proteção da LDL-C contra a oxidação induzida por cobre, neste modelo animal.

1.4.1 Polimorfismos do Gene PON3

Diferentemente da PON1 e PON2, até recentemente, não havia sido identificado algum tipo de polimorfismos na PON3. CAMPO et al. em 2004, detectou a substituição de uma serina por uma treonina no códon 311 (S/T311) e uma glicina por um ácido aspártico no códon 324 (G/D324) numa população no sul da Itália (CAMPO et al.,2004). Entretanto, dados e conseqüências funcionais desses dois polimorfismos não foram relatados (Ng et al., 2005).

1.5 CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS ÉTNICOS EM POPULAÇÕES

A espécie humana, com mais de 6 bilhões de membros, divide-se em muitas subpopulações distinguíveis, das quais as maiores denominam-se comumente raças. As raças são definidas como grupos populacionais grandes cujos *pools* gênicos diferem uns dos outros. Existem três divisões raciais básicas: brancos, negros e asiáticos (amarelos), cada uma delas possuindo numerosos subgrupos geneticamente diferentes. Com o passar dos anos cada grupo subdividiu-se em numerosas subpopulações distintas, denominadas grupos étnicos com seus próprios conjuntos típicos de freqüências genéticas (THOMPSON et al., 1991).

A caracterização de raça ou etnia tem sido freqüentemente requerida para descrever populações em análises epidemiológicas (ANDERSON e MOSCOU, 1998). A classificação por raça é baseada principalmente nas características fenotípicas como cor de pele, mas outras características

como cor e tipo de cabelo raramente são descritas. Raça refere-se a diferenças na biologia, enquanto etnia envolve diferenças de características em comum, incluindo ascendentes, origens geográficas, tradições culturais e língua (CALDWELL e POPENOE, 1995). É sugerido, que mais de uma fonte de informação seja usada para descrição da raça, incluindo auto-classificação étnica (MATTERS, 1996).

Avaliação da raça de acordo com a cor da pele, tipo de cabelo, formato de lábios e nariz e posição da maxila tem sido usada na identificação de indivíduos negros, brancos e mestiços. (KRIEGER et al., 1965) embora o critério para classificá-los venha sendo mal relatado (FERREIRA et al., 1999; LESSA e FONSECA, 1997). Um estudo realizado por Fuchs e colaboradores demonstrou que a avaliação racial, baseada na informação da raça dos ascendentes de um indivíduo, mostrou uma considerável concordância com a avaliação feita por um entrevistador treinado e com a auto-classificação quanto a raça (FUCHS et al., 2002).

1.5.1 Origem Étnica da População Brasileira

A população brasileira é de natureza triíbrida. Antes de ser “descoberto” o Brasil era habitado por nativos (ameríndios) divididos em diversas tribos. Exceto pelas invasões (temporárias) de franceses no Rio de Janeiro e de holandeses em Pernambuco, praticamente apenas os portugueses vieram para o Brasil até o início do século XIX e foi a partir da metade do século XIX, que o Brasil recebeu enormes levas de novos imigrantes, destacando-se portugueses e italianos seguidos de espanhóis,

alemães, japoneses e sírio-libaneses. Mas antes ainda, na segunda metade do século XVI, com a vinda dos escravos, a miscigenação estendeu-se aos africanos. Esses povos sofreram intensa miscigenação e por isso a população brasileira tem em sua composição linhagens genealógicas de ameríndios, europeus e africanos (PENA et al., 2000).

Segundo dados do censo demográfico populacional realizado pelo IBGE no ano 2000, a população brasileira era então composta de 53,74% de brancos; 6,21% de pretos; 0,45% de amarelos; 38,45% de pardos; 0,43% de indígenas e 0,71% não declararam. Para o município de São Paulo, a distribuição é de 66,97% de brancos; 5,05% de negros; 2% de amarelos; 24,97% de pardos; 0,18% de indígenas e 0,82% não declararam (IBGE – CENSO 2000).

No Brasil até o momento são poucos os estudos em relação à paraoxonase sendo que dois deles caracterizam a distribuição dos polimorfismos entre etnias. Allebrandt e colaboradores (ALLEBRANDT et al., 2002) realizaram em Curitiba – PR, um estudo em doadores de sangue que foram classificados em euro- e afro-brasileiros e revelou distribuições distintas para a PON1 entre a população de caucasianos, afro-americanos e asiáticos analisados, principalmente nos alelos referentes à posição 192, sendo a frequência do alelo Q menor nos afro-brasileiros (0,47) do que nos euro-brasileiros. Outro estudo realizado em dez tribos ameríndias amazônicas mostrou que os alelos L e R foram os mais observados com frequências de 0,97 e 0,73, respectivamente (dos SANTOS et al., 2005). Um estudo realizado por Oliveira et al., analisando os quatro polimorfismos em

pacientes brasileiros com alto risco de doença coronariana, considerou o polimorfismo no aminoácido da posição 55 do gene da PON1 preditivo de proteção contra esta patologia (OLIVEIRA et al., 2004).

1.6 OBJETIVO

Caracterizar as frequências das mutações Gln192Arg e Leu55Met no gene da PON1 e Ser311Cis e A148G no gene da PON2, bem como analisar a atividade das isoformas PON1Q, PON1R, PON1L e PON1M em uma população brasileira, da cidade de São Paulo, caracterizada fenotipicamente e através de questionários, quanto à sua origem étnica.

2 CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 POPULAÇÃO ESTUDADA

A frequência das mutações, bem como a atividade de PON1 foram estudadas em um grupo de 179 indivíduos saudáveis, doadores de sangue na Fundação Pró-Sangue/ Hemocentro de São Paulo. Este grupo foi composto por homens, que foram classificados fenotipicamente e através de um questionário em uma das seguintes populações: branca, negra e mulata. Junto com o questionário havia um termo de consentimento livre e esclarecido apresentado aos doadores, um modelo deste documento está na seção de anexos (anexo G).

A idade e a etnia, bem como as determinações de colesterol total, frações, e triglicérides dos doadores de sangue encontram-se listados na seção de anexos.

O projeto de pesquisa e o termo de consentimento livre e esclarecido deste estudo foram aprovados pela CAPPesq (Anexo F).

2.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Todos os doadores foram informados acerca da finalidade do trabalho e as eventuais dúvidas esclarecidas. Após aceitação do termo de consentimento livre e esclarecido, procedeu-se a coleta de sangue venoso periférico (Vacuum II), sendo 5 mL com anticoagulante EDTA e 10 mL em tubo sem anticoagulante. Imediatamente após a coleta, os tubos foram mantidos em gelo, numa temperatura aproximada de 0°C por até 60

minutos. Dentro deste período, foram centrifugados a 420 g durante 15 minutos a 8°C, visando aliquotar-se o soro (armazenados a – 20°C até o uso) e obter-se a purificação do DNA genômico no mesmo dia da coleta.

2.3 REAGENTES

Os reagentes utilizados na determinação da atividade da PON1 foram *paraoxon*, Cloreto de Cálcio, *Tris* (Sigma Chemical CO – St. Louis, EUA) e HCl (*Merck – Darmstadt, Germany*). Os reagentes utilizados na extração do DNA genômico foram: Sacarose e *Tris* (Sigma Chemical CO – St. Louis, EUA), EDTA e Proteinase K (Gibco/ BRL – Grand Island, NY, USA), Etanol P.A. (*Merck – Darmstadt, Germany*)

Os reagentes empregados na realização do PCR foram: *primers* obtidos da Operon Biotechnologies (Cologne, Alemanha); *Taq* DNA polimerase, dNTPs e tampão de PCR, marcadores de peso molecular de 50 pb, λ DNA *Hind III* e o λ DNA adquiridos da Invitrogen (Cidade, EUA), albumina bovina (Sigma Chemical CO – St. Louis, EUA). As enzimas de restrição *Hinf I* e *Fnu4HI* foram adquiridas da Pharmacia Biotech (Uppsala, Suécia) e da New England Biolabs (Beverly – Ma, EUA), respectivamente.

Os materiais utilizados na separação eletroforética e todos os outros reagentes empregados eram próprios para análise.

2.4 OBTENÇÃO DE DNA GENÔMICO A PARTIR DE CÉLULAS DE SANGUE PERIFÉRICO

As amostras de sangue, coletadas com anticoagulante EDTA, foram processadas conforme descrito por Miller et al. (MILLER et al., 1998) modificado. Neste método, há remoção de proteínas celulares pela desidratação e precipitação com solução saturada de NaCl.

A separação dos leucócitos e purificação do DNA genômico foi realizada em duplicata para cada amostra pesquisada.

Um mL de sangue foi diluído com 1 mL de tampão de lise de hemácias (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, sacarose 34 mM, MgCl₂ 10 mM, Triton X-100 1%), obtendo-se o sedimento de leucócitos após centrifugação por 10 minutos a 1.700 g em temperatura de 4°C. Os leucócitos foram, então, novamente ressuspensos em tampão de lise de hemácias e centrifugados por 5 minutos a 960 g em temperatura ambiente. Após remoção do sobrenadante, o sedimento foi ressuspenso em 750 µL de tampão TEN (Tris-HCl 10 mM, pH 8,2, EDTA 2 mM, NaCl 400 mM), mais 100 µL de SDS 10% e 125 µL de proteinase K (2mg/mL), homogeneizando-se e incubando-se a mistura por 1 hora a 56°C, visando à completa digestão das células lisadas. Adicionou-se, então, 250 µL de NaCl saturado, agitando-se vigorosamente por 15 segundos e sedimentando-se as proteínas através da centrifugação por 10 minutos a 960 g. Por precipitação, o DNA foi recuperado do sobrenadante, adicionando-se dois volumes de etanol absoluto e centrifugando-se por 5 minutos a 960g. Após, o DNA foi lavado com etanol 70%, a fim de remover-se o excesso de sal, submetido à secagem por 10 minutos em centrífuga a vácuo modelo *Speed Vac*

AES1010 (Savant – cidade, EUA) e reidratado em TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8, EDTA 1 mM).

2.5 QUANTIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO

A integridade do DNA genômico obtido a partir de leucócitos de sangue periférico foi avaliada em gel de agarose 1%. O gel empregado, com 5 mm de espessura e medindo 7 x 15 cm, continha brometo de etídeo (0,5 µg/mL) o qual, durante a eletroforese, intercala-se entre os nucleotídeos formando um complexo fluorescente mediante exposição à luz ultravioleta. O tampão utilizado foi TAE (Tris 40 mM, Acetato de sódio 5 mM e EDTA 1 mM) e a voltagem, constante, de 75V por 40 minutos.

Junto às amostras, foram aplicadas também seis amostras de DNA de fago λ (clind 1ts 857 SAM 7) íntegro (48.502 pb), de concentrações conhecidas – 200; 100; 50; 25; 12,5 e 6,25 ng/ 5µL – e, por comparação, foi possível estimar a concentração do DNA genômico. A verificação do tamanho do DNA, assim como sua integridade, foi feita pela comparação entre as migrações das amostras e os fragmentos do λ DNA digerido com *Hind III* (os quais variam entre 23.130 pb e 564 pb).

2.6 GENOTIPAGEM PARA OS POLIMORFISMOS

Foram amplificados fragmentos específicos para cada região pesquisada, os quais foram posteriormente digeridos por enzimas de restrição específicas, de modo a permitir diferenciarem-se os possíveis

genótipos para cada mutação estudada (análise do polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição – *RFLP*).

2.6.1 Determinação das mutações Q192R e L55M no gene da enzima paraoxonase 1 e C311S no gene da enzima paraoxonase 2 (PCR *multiplex*)

Realizou-se a análise destas mutações conforme descrito por Motti et al. (MOTTI et al., 2001). A técnica, de PCR *multiplex*, utiliza *primers mismatch* (despareados), desenhados de modo a introduzir um sítio de reconhecimento para *Hinf I* em um alelo de cada produto da PCR. Esta estratégia permitiu a identificação simultânea dos três polimorfismos da PON em um único ensaio de amplificação seguido de uma única análise de restrição (MOTTI et al., 2001).

Os produtos amplificados possuem 111 pb (mutação PON1-192), 144 pb (mutação PON1-55) e 196 pb (mutação PON2-311). Após a digestão com *Hinf I*, o fragmento de 111 pb gerou os fragmentos de 77 e 34 pb no caso do alelo R, o fragmento de 144 pb apresentou os fragmentos de 122 e 22 pb no caso do alelo L. Da mesma maneira, após digestão com a enzima, o fragmento de 196 pb (referente à mutação PON1-192) originou os fragmentos de 173 e 23 pb na presença do alelo S. No caso de indivíduos heterozigotos, os fragmentos digeridos apareceram juntos com as bandas não digeridas.

As seqüências de *primers* utilizadas foram (letras minúsculas representam os nucleotídeos despareados) (MOTTI et al., 2001):

PON1-55F (5'→3'): GAG TGA TGT ATA GCC CCA GTT TC;

PON1-55R (5'→3'): AGT CCA TTA GGC AGT ATC TCCg;

PON1-192F (5'→3'): TTG AAT GAT ATT GTT GCT GTG GGA CCT GAG;

PON1-192R (5'→3'): CGA CCA CGC TAA ACC CAA ATA CAT CTC CCA
GaA;

PON2-311 (5'→3'): GGT TCT CCG CAT CCA GAA CAT TgaA;

PON2-311 (5'→3'): TGT TAA GaT ATC GCA Cta TCA TGC C.

As amostras de DNA genômico de cada indivíduo foram submetidas à PCR em uma reação feita em volume de amplificação de 25 µL contendo Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, pH=8,3; 0,8 µg/µL final de albumina; MgCl₂ 7 mM; 600 µM de cada nucleotídeo trifosfato; 0,16 µM de cada *primer* PON1-192 e de cada *primer* PON1-55; 0,3 µM de cada *primer* PON2-311, 1 U de *Taq polimerase* e 1 µg de DNA genômico.

A amplificação envolveu uma desnaturação inicial das amostras à 95°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de 94°C por 1 minuto (desnaturação), 61°C por 45 segundos (anelamento) e 72°C por 45 segundos (extensão). O termociclador empregado foi um Peltier Thermal Cycler PTC-200 (MJ Research, EUA).

Os produtos da PCR foram então digeridos por 16 horas a 37°C com 2 U de enzima *Hinf I*, preparada em tampão Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, NaCl 60 mM, MgCl₂ 10 mM, β-ME 1mM. Após a digestão, foram diluídos 1:1 em tampão contendo 0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xileno cianol e glicerol 30%.

Na figura 1 estão esquematizados os possíveis perfis eletroforéticos de produtos amplificados empregando-se a PCR *multiplex*.

Polimorfismo PON2-311: Fragmento amplificado (196 pb) digerido com <i>Hinf I</i>			
Genótipo	S/S	C/S	C/C
	↓	↓	↓
Fragmento 196 pb	Não	Sim	Sim
Fragmento 173 pb	Sim	Sim	Não
Fragmento 23 pb	Sim	Sim	Não
Polimorfismo PON1-55: Fragmento amplificado (144 pb) digerido com <i>Hinf I</i>			
Genótipo	L/L	L/M	M/M
	↓	↓	↓
Fragmento 144 pb	Não	Sim	Sim
Fragmento 122 pb	Sim	Sim	Não
Fragmento 22 pb	Sim	Sim	Não
Polimorfismo PON1-192: Fragmento amplificado (111 pb) digerido com <i>Hinf I</i>			
Genótipo	Q/Q	Q/R	R/R
	↓	↓	↓
Fragmento 111 pb	Sim	Sim	Não
Fragmento 77 pb	Não	Sim	Sim
Fragmento 34 pb	Não	Sim	Sim

Figura 1 – Esquema dos perfis eletroforéticos possíveis para produtos amplificados na detecção dos polimorfismos PON1-192QR, PON1-55LM, PON2-311SC (multiplex)

Foram a seguir analisados por separação em gel de acrilamida a 6% (contendo uréia 8M em tampão TBE 0,5x), aplicando-se 5 μ L de cada amostra nos poços do gel de acrilamida. Também foram incluídos, no gel, 5 μ L de marcador de peso molecular de 50 pb e amostras de DNA genômico obtidos a partir de sangue total representando os possíveis genótipos das mutações PON1-192, PON1-55 e PON2-311, como controles. A separação foi realizada empregando-se uma corrida de 60 minutos a 60 W constantes. Foi utilizado um sistema de seqüenciamento modelo S2 (GIBCO, EUA).

A posterior observação das bandas foi obtida pela coloração com nitrato de prata 0,1% (BASSAM et al., 1991), obedecendo-se o seguinte protocolo: ácido acético 10% durante 20 minutos; 3 lavagens com água deionizada durante 2 minutos cada uma; nitrato de prata 0,1% mais formaldeído 0,1% durante 30 minutos; lavagem com água deionizada durante 10 segundos; carbonato de sódio 3% mais formaldeído 0,1% durante 5 minutos; ácido acético 10% durante 5 minutos; lavagem com água deionizada durante 5 minutos.

2.6.2 Determinação da mutação 148 no gene da enzima paraoxonase 2

A genotipagem para o códon 148 da PON2 foi realizada por PCR, conforme descrito por Hegele et al. (HEGELE et al. 1997). As seqüências de primers empregadas foram:

PON2-148-5': 5'-AGT GGA AAT TTT TAA ATT TGA AGC AG-3' e

PON2-148-3': 5'-TTG TTT GCA AAT GCT GGG GAT-3'.

Amostras de DNA genômico de cada indivíduo foram submetidas à PCR em uma reação feita em volume de amplificação de 25 μ L contendo Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, pH=8,3; 0,8 μ g/ μ L final de albumina; MgCl₂ 7 mM; 600 μ M de cada nucleotídeo trifosfato; 0,16 μ M de cada “*primer*” pertinente à PON2-148; 1 U de *Taq polimerase* e 1 μ g de DNA genômico.

A amplificação envolveu uma desnaturação inicial das amostras à 95°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de 94°C por 1 minuto (desnaturação), 61°C por 45 segundos (anelamento) e 72°C por 45 segundos (extensão). O termociclador empregado foi um Peltier Thermal Cycler PTC-200 (MJ Research, EUA).

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

O produto amplificado possui 130 pb. Deste modo, o fragmento digerido com a enzima, apresenta dois fragmentos menores para o amplicon derivado de um alelo PON2 codificando para A148 e um único fragmento para o amplicon derivado de um alelo PON2 codificando para G148 (HEGELE et al. 1997).

As amostras amplificadas e digeridas foram avaliadas em gel de agarose a 4%, contendo brometo de etídeo e visualizado em um sistema de documentação de géis VDS Image Master, Pharmacia Biotech (Uppsala, Suécia). Na figura 2 estão representados os possíveis genótipos para o polimorfismo PON2 148 A→G.

Polimorfismo PON2-148AG: Fragmento amplificado e digerido com <i>Fnu4HI</i>			
Genótipo	A/A	G/G	A/G
Fenótipo	Normal	Mutado	Heterozigoto
	↓	↓	↓
Fragmento maior	Não	Sim	Sim
Fragmento menor	Sim	Não	Sim

Figura 2. Esquema dos perfis eletroforéticos possíveis para PON2-148AG.

2.7. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE BASAL DA PON1 SÉRICA

A atividade basal da PON1 sérica foi determinada conforme métodos de Senti et al. (SENTI et al., 2003) e Agachan et al. (AGACHAN et al., 2004) modificados, empregando-se, como substrato, *paraoxon* (*O,O* dietil – *O* – paranitrofenil fosfato) (Sigma-Aldrich Chemical CO– St. Louis, EUA). A hidrólise enzimática do *paraoxon* libera *p*-nitrofenol, cuja taxa de formação foi determinada por espectrofotometria, forma mais comumente empregada para medir-se a atividade desta enzima.

O ensaio foi realizado em duplicata para cada amostra avaliada. Diluiu-se 25 µL de soro do paciente, descongelado em temperatura ambiente, em 500 µL de tampão (Tris-HCl 0,1M pH 8,05, CaCl₂ 2 mmol/L e *paraoxon* 5,5 mmol/L), transferindo-se 320 µL para um poço de microplaca de fundo chato. Procedeu-se, assim, a leitura das absorbâncias a cada

minuto, durante 10 minutos, em leitor de microplacas (Microplate Reader, Benchmark, BIO-RAD, Hercules – Ca, EUA) em comprimento de onda de 405 nm à 37°C.

O resultado foi expresso em U/L, onde 1 U/L é definida como 1 μmol de *p-nitrofenol* formada por minuto por litro de soro. Empregando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar do *p-nitrofenol* ($18,05 \times 10^3$). As equações abaixo demonstram os cálculos do fator e da atividade da PON1 sérica.

Cálculo do Fator:

$$\text{FATOR} = \frac{\text{VTR (mL)}}{\epsilon_{405} \cdot \text{VA (mL)} \cdot \text{E (cm)}}$$

$$\epsilon_{405} = 18050 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\text{VTR (volume total da reação)} = 500 \mu\text{L solução} + 25 \mu\text{L da amostra} = 525 \mu\text{L}$$

$$\text{VA (volume da amostra)} = 25 \mu\text{L}$$

$$\text{E (caminho óptico)} = 1 \text{ cm}$$

Substituindo os valores e ajustando para as unidades internacionais temos:

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

Cálculo da Atividade:

Atividade da Paraoxonase = Fator x $\Delta\text{abs}/\text{min}$ = $1163,43 \times \Delta\text{abs}$ $\text{nMol min}^{-1} \text{ mL}^{-1}$, onde Δabs = é média da variação das absorbâncias medidas a cada 1 minuto.

2.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises envolvendo a frequência dos genótipos, alelos e haplótipos, além do teste do χ^2 para avaliar a concordância dos valores da frequência alélica com o equilíbrio de Hardy – Weinberg, foram realizadas em um programa de computador desenvolvido pelo Prof. Dr. Paulo Alberto Otto no Departamento de Biologia - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

A comparação das frequências genóticas dos polimorfismos dos genes PON1 e PON2 entre as populações (brancos, mulatos e negros) foi realizada utilizando-se o teste exato de Fisher. Para determinar a influência dos polimorfismos do gene PON1 sobre os valores obtidos da atividade enzimática, foi empregado o teste de Kruskal – Wallis. Ambas as análises estatísticas foram realizadas sob supervisão e auxílio da Prof.^a Dr.^a Maria Regina Alves Cardoso - Departamento de Epidemiologia - Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, no programa STATA versão 9.0 (STATA, Corp.).

3. RESULTADOS

3.1 DISTRIBUIÇÃO DOS POLIMORFISMOS L55M E Q192R DO GENE PON1

Os polimorfismos nas posições 55 e 192 no gene da PON1 foram estudados em 179 doadores de sangue.

Em relação ao polimorfismo na posição 55 no gene da PON1, observou-se o genótipo LL em 83 doadores (46,4%), o genótipo heterozigoto (LM) em 81 (45,2%) e o genótipo MM em 15 (8,4%). A frequência do alelo L foi 68,9% e do alelo M, 31,1%.

Para o polimorfismo na posição 192 no gene da PON1 (Q192R), o genótipo QQ foi detectado em 58 (32,4%) dos doadores, o genótipo heterozigoto QR em 88 (49,2%) e o genótipo RR em 33 (18,4%) deles. A frequência para o alelo Q foi 57% e para o alelo R, 43%.

A associação dos polimorfismos nas posições 55 e 192 no gene da PON1 foi encontrada em 27 (15,1%) dos doadores com genótipo LL/RR, em 44 (24,6%) dos de genótipo LL/QR e em 12 (6,7%) indivíduos com genótipo LL/QQ. O genótipo LM/RR foi detectado em 6 (3,3%) indivíduos, o genótipo LM/QR em 41 (22,9%) e o genótipo LM/QQ em 34 (19%) deles. Por sua vez, o genótipo MM/QR foi observado em 3 (1,7%) dos doadores e o genótipo MM/QQ em 12 (6,7%). O genótipo MM/RR não foi observado na população estudada.

3.1.1 Distribuição dos Polimorfismos L55M e Q192R do Gene PON1 Entre os Grupos Étnicos

Foi avaliada a distribuição para os polimorfismos do gene PON1 estratificando-se a população total (n = 179) em três grupos étnicos: brancos, mulatos e negros. A tabela 1 representa a distribuição genotípica do polimorfismo da posição 55 (L55M) na população total e nos três grupos étnicos (brancos, mulatos, negros) e na tabela 2 a distribuição genotípica para o polimorfismo da posição 192 (Q192R) na população total e nos três grupos étnicos (brancos, mulatos, negros),

Tabela 1 - Frequência dos genótipos PON1 – L55M em uma população brasileira classificada em etnias (brancos, mulatos e negros)

Genótipo	Branco		Mulatos		Negros		Total	
	n	%	N	%	n	%	n	%
LL	27	34,2	36	50,0	19	67,9	83	46,4
LM	41	51,9	32	44,4	9	32,1	81	45,2
MM	11	13,9	4	5,6	0	0,0	15	8,4
Total	79	100	72	100	28	100	179	100

Teste exato de Fisher: $p=0,011$

Tabela 2 - Frequência dos genótipos PON1 – Q192R em uma população brasileira classificada em etnias (brancos, mulatos e negros)

Genótipo	Branco		Mulatos		Negros		Total	
	n	%	N	%	n	%	n	%
RR	10	12,7	14	19,4	9	32,1	33	18,4
QR	36	45,6	38	52,8	14	50,0	88	49,2
QQ	33	41,7	20	27,8	5	17,9	58	32,4
Total	79	100	72	100	28	100	179	100

Teste exato de Fisher: $p=0,062$

Os doadores classificados como brancos totalizaram 79 em relação ao polimorfismo do gene da PON1 na posição 55 (L55M) para o genótipo LL 27 (34,2%) doadores, com o genótipo LM 41 (51,9%) doadores e para o genótipo MM 11 (13,9%) doadores. O alelo L teve frequência de 60,1% e o alelo M 39,9%. Em relação ao polimorfismo da posição 192 a distribuição foi a seguinte: 10 (12,7%) com genótipo RR; os heterozigotos QR 36 (45,6%) e os homozigotos QQ 33 (41,7%). Quanto às frequências alélicas, o alelo Q apresentou 64,6% e o alelo R, 35,4%. Quando associados os polimorfismos tanto da posição 55 quanto da posição 192 os resultados da distribuição foram os seguintes: genótipo LL/QQ 4 (5,1%); LL/QR 14 (17,7%); para o genótipo LL/RR 9 (11,4%); LM/QQ 20 (25,3%), o mesmo valor 20 (25,3%) foi observado para o genótipo LM/QR, genótipo LM/RR 1 (1,3%); 9 (11,4%) com genótipo MM/QQ e para o genótipo MM/QR 2 (2,5%). Não foram observados doadores com o genótipo MM/RR. Quanto a frequência de haplótipos, 27,3% para o haplótipo LQ, para LR 32,8%; MQ totalizam 37,3% e apenas 2,6% o haplótipo MR.

Do total de doadores, 72 eram mulatos. A distribuição para o polimorfismo da posição 55 (L55M) neste grupo apresentou 36 (50%) dos doadores com o genótipo LL, os heterozigotos (LM) somaram 32 (44,4%) doadores e 4 (5,6%) doadores homozigotos MM. O alelo L teve frequência de 72% e o alelo M 28%. O polimorfismo para a posição 192 (Q192R) apresentou a seguinte distribuição: 20 (27,8%) dos doadores com genótipo QQ, 38 (52,8%) doadores o genótipo QR e 14 (19,4%) doadores homozigotos para o genótipo RR. Para o alelo Q foi obtida a frequência de

54,2% e para o alelo R 45,8%. Da associação dos polimorfismos da posição 55 e 192, a distribuição foi de 5 (6,9%) dos doadores para o genótipo LL/QQ; o genótipo LL/QR 21 (29,2%) dos doadores; com o genótipo LL/RR 10 (13,9%) doadores; 12 (16,7%) dos doadores o genótipo LM/QQ, o genótipo LM/QR 16 (22,2%) doadores, LM/RR foi o genótipo de 4 (5,5%) doadores; 3 (4,2%) dos doadores o genótipo MM/QQ e apenas 1 (1,4%) doador o genótipo MM/QR . Não foi observado doador com genótipo MM/RR. Em relação a frequência dos haplótipos, 31,5% o haplótipo LQ; 40,7% haplótipo LR, 22,7% totalizando o haplótipo MQ e 5,1% haplótipo MR.

Na tabela 3, a distribuição dos genótipos em relação à associação dos polimorfismos da posição 55 e 192 na população total e nos três grupos étnicos (brancos, mulatos e negros)

Tabela 3 – Distribuição das frequência genotípicas PON1 nas posições L55M e Q192R em uma população brasileira classificada em etnias (brancos, mulatos e negros)

Genótipos		Branco		Mulatos		Negros		Total	
55	192	N	%	n	%	N	%	n	%
LL	QQ	4	5,1	5	6,9	3	10,7	12	6,7
LL	QR	14	17,7	21	29,2	8	28,6	43	24,0
LL	RR	9	11,4	10	13,9	8	28,6	27	15,1
LM	QQ	20	25,3	12	16,7	2	7,1	34	19,0
LM	QR	20	25,3	16	22,2	6	21,4	42	23,5
LM	RR	1	1,3	4	5,5	1	3,6	6	3,3
MM	QQ	9	11,4	3	4,2	0	-	12	6,7
MM	QR	2	2,5	1	1,4	0	-	3	1,7
MM	RR	0	-	0	-	0	-	0	0
Total		79	100	72	100	28	100	179	100

E finalmente, 28 doadores negros. A distribuição do polimorfismo na posição 55 (L55M) apresentou 19 (67,9%) doadores com o genótipo LL, 9

(32,1%) doadores heterozigotos (LM) e nenhum com o genótipo MM. A frequência para o alelo L foi de 83,9% e para o alelo M 16,1%. Para a posição 192 (Q192R) a distribuição ficou da seguinte forma: 5 (17,9%) doadores homozigotos QQ, os heterozigotos (QR) totalizaram 14 (50%) e com o genótipo RR 9 doadores (32,1%). Para o alelo Q a frequência foi de 42,9% e no alelo R, 51,7%. Quando associamos os polimorfismos da posição 55 e da posição 192, 3 (10,7%) doadores apresentaram o genótipo LL/QQ, para o genótipo LL/QR 8 (28,6%) doadores, a mesma quantidade de doadores observado para o genótipo LL/RR 8 (28,6%), 2 (7,1%) doadores com o genótipo LM/QQ, com o genótipo LM/QR 6 (21,4%) doadores e apenas 1 (3,6%) doador com o genótipo LM/RR. Em doadores negros, não foram observados os genótipos MM/QR, MM/QQ e MM/RR. Para a frequência dos haplótipos, 29,8% foi a frequência do haplótipo LQ; 54,2% haplótipo LR; os haplótipos MQ e MR tiveram frequências nessa população de 13,1% e 2,9% respectivamente.

As frequências genotípicas encontradas apresentam distribuição diferente entre os três grupos étnicos tanto para o polimorfismo da posição 55 ($p=0,011$) quanto para o da posição 192 ($p=0,062$). No caso das frequências alélicas, também há diferenças entre os três grupos étnicos: alelo L/M ($p=0,002$) e alelo Q/R ($p=0,013$).

Para os locos (L/M) e (Q/R) do gene da PON1, as frequências alélicas observadas, apresentam-se de acordo com o equilíbrio de Hardy – Weinberg nos três grupos étnicos - cálculos e resultados demonstrados no anexo E.

A representação das distribuições dos haplótipos e alelos para os polimorfismos das posições 55 (L e M) e 192 (Q e R) do gene PON1 para os três grupos étnicos (brancos, mulatos, negros) estão representadas na tabela 4.

Tabela 4 – Distribuição dos haplótipos e alelos dos polimorfismos nas posições L55M e Q192R do gene PON1 em uma população brasileira classificada em etnias (brancos, mulatos e negros)

Haplótipos	Brancos	Mulatos	Negros
	%	%	%
LQ	27,3	31,5	29,8
LR	32,8	40,7	54,2
MQ	37,3	22,7	13,1
MR	2,6	5,1	2,9
Alelo L ^(*)	60,0	72,2	83,9
Alelo M ^(*)	40,0	28,8	16,1
Alelo Q ⁽⁺⁾	64,6	54,2	42,9
Alelo R ⁽⁺⁾	35,4	45,8	57,1

Calculados pelo teste de qui-quadrado:

^(*) $p=0,002$

⁽⁺⁾ $p=0,013$

3.2 DISTRIBUIÇÃO DOS POLIMORFISMOS A148G E C311S DO GENE PON2

Também foram avaliados em 179 doadores de sangue, os polimorfismos nas posições 148 e 311 no gene da PON2.

A distribuição dos possíveis genótipos para o polimorfismo na posição 148 no gene da PON2 (A148G) foi de 97 (54,2%) doadores com genótipo AA, 75 (41,9%) de indivíduos heterozigotos (AG) e outros 7 (3,9%) com

genótipo GG. As frequências para os alelos A e G foram 75,1% e 24,9%, respectivamente.

Em relação ao polimorfismo na posição 311 (C311S) do gene da PON2, o genótipo CC foi observado em 11 (6,2%) doadores, o genótipo heterozigoto (CS) em 94 (52,5%) doadores e o genótipo SS em outros 74 (41,3%). Para os alelos C e S, as frequências foram 32,4% e 67,6%, respectivamente.

A associação dos polimorfismos nas posições 148 (A148G) e 311 (C311S) no gene da PON2 apresentaram a seguinte distribuição: o genótipo AA/CC foi identificado em 3 (1,7%) doadores, o genótipo AA/CS em 28 (15,6%) deles e o genótipo AA/SS, em 66 (36,9%) indivíduos. O genótipo AG/CC foi detectado em 4 (2,2%) doadores, o genótipo AG/CS, em outros 63 (35,2%) e o genótipo AG/SS, encontrado em 8 (4,5%) indivíduos. Por fim, o genótipo GG/CC foi encontrado em 4 (2,2%) doadores e o genótipo GG/CS, em outros 3 (1,7%). A associação de genótipo GG/SS não foi aqui observada.

3.2.1 Distribuição dos Polimorfismos A148G e C311S do Gene PON2 Entre os Grupos Étnicos

Para os polimorfismos do gene PON 2, foi também avaliada a frequência genotípica e alélica e sua distribuição entre os três grupos étnicos (brancos, mulatos e negros). Nas tabelas 5 e 6 estão representadas as frequências genotípicas dos polimorfismos da posição 148 e da posição 311

no gene da PON2 e sua distribuição entre os três grupos étnicos (brancos, mulatos e negros) e na população total.

Tabela 5 - Frequência dos genótipos PON2 – A148G em uma população brasileira classificada em etnias (brancos, mulatos e negros).

Genótipo	Brancos		Mulatos		Negros		Total	
	n	%	N	%	n	%	n	%
A148G								
AA	48	60,7	36	50	13	46,4	97	54,2
AG	30	38	33	45,8	12	42,9	75	41,9
GG	1	1,3	3	4,2	3	10,7	7	3,9
Total	79	100	72	100	28	100	179	100

Teste exato de Fisher: $p=0,17$

Tabela 6 - Frequência dos genótipos PON2 – C311S em uma população brasileira classificada em etnias (brancos, mulatos e negros)

Genótipo	Brancos		Mulatos		Negros		Total	
	n	%	N	%	n	%	n	%
C311S								
CC	5	6,3	4	5,6	2	7,1	11	6,2
CS	37	46,8	41	56,9	16	57,1	94	52,5
SS	37	46,8	27	37,5	10	35,7	74	41,3
Total	79	100	72	100	28	100	179	100

Teste exato de Fisher: $p=0,72$

Para os 79 doadores da população branca os genótipos para o polimorfismo da posição 148 foram distribuídos da seguinte forma: 48 (60,7%) doadores homocigotos AA; os heterocigotos AG foram 30 (38%) doadores e com o genótipo GG apenas 1 (1,3%) doador. O alelo A teve a frequência de 79,7% e o alelo G de 20,3%. No polimorfismo da posição 311, 5 (6,3%) doadores com o genótipo CC; em 37 (46,8%) doadores o genótipo

CS e a mesma quantidade – 37 (46,8%) doadores – homozigotos SS. Para o alelo C a freqüência de 29,7% e para o alelo S, 70,3%. Na associação do polimorfismo da posição 148 e 311, 2 (2,5%) doadores foi observado o genótipo AA/CC; 12 (15,2%) doadores o genótipo AA/CS; com o genótipo AA/SS 34 (43%) doadores; em 3 (3,8%) doadores o genótipo AG/CC, o genótipo AG/CS em 24 (30,4%) doadores; com o genótipo AG/SS 3 (3,8%) doadores e apenas 1 (1,3%) doador o genótipo GG/CS. Os genótipos GG/CC e GG/SS, não foram observados em doadores da população branca. A freqüência do haplótipo AC foi de 12,5%; 67,2% no haplótipo AS, e para os haplótipos GC e GS: 17,2% e 3,1% respectivamente.

Nos 72 doadores classificados como mulatos, a distribuição alélica e genotípica do polimorfismo da posição 148 foi a seguinte: 36 (50%) doadores apresentaram o genótipo AA, os heterozigotos AG somaram 33 (45,8%) doadores e os homozigotos GG 3 (4,2%) doadores. A freqüência do alelo A foi de 72,9% e do alelo G 27,1%. Para o polimorfismo da posição 311, 4 (5,6%) doadores com genótipo CC, 41 (56,9%) doadores heterozigotos CS e 27 (37,5%) doadores homozigotos SS. Para o alelo C a freqüência foi de 34% e alelo S 66%. Da associação do polimorfismo da posição 148 com o da posição 311, 13 (18%) doadores tinham o genótipo AA/CS; com o genótipo AA/SS, 23 (31,9%) doadores, em apenas 1 (1,4%) doador o genótipo AG/CC; 28 (38,9%) doadores o genótipo AG/CS, com o genótipo AG/SS 4 (5,6%) doadores e 3 (4,2%) doadores duplo homozigotos GG/CC. Para os doadores da população de mulatos não foram observados os genótipos AA/CC, GG/CS e GG/SS. Para os haplótipos, a freqüência do

haplótipo AC corresponde a 10,1%; para o haplótipo AS, 62,8%; 23,9% o haplótipo GC e a frequência de 3,2% para o haplótipo GS.

Na tabela 7, os dados de frequência genotípica e a distribuição entre os grupos étnicos (brancos, negros e mulatos) e população total ao associarem-se os dois polimorfismos (A148G e C311S) do gene da PON2.

Tabela 7 - Distribuição das frequências genotípicas PON2 nas posições A148G e C311S em uma população brasileira classificada em etnias (brancos, mulatos e negros)

Genótipos		Brancos		Mulatos		Negros		Total	
148	311	N	%	n	%	n	%	n	%
AA	CC	2	2,5	0	-	1	3,6	3	1,7
AA	CS	12	15,2	13	18,0	3	10,7	28	15,6
AA	SS	34	43,0	23	31,9	9	32,1	66	36,9
AG	CC	3	3,8	1	1,4	0	-	4	2,2
AG	CS	24	30,4	28	38,9	11	39,3	63	35,2
AG	SS	3	3,8	4	5,6	1	3,6	8	4,5
GG	CC	0	-	3	4,2	1	3,6	4	2,2
GG	CS	1	1,3	0	-	2	7,1	3	1,7
GG	SS	0	-	0	-	0	-	0	0
Total		79	100	72	100	28	100	179	100

No caso dos 28 doadores classificados como negros, a distribuição genotípica e alélica para o polimorfismo da posição 148, 13 (46,4%) doadores apresentaram o genótipo AA, o genótipo AG foi observado em 12 (42,9%) doadores e 3 (10,7%) doadores homocigotos GG. No polimorfismo da posição 311, em 2 (7,1%) doadores o genótipo CC; os heterocigotos CS somaram 16 (57,1%) doadores e com o genótipo SS, 10 (35,7%) doadores. Quando em associação o polimorfismo da posição 148 com o da posição 311 a distribuição foi a seguinte: com o genótipo AA/CC apenas 1 doador

(3,6%); 3 (10,7%) doadores apresentaram o genótipo AA/CS; com o genótipo AA/SS, 9 (32,1%) doadores; em 11 (39,3%) doadores o genótipo AG/CS, com o genótipo AG/SS 1 (3,6%) doador, a mesma quantidade – 1 (3,6%) doador – para o genótipo GG/CC e 2 (7,1%) doadores com o genótipo GG/CS. Na população de doadores negros, não foram observados os genótipos AG/CC e GG/SS. A distribuição da frequência dos haplótipos na população negra foi de 9,7% para o haplótipo AC; 58,2% no haplótipo AS; 26,0% para o haplótipo GC e com 6,1% haplótipo GS.

Para os locos (A/G) e (C/S) do gene da PON2, as frequências alélicas observadas, apresentam-se de acordo com o equilíbrio de Hardy – Weinberg para os três grupos étnicos – cálculos e resultados no anexo E.

Na tabela 8, a distribuição nos três grupos étnicos (brancos, mulatos e negros) dos haplótipos e alelos dos polimorfismos para as posições 148 (A e G) e 311 (C e S) do gene PON2.

Tabela 8 - Distribuição dos haplótipos e alelos dos polimorfismos do gene PON2 nas posições A148G e C311S em uma população brasileira classificada em etnias (brancos, mulatos e negros)

Haplótipos	Brancos	Mulatos	Negros
	%	%	%
AC	12,5	10,1	9,7
AS	67,2	62,8	58,2
GC	17,2	23,9	26,0
GS	3,1	3,2	6,1
Alelo A	79,7	72,9	67,9
Alelo G	20,3	27,1	32,1
Alelo C	29,7	34,0	35,7
Alelo S	70,3	66,0	64,3

As freqüências genóticas encontradas não demonstram diferença na distribuição entre os três grupos étnicos, nem para o polimorfismo da posição 148 ($p=0,17$) e nem para os da posição 311 ($p=0,72$).

3.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE BASAL DA PON1 SÉRICA

A determinação da atividade basal da PON1 sérica dos doadores foi avaliada usando-se o *paraoxon* como substrato. Os 179 doadores avaliados foram classificados de acordo com a genotipagem para os polimorfismos da posição 55 (L/M) e 192 (Q/R) no gene da PON1. Na tabela 9 estão representados os valores das medianas referentes à atividade enzimática da PON1 com os valores (mínimo e máximo) das isoformas da enzima paraoxonase resultantes dos polimorfismos do gene PON1 para a posição 55 (L/M) e 192 (Q/R).

Tabela 9 – Mediana da atividade basal sérica da PON1 para os polimorfismos da posição L55M e Q192R

Genótipos	n	Mediana dos valores da atividade basal da PON1 sérica em U/L (mín. – máx.)	<i>P</i> *
55			
LL	83	152 (25 – 412)	<0,001
LM	81	77 (10 – 277)	
MM	15	53 (33 – 243)	
Total	179		
192			
QQ	58	53 (10 – 202)	<0,001
QR	88	131,5 (28 – 290)	
RR	33	216 (33 – 412)	
Total	179		

* Calculado pelo teste de Kruskal-Wallis.

Para o polimorfismo da posição 55 do gene da PON1 (L55M), os 83 doadores homocigotos para o alelo L (LL), apresentaram mediana de 152

U/L e valores mínimo e máximo, de 25 U/L e 412 U/L; para os 81 heterozigotos (LM) a mediana foi de 77 U/L, o valor mínimo 10 U/L e o máximo de 277 U/L e a mediana de 53 U/L e com valores mínimo sendo 33 U/L e o máximo 243 U/L, para os 15 homozigotos MM.

Os valores da mediana da atividade em relação ao polimorfismo da posição 192 (Q192R) mostra mediana de 53 U/L e valores mínimo e máximo de 10 U/L e 202 U/L respectivamente; para os 58 doadores com o genótipo QQ, os 88 heterozigotos com genótipo QR obtiveram mediana de 131,5 U/L com intervalo de valores variando de 28 U/L até 290 U/L e os 33 homozigotos para o genótipo RR, a mediana de 216 U/L num intervalo com valor mínimo de 33 U/L e valor máximo 412 U/L.

4 DISCUSSÃO

Investigações há mais de duas décadas vêm permitindo um melhor conhecimento da função dos genes da paraoxonase, em especial da PON1, no metabolismo de inseticidas organofosforados, lípides oxidados e medicamentos. A caracterização dos polimorfismos que afetam os níveis séricos e a capacidade catalítica da enzima, também tem auxiliado no entendimento do papel determinado pela variabilidade gênica da PON1 ao conferir susceptibilidade ou proteção contra alguns agentes tóxicos e em certas patologias (COSTA et al., 2003; COSTA et al., 2005). A proteção contra organofosfatos dependerá não apenas da quantidade de enzima presente no sangue ou nos tecidos, mas também da isoforma correspondente. Assim, a quantidade e a qualidade da enzima PON1 devem ser consideradas ao avaliar a função protetora contra compostos que podem servir como substratos que serão cataliticamente inativados pela enzima (LA DU et al., 1999). A concentração (cerca de 40 vezes) e a atividade da enzima (acima de 13 vezes) apresentam significativas variações nas diferentes populações humanas, parte dessa variação é explicada pelos polimorfismos das posições 55 e 192 no gene PON1 e outros que ainda estão por serem caracterizados e, também por fatores endógenos e exógenos que interferem no nível sérico e na atividade enzimática (RICHTER e FURLONG, 1999; COSTA et al., 2003; COSTA et al., 2005).

O presente estudo verifica a distribuição dos polimorfismos do gene PON1 nas posições 55 (L/M) e 192 (Q/R); do gene PON2 nas posições 148 (A/G) e

311 (C/S) e a análise da atividade das isoformas da enzima PON1 numa população de brasileiros na cidade de São Paulo classificada etnicamente. Os critérios utilizados para classificação da população em grupos étnicos (brancos, mulatos e negros) foram os mesmos adotados por outros autores em trabalhos nacionais (KRIEGER et al., 1965; BYDLOWSKI et al., 2001; FUCHS et al. 2002) sendo a auto-classificação quanto a raça, o critério utilizado pelo IBGE na realização do censo populacional (METODOLOGIA DO CENSO DEMOGRÁFICO 2000, 2003). A diferença observada entre o número de indivíduos negros em relação aos brancos e mulatos, pode ser justificada através da composição da população ao final do século XX que contava com 62,6% de caucasianos, 5,8% de negros, 30,8% de mulatos e 0,8% de descendentes asiáticos (BYDLOWSKI et al., 2003).

A frequência dos alelos do gene da PON1 apresenta considerável variabilidade entre diferentes populações. Vários estudos populacionais para o polimorfismo do gene PON1 na posição 192 (Q/R) mostram maior predominância do alelo R em algumas populações asiáticas (japoneses e chineses) e africanas principalmente na região da África central (Gana e Benin), enquanto o alelo Q parece ser mais frequente na Europa e América do Norte (ROY et al., 1991; KO et al., 1998; IMAI et al., 2000; SCACCHI et al., 2003; LI et al., 2003; DRAGANOV e LA DU, 2004). Já para o polimorfismo da posição 55 (L/M), são mais escassos os estudos sobre a distribuição dos alelos nas diversas populações, no entanto, o alelo L parece ser predominante entre chineses (96%) e japoneses (91% -94%) e também em caucasianos (67% - 74%) numa frequência um pouco menor quando

comparada aos asiáticos (DRAGANOV e LA DU, 2004). Estudos realizados em alguns países do continente americano mostram o alelo Q como o mais freqüente em norte-americanos, costarriquenhos e chilenos. Já em afro-americanos e em índios Cayapa (tribo equatoriana) e Oji – Cree (tribo canadense) o alelo R é o que predomina. Há ainda, populações (mexicanos e peruanos) em que há muito pouca (ou inexistente) diferença na distribuição desses alelos (SCACCHI et al., 2003; ACUÑA et al., 2004; ROJAS-GRACIA et al., 2005; CATANO et al. 2006). No Brasil, Santos e colaboradores, num estudo realizado entre dez tribos ameríndias amazônicas em Belém, capital do estado do Pará, demonstra que os alelos L com 97% (posição 55) e R (posição 192) com 73% são os mais freqüentes. Outro estudo em Curitiba – PR, Allebrandt e colaboradores, realizado em Euro – e Afro – brasileiros mostram haver significativa diferença na distribuição genotípica e alélica entre essas populações, exceto para os genótipos da posição 55 (L/M) gene PON1. No presente estudo, para a população total os genótipos mais freqüentes para o polimorfismo da posição 55 são LL (46,4%) e LM (45,2%) e para o polimorfismo da posição 192, o genótipo QR (49,2%), essa distribuição se deve muito provavelmente ao fato da população ser miscigenada. No entanto, ao compararmos as distribuições genotípicas entre as diferentes etnias, observa-se diferença estatisticamente significativa na distribuição dos genótipos para os polimorfismos tanto da posição 55 quanto da posição 192. Além disso, há uma maior freqüência dos alelos L (80%) para a posição 55 e R (57,1%) para a posição 192 em doadores negros e

uma frequência mais baixa (60,0%) para o alelo L em doadores brancos sendo na posição 192 mais freqüente o alelo Q (64,6%).

Ainda são poucas as informações sobre o gene da PON2, no entanto os polimorfismos nas posições 148 (A/G) e 311 (C/S) desse gene têm sido associados a numerosas condições fisiopatológicas como a variações no metabolismo e níveis plasmáticos de lipoproteínas e glicose (LI et al., 2003; Ng et al., 2005). Há ainda estudos que associam uma combinação entre polimorfismos do gene da PON2, com os do gene da PON1 a uma maior predisposição a doença coronariana (SANGHERA et al., 1998; LEUS et al., 2001).

Diferentemente do que ocorre com os polimorfismos do gene da PON1 (posição 192 e 55), são poucas as informações sobre a distribuição alélica e genotípica dos polimorfismos do gene da PON2 entre diversas as populações. No entanto, resultados dos estudos existentes mostram não haver diferenças na distribuição de nenhum dos dois polimorfismos do gene da PON2 (posição 148 e 311). Para a posição 148 (A/G) o alelo G apresenta menor frequência entre índios Oji-Cree (tribo canadense) e para o polimorfismo da posição 311 (C/S), o alelo S apresenta maior frequência em asiáticos, afro-americanos e caucasianos (HEGELE et al., 1997; CHAN et al., 2000; SANGHERA et al., 1998; HONG et al. 2001; ZHANG et al., 2006; LEUS et al., 1999, MOTTI et al. 2001; BORIGHT et al., 1998). Estudos realizados em populações do continente americano, mostram em chilenos, o alelo S sendo o mais freqüente na posição 311 (ACUÑA et al., 2004) e outro, realizado no Brasil (Campinas-SP), obteve maior frequência o alelo A

(posição 148) e alelo S (posição 311) (OLIVEIRA et al., 2003). Considerando a população total, o presente estudo, tem os genótipos AA (54,2%) na posição 148 e CS (52,5%) na posição 311 como os mais freqüentes para os polimorfismos do gene PON2, não apresentando diferenças na distribuição alélica e genotípica ao estratificarmos a população em brancos, mulatos e negros.

Apesar da variedade de substratos que podem ser hidrolisados pela enzima PON1, o *paraoxon* foi o utilizado para a determinação da atividade enzimática. Na determinação da atividade basal sérica enzimática, as isoformas L e R - resultantes dos genótipos LL (posição 55) e RR (posição 192) respectivamente – apresentaram maior atividade quando comparadas às outras isoformas. Como já mencionado, os polimorfismos no gene PON1 da bem como fatores endógenos e exógenos podem exercer influência tanto no nível sérico quanto na atividade da enzima e apesar disso, esses resultados são concordantes com estudos que apontam que o *paraoxon* é hidrolisado cerca de seis vezes mais rápido pela isoforma PON1_{192R} em relação a isoforma PON1_{192Q} e que a isoforma PON1_{55M} é associada a uma menor concentração enzimática e menor atividade sérica, já a isoforma PON1_{55L}, está relacionada a maior atividade e nível sérico da enzima (BROPHY et al., 2000; JAMES e DEAKIN, 2004; DRAGANOV e LA DU, 2004). Um outro detalhe que merece atenção é que as amostras de soro são provenientes de doadores de sangue e, portanto, não estavam em jejum alimentar, no entanto Fuhrman e colaboradores observaram que não há

alterações significativas na atividade sérica da PON1 nos indivíduos em estado pós prandial (FUHRMAN et al., 2005).

5 CONCLUSÃO

No gene PON1 os genótipos mais freqüentes na população são:

- LL (46,4%) e LM (45,2%) na posição 55 (L55M);
- QR (49,2%) na posição 192 (Q192R).
- Entre os grupos étnicos (brancos, mulatos e negros) há diferenças quanto a distribuição das freqüências alélicas e genotípicas dos polimorfismos do gene PON1.

No gene PON2 os genótipos mais freqüentes na população são:

- AA (54,2%) na posição 148 (A148G);
- CS (52,5%) na posição 311 (C311S).
- Não há diferença na distribuição genotípica entre os grupos étnicos (brancos, mulatos e negros) para os polimorfismos do gene PON2.

Em relação à atividade enzimática da PON1, as isoformas resultantes dos genótipos LL (L55M) e RR (Q192R) obtiveram maior atividade, hidrolisam o *paraoxon* mais eficazmente.

6 ANEXOS

Anexo A: Idade, valor da atividade basal da PON1 sérica (U/L) e genótipos para os polimorfismos L55M, Q192R na PON1 e A148G, C311S na PON2 nos doadores brancos (n =79).

Amostras	Idade	Atividade	PON1		PON2	
			Q 192 R	L 55 M	C 311 S	A 148 G
Doa – 008	28	63	QQ	LM	SS	AA
Doa – 016	36	34	QQ	LL	CS	AG
Doa – 031	57	27	QQ	LM	SS	AA
Doa – 044	20	28	QR	LM	SS	AA
Doa – 048	50	79	QR	LM	SS	AA
Doa – 079	26	50	QQ	LM	CS	AG
Doa – 080	30	117	RR	LM	SS	AA
Doa – 086	27	124	QR	LM	CS	AG
Doa – 112	30	96	QR	LM	SS	AA
Doa – 114	51	83	QQ	LL	CS	GG
Doa – 115	37	36	QR	LM	SS	AA
Doa – 116	27	53	QQ	LM	CS	AA
Doa – 118	61	222	QR	LL	CS	AG
Doa – 120	36	223	RR	LL	SS	AA
Doa – 124	52	121	QR	LM	CS	AA
Doa – 125	29	202	QQ	MM	SS	AA
Doa – 129	38	60	QQ	LM	SS	AA
Doa – 130	26	262	RR	LL	SS	AA
Doa – 133	46	177	QR	LL	CS	AG
Doa – 135	33	135	QR	LM	SS	AA
Doa – 136	36	94	QR	LM	SS	AA
Doa – 137	25	57	QQ	MM	CC	AA
Doa – 138	27	142	QR	LL	CC	AG

continua

Amostras	Idade	Atividade	PON 1		PON 2	
			Q 192 R	L 55 M	C 311 S	A 148 G
Doa – 139	30	55	QQ	LM	CC	AG
Doa – 141	37	131	QR	LL	SS	AA
Doa – 142	45	243	QR	MM	SS	AA
Doa – 146	27	56	QQ	LM	SS	AA
Doa – 150	24	137	QR	MM	CS	AG
Doa – 151	32	262	RR	LL	SS	AA
Doa – 153	25	55	QQ	LM	SS	AA
Doa – 163	27	77	QQ	LL	CS	AG
Doa – 165	38	185	RR	LL	CS	AA
Doa – 166	46	127	QR	LL	CS	AG
Doa – 169	41	328	RR	LL	CC	AG
Doa – 170	26	77	QQ	LM	SS	AA
Doa – 179	43	69	QQ	LL	CS	AA
Doa – 183	57	139	QR	LM	CS	AA
Doa – 184	26	39	QQ	MM	SS	AG
Doa – 185	46	46	QQ	LM	CS	AA
Doa – 186	45	128	QR	LM	SS	AG
Doa – 187	42	196	QR	LL	CS	AA
Doa – 188	34	131	QR	LM	CS	AG
Doa – 190	23	53	QQ	MM	SS	AA
Doa – 191	48	290	QR	LL	CS	AG
Doa – 195	40	67	QQ	LM	SS	AA
Doa – 197	42	198	QR	LM	CS	AG
Doa – 205	65	198	QR	LM	CS	AA
Doa – 207	31	220	QR	LL	CS	AA
Doa – 208	29	148	QR	LL	SS	AA
Doa – 209	33	66	QQ	LM	SS	AA
Doa – 210	21	43	QQ	MM	SS	AA
Doa – 220	38	154	QR	LM	SS	AA

continua

Amostras	Idade	Atividade	PON 1		PON 2	
			Q 192 R	L 55 M	C 311 S	A 148 G
Doa – 222	50	72	QQ	MM	SS	AA
Doa – 225	59	156	QR	LM	CS	AG
Doa – 226	27	53	QQ	MM	SS	AG
Doa – 227	28	125	QR	LM	SS	AA
Doa – 228	53	275	RR	LL	CS	AA
Doa – 230	19	47	QQ	MM	CC	AA
Doa – 231	33	373	RR	LL	SS	AA
Doa – 234	33	59	QQ	LM	CS	AG
Doa – 236	52	43	QQ	LM	CS	AG
Doa – 237	24	111	QR	LL	SS	AA
Doa – 238	28	33	QQ	LM	SS	AA
Doa – 241	40	243	QR	LL	CS	AG
Doa – 242	42	104	QR	LM	CS	AG
Doa – 243	54	44	QQ	MM	SS	AA
Doa – 245	23	52	QQ	LM	CS	AG
Doa – 246	29	163	QR	LM	CS	AA
Doa – 247	20	54	QQ	LM	CS	AG
Doa – 253	28	236	QR	LL	CS	AA
Doa – 255	31	135	QR	LL	CS	AG
Doa – 257	28	66	QQ	LM	SS	AA
Doa – 261	62	85	QR	LL	CS	AG
Doa – 262	32	363	RR	LL	CS	AG
Doa – 264	32	161	QR	LM	SS	AA
Doa – 265	29	59	QQ	LM	CS	AG
Doa – 266	44	126	RR	LL	SS	AA
Doa – 267	38	96	QQ	LM	CS	AG
Doa – 271	29	181	QR	LL	CS	AG

Determinação da atividade basal da paraoxonase sérica, usando como substrato o *paraoxon*, resultado expresso em U/L. **PON1-192**: polimorfismo PON1 Q192R (QQ: homozigoto mutado; QR: heterozigoto; RR: homozigoto R); **PON1-55**: polimorfismo

PON1 L55M (LL: homozigoto; LM: heterozigoto; MM: homozigoto mutado); **PON2-148**: polimorfismo PON2 A148G (AA: homozigoto; AG: heterozigoto; GG: homozigoto mutado); **PON2-311**: polimorfismo PON2 C311S (CC: homozigoto mutado; CS: heterozigoto; SS: homozigoto).

Anexo B: Idade, valor da atividade basal da PON1 sérica (U/L) e genótipos para os polimorfismos L55M, Q192R na PON1 e A148G, C311S na PON2 nos doadores mulatos (n =72).

Amostras	Idade	Atividade	PON1		PON2	
			Q 192 R	L 55 M	S 311 C	A148 G
Doa – 007	22	67	QR	LM	CS	AG
Doa – 010	45	93	QR	LM	CS	AG
Doa – 012	39	25	QQ	LL	SS	AA
Doa – 014	40	90	RR	LM	CC	AG
Doa – 015	48	82	QR	LM	CS	AG
Doa – 020	21	55	QR	LM	SS	AG
Doa – 021	40	56	QR	LM	SS	AA
Doa – 029	36	73	QQ	LL	CC	GG
Doa – 033	29	10	QQ	LM	SS	AA
Doa – 036	29	79	QR	LM	SS	AA
Doa – 039	36	131	RR	LL	SS	AG
Doa – 040	25	71	RR	LM	CS	AG
Doa – 042	28	69	QR	LM	SS	AA
Doa – 045	19	52	QQ	LM	CS	AG
Doa – 046	34	38	QQ	LM	CS	AG
Doa – 047	28	33	QQ	MM	SS	AA
Doa – 049	21	26	QQ	LL	CC	GG
Doa – 050	20	42	QQ	LL	CS	AG
Doa – 051	29	160	RR	LL	CS	AG
Doa – 053	33	107	RR	LL	SS	AA
Doa – 055	37	113	QR	LM	SS	AA
Doa – 058	54	152	RR	LL	SS	AA
Doa – 061	50	94	QR	LL	CS	AG
Doa – 062	36	90	QR	LL	SS	AA
Doa – 064	26	49	RR	LL	SS	AA

continua

Amostras	Idade	Atividade	PON1		PON2	
			Q 192 R	L 55 M	S 311 C	A148 G
Doa – 065	19	33	QQ	MM	CS	AG
Doa – 067	42	46	QQ	LM	SS	AA
Doa – 082	30	109	QR	LM	CS	AG
Doa – 085	35	141	QR	LL	CS	AG
Doa – 108	33	118	QR	LM	CS	AA
Doa – 110	43	54	QQ	LL	CS	AG
Doa – 119	41	138	RR	LM	CS	AA
Doa – 121	29	55	QQ	LM	CS	AG
Doa – 122	20	172	QR	LL	CS	AA
Doa – 123	30	146	QR	LL	CS	AA
Doa – 126	23	48	QQ	LM	CS	AA
Doa – 127	30	59	QQ	LM	CS	AG
Doa – 128	33	124	QR	LL	CS	AG
Doa – 131	37	222	QR	LL	CS	AG
Doa – 132	30	152	QR	LL	CS	AG
Doa – 134	39	164	QR	LL	CS	AG
Doa – 140	28	98	QR	LL	SS	AA
Doa – 145	32	33	RR	LL	SS	AA
Doa – 147	32	37	QQ	LM	CS	AA
Doa – 149	32	130	QR	MM	CS	AA
Doa – 152	23	21	QQ	LM	SS	AA
Doa – 154	22	226	RR	LL	CS	AG
Doa – 155	23	155	QR	LM	CS	AG
Doa – 156	27	175	QR	LL	CS	AA
Doa – 160	50	163	QR	LL	CS	AG
Doa – 162	38	153	QR	LM	SS	AA
Doa – 164	32	130	QR	LL	CS	AG
Doa – 167	34	287	RR	LL	CS	AG

continua

Amostras	Idade	Atividade	PON1		PON2	
			Q 192 R	L 55 M	S 311 C	A148 G
Doa – 168	30	96	QR	LL	CS	AA
Doa – 171	21	206	QR	LL	CS	AA
Doa – 173	35	143	QR	LM	CS	AA
Doa – 175	26	64	QQ	LM	SS	AG
Doa – 177	49	230	QR	LL	CC	GG
Doa – 194	58	34	QQ	LM	CS	AG
Doa – 196	60	242	QR	LL	SS	AA
Doa – 204	25	145	RR	LM	SS	AA
Doa – 211	34	58	QQ	MM	CS	AA
Doa – 215	30	125	QR	LL	SS	AA
Doa – 216	27	160	QR	LL	SS	AA
Doa – 218	43	132	QR	LM	SS	AG
Doa – 224	32	349	RR	LL	CS	AG
Doa – 229	29	173	RR	LL	CS	AA
Doa – 232	35	107	QR	LL	SS	AA
Doa – 233	58	48	QQ	LM	SS	AA
Doa – 235	58	99	QR	LL	CS	AG
Doa – 244	22	200	QR	LM	CS	AG
Doa – 263	28	131	QR	LM	SS	AA

Determinação da atividade basal da paraoxonase sérica, usando como substrato o *paraoxon*, resultado expresso em U/L. **PON1-192**: polimorfismo PON1 Q192R (QQ: homozigoto mutado; QR: heterozigoto; RR: homozigoto R); **PON1-55**: polimorfismo PON1 L55M (LL: homozigoto; LM: heterozigoto; MM: homozigoto mutado); **PON2-148**: polimorfismo PON2 A148G (AA: homozigoto; AG: heterozigoto; GG: homozigoto mutado); **PON2-311**: polimorfismo PON2 C311S (CC: homozigoto mutado; CS: heterozigoto; SS: homozigoto).

Anexo C: Idade, valor da atividade basal da PON1 sérica (U/L) e genótipos para os polimorfismos L55M, Q192R na PON1 e A148G, C311S na PON2 nos doadores negros (n = 28).

Amostras	Idade	Atividade	PON1		PON2	
			Q 192 R	L 55 M	C 311 S	A148G
Doa – 019	54	64	QR	LL	SS	AA
Doa – 028	41	101	RR	LL	CS	AG
Doa – 032	28	93	QR	LL	CS	AG
Doa – 041	51	53	QR	LM	SS	AA
Doa – 043	32	77	QR	LM	CS	AG
Doa – 052	32	94	RR	LL	CS	AG
Doa – 056	32	114	QR	LM	SS	AA
Doa – 060	35	34	QQ	LM	SS	AA
Doa – 143	35	222	QR	LM	SS	AA
Doa – 157	38	277	RR	LM	CS	GG
Doa – 158	39	358	RR	LL	CS	AG
Doa – 159	24	320	RR	LL	CS	AG
Doa – 161	38	165	QR	LL	CS	GG
Doa – 176	55	76	QQ	LL	CC	AA
Doa – 180	32	79	QQ	LL	SS	AG
Doa – 189	43	290	RR	LL	SS	AA
Doa – 199	24	158	QR	LM	SS	AA
Doa – 201	22	67	QQ	LL	CS	AG
Doa – 202	43	244	RR	LL	CS	AA
Doa – 219	31	412	RR	LL	CS	AA
Doa – 223	43	218	QR	LL	CS	AG
Doa – 249	20	98	QR	LL	CS	AA
Doa – 250	20	165	QR	LL	CS	AG
Doa – 251	28	190	QR	LL	CS	AG

continua

Amostras	Idade	Atividade	PON1		PON2	
			Q 192 R	L 55 M	C 311 S	A148G
Doa – 252	41	101	QR	LL	CC	GG
Doa – 258	32	36	QQ	LM	CS	AG
Doa – 259	24	125	QR	LM	SS	AA
Doa – 270	37	216	RR	LL	SS	AA

Determinação da atividade basal da paraoxonase sérica, usando como substrato o *paraoxon*, resultado expresso em U/L. **PON1-192**: polimorfismo PON1 Q192R (QQ: homozigoto mutado; QR: heterozigoto; RR: homozigoto R); **PON1-55**: polimorfismo PON1 L55M (LL: homozigoto; LM: heterozigoto; MM: homozigoto mutado); **PON2-148**: polimorfismo PON2 A148G (AA: homozigoto; AG: heterozigoto; GG: homozigoto mutado); **PON2-311**: polimorfismo PON2 C311S (CC: homozigoto mutado; CS: heterozigoto; SS: homozigoto).

Anexo D: Resultados, média e desvio padrão do perfil lipídico (colesterol total, HDL-C – colesterol, LDL- colesterol e triglicerídeos), dos doadores (n = 179).

Amostras	Colesterol	HDL-C	LDL-C	Triglicerídeos
Doa – 007	137	48	75	57
Doa – 008	96	29	42	100
Doa – 010	187	35	132	132
Doa – 012	154	34	66	237
Doa – 014	213	41	156	84
Doa – 015	234	31	173	138
Doa – 016	155	34	70	187
Doa – 019	149	46	75	123
Doa – 020	118	37	72	52
Doa – 021	240	52	175	78
Doa – 028	143	40	85	99
Doa – 029	131	42	75	64
Doa – 031	196	55	96	221
Doa – 032	127	46	75	46
Doa – 033	135	56	67	65
Doa – 036	235	39	170	137
Doa – 039	222	28	92	474
Doa – 040	128	36	79	78
Doa – 041	179	51	119	76
Doa – 042	123	48	66	54
Doa – 043	185	34	128	95
Doa – 044	139	46	72	67
Doa – 045	131	47	75	51
Doa – 046	208	28	43	562
Doa – 047	149	43	80	111
Doa – 048	178	40	113	122

continua

Amostras	Colesterol	HDL-C	LDL-C	Triglicerídeos
Doa – 049	128	57	60	51
Doa – 050	125	42	74	62
Doa – 051	192	28	101	337
Doa – 052	178	50	106	87
Doa – 053	180	25	110	159
Doa – 055	227	37	155	202
Doa – 056	167	44	99	79
Doa – 058	285	53	190	141
Doa – 060	174	40	85	203
Doa – 061	139	41	58	163
Doa – 062	130	37	64	114
Doa – 064	159	43	60	194
Doa – 065	119	36	60	56
Doa – 067	152	23	67	189
Doa – 079	144	39	88	75
Doa – 080	166	30	106	109
Doa – 082	151	33	76	134
Doa – 085	183	33	119	145
Doa – 086	136	48	81	52
Doa – 108	152	32	93	94
Doa – 110	185	32	129	112
Doa – 112	151	33	94	114
Doa – 114	216	39	110	249
Doa – 115	164	36	103	97
Doa – 116	163	32	94	150
Doa – 118	188	57	89	177
Doa – 119	167	42	105	103

continua

Amostras	Colesterol	HDL-C	LDL-C	Triglicerídeos
Doa – 120	250	30	113	361
Doa – 121	143	44	85	113
Doa – 122	132	51	75	65
Doa – 123	167	34	112	133
Doa – 124	296	38	230	202
Doa – 125	157	50	82	169
Doa – 126	103	44	64	76
Doa – 127	158	38	89	112
Doa – 128	158	22	139	150
Doa – 129	228	29	129	282
Doa – 130	163	30	98	220
Doa – 131	209	36	95	370
Doa – 132	127	58	55	65
Doa – 133	175	49	110	130
Doa – 134	201	38	109	201
Doa – 135	169	32	116	131
Doa – 136	167	43	87	184
Doa – 137	187	40	92	386
Doa – 138	154	55	101	66
Doa – 139	215	34	148	153
Doa – 140	139	49	83	74
Doa – 141	214	47	127	165
Doa – 142	248	48	173	186
Doa – 143	179	41	123	110
Doa – 145	177	33	134	93
Doa – 146	129	53	58	100
Doa – 147	181	36	99	368
Doa – 149	201	34	130	184
Doa – 150	165	32	113	98

continua

Amostras	Colesterol	HDL-C	LDL-C	Triglicerídeos
Doa – 151	147	50	78	95
Doa – 152	153	32	95	130
Doa – 153	121	44	57	102
Doa – 154	106	50	42	70
Doa – 155	128	52	51	64
Doa – 156	156	48	86	111
Doa – 157	214	97	102	74
Doa – 158	202	52	142	77
Doa – 159	138	20	39	276
Doa – 160	223	25	127	300
Doa – 161	157	33	90	176
Doa – 162	212	37	160	83
Doa – 163	114	37	68	62
Doa – 164	160	25	91	186
Doa – 165	205	31	151	155
Doa – 166	185	38	109	156
Doa – 167	124	37	77	59
Doa – 168	190	42	141	115
Doa – 169	235	52	163	110
Doa – 170	249	40	191	167
Doa – 171	132	41	70	81
Doa – 173	232	34	170	121
Doa – 175	153	25	81	135
Doa – 176	237	25	145	209
Doa – 177	369	43	260	312
Doa – 179	197	36	97	228
Doa – 180	181	45	103	159
Doa – 183	174	34	116	108

continua

Amostras	Colesterol	HDL-C	LDL-C	Triglicerídeos
Doa – 184	129	64	57	82
Doa – 185	142	25	84	192
Doa – 186	188	32	132	122
Doa – 187	229	44	153	130
Doa – 188	266	36	201	166
Doa – 189	261	28	163	227
Doa – 190	168	29	93	187
Doa – 191	195	33	119	174
Doa – 194	184	59	109	101
Doa – 195	194	75	78	150
Doa – 196	201	28	76	327
Doa – 197	191	40	106	210
Doa – 199	188	45	139	55
Doa – 201	108	36	54	92
Doa – 202	148	33	82	166
Doa – 204	108	35	52	106
Doa – 205	181	41	94	178
Doa – 207	155	34	76	226
Doa – 208	184	49	94	203
Doa – 209	154	43	83	141
Doa – 210	151	41	97	64
Doa – 211	192	36	134	117
Doa – 215	112	23	67	134
Doa – 216	150	38	109	90
Doa – 218	285	28	176	378
Doa – 219	136	40	84	76
Doa – 220	161	25	52	400
Doa – 222	236	45	174	79
Doa – 223	204	28	93	319

continua

Amostras	Colesterol	HDL-C	LDL-C	Triglicerídeos
Doa – 224	195	39	122	126
Doa – 225	176	30	92	169
Doa – 226	172	23	95	203
Doa – 227	222	41	144	148
Doa – 228	186	46	104	124
Doa – 229	200	26	99	247
Doa – 230	90	39	33	48
Doa – 231	259	59	128	360
Doa – 232	214	50	137	104
Doa – 233	183	37	124	81
Doa – 234	165	27	115	89
Doa – 235	189	32	113	192
Doa – 236	160	47	100	61
Doa – 237	176	31	103	132
Doa – 238	201	37	121	211
Doa – 241	165	50	95	89
Doa – 242	202	29	116	223
Doa – 243	197	20	100	407
Doa – 244	226	27	114	293
Doa – 245	134	44	87	38
Doa – 246	173	38	101	178
Doa – 247	157	31	98	143
Doa – 249	201	41	142	80
Doa – 250	123	34	86	42
Doa – 251	141	38	93	66
Doa – 252	149	34	93	92
Doa – 253	235	33	172	175
Doa – 255	176	41	111	90
Doa – 257	202	40	161	73
Doa – 258	166	36	112	246

continua

Amostras	Colesterol	HDL-C	LDL-C	Triglicerídeos
Doa – 259	146	47	97	79
Doa – 261	189	48	113	337
Doa – 262	148	53	84	129
Doa – 263	186	43	133	180
Doa – 264	232	55	174	102
Doa – 265	215	47	176	86
Doa – 266	219	46	168	160
Doa – 267	176	58	115	100
Doa – 270	186	92	104	53
Doa – 271	177	46	134	84

Exames realizados e valores de referência¹ utilizados pelo Serviço de Bioquímica Clínica do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital das Clínicas da FMUSP.

Colesterol: colesterol total em mg/dL (valores de referência: desejável – inferior a 200 mg/dL; limítrofe – 200 a 239 mg/dL; elevado – superior a 240 mg/dL); **HDL-C:** HDL-colesterol em mg/dL (valores de referência: sem risco – superior a 55 mg/dL; risco moderado – 35 a 55 mg/dL; risco elevado – inferior a 35 mg/dL); **LDL-C:** LDL-colesterol em mg/dL (valores de referência: sem risco – inferior a 130 mg/dL; risco moderado – 130 a 159 mg/dL; risco elevado – superior a 159 mg/dL); **TG:** triglicérides em mg/dL (valores de referência: sem risco – inferior a 150 mg/dL).

¹ Valores de referência: para indivíduos em jejum de 12 horas.

Anexo E: Cálculos e resultados da frequência dos genótipos, alelos e haplótipos, teste do χ^2 e valores da frequência alélica. Realizados em programa desenvolvido pelo Prof. Dr. Paulo Alberto Otto no Departamento de Biologia - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

```

ANALYSIS OF LOCI (L,M) & (Q,R)

REM PROGRAM FILENAME LINKDIS8.BAS
REM DADOS DE SANTOS FERREIRA [PON HAPLOTYPES]
REM EM ALGORITHM P. A. OTTO
DEFDBL A-Z: CLS : eps = .0000000001#
REM          LLQQ, LLQR, LLRR, LMQQ, LMQR, LMRR, MMQQ, MMQR, MMRR
DATA WHITES,    04,   14,   09,   20,   20,   01,   09,   02,   00
DATA MULATTOES, 05,   21,   10,   12,   16,   04,   03,   01,   00
DATA NEGROES,   03,   08,   08,   02,   06,   01,   00,   00,   00
REM TOTAL,     12,   43,   27,   34,   42,   06,   12,   03,   00
  FOR j = 1 TO 3
    FOR i = 1 TO 9: N(i) = 0: NEXT i: N = 0
    READ group$(j)
    FOR i = 1 TO 9
      READ N(i): IF N(i) = 0 THEN N(i) = eps
    N = N + N(i)
  NEXT i
  IF j = 1 THEN OPEN "c:\temp\ponhap_1.txt" FOR OUTPUT AS #1
  AA = N(1) + N(2) + N(3): AC = N(4) + N(5) + N(6): CC = N(7) + N(8) +
  N(9)
  PAA = AA / N: PAC = AC / N: PCC = CC / N
  BB = N(1) + N(4) + N(7): BD = N(2) + N(5) + N(8): DD = N(3) + N(6) +
  N(9)
  PBB = BB / N: PBD = BD / N: PDD = DD / N
  PA = (2 * (N(1) + N(2) + N(3)) + N(4) + N(5) + N(6)) / (2 * N): QA =
  1 - PA
  PB = (2 * (N(1) + N(4) + N(7)) + N(2) + N(5) + N(8)) / (2 * N): QB =
  1 - PB
  VPA1 = (AA / N + PA - 2 * PA ^ 2) / (2 * N)
  VPB1 = (BB / N + PB - 2 * PB ^ 2) / (2 * N)
  VPA2 = PA * QA / (2 * N): VPB2 = PB * QB / (2 * N)
  PRINT #1, "ETHNIC GROUP: "; group$(j): PRINT #1,
  PRINT #1, USING "N(LL)   = #####"; AA;
  PRINT #1, USING "  Pobs(LL) = #.###"; PAA;
  PRINT #1, USING "  Pexp(LL) = #.###"; PA ^ 2
  PRINT #1, USING "N(LM)   = #####"; AC;
  PRINT #1, USING "  Pobs(LM) = #.###"; PAC;
  PRINT #1, USING "  Pexp(LM) = #.###"; 2 * PA * QA
  PRINT #1, USING "N(MM)   = #####"; CC;
  PRINT #1, USING "  Pobs(MM) = #.###"; PCC;
  PRINT #1, USING "  Pexp(MM) = #.###"; QA ^ 2
  PRINT #1, USING "N       = #####"; N
  D = AA: H = AC: R = CC: GOSUB CHISQHW
  PRINT #1, "Hardy-Weinberg testing (locus {L,M}): chi-sq.(ldf) = ";
  PRINT #1, USING "###.###"; CHISQ

```

```

PRINT #1,
PRINT #1, USING "N(QQ) = #####"; BB;
PRINT #1, USING " Pobs(QQ) = #.###"; PBB;
PRINT #1, USING " Pexp(QQ) = #.###"; PB ^ 2
PRINT #1, USING "N(QR) = #####"; BD;
PRINT #1, USING " Pobs(QR) = #.###"; PBD;
PRINT #1, USING " Pexp(QR) = #.###"; 2 * PB * QB
PRINT #1, USING "N(RR) = #####"; DD;
PRINT #1, USING " Pobs(RR) = #.###"; PDD;
PRINT #1, USING " Pexp(RR) = #.###"; QB ^ 2
PRINT #1, USING "N = #####"; N
D = BB: H = BD: R = DD: GOSUB CHISQHW
PRINT #1, "Hardy-Weinberg testing (locus {Q,R}): chi-sq.(ldf) = ";
PRINT #1, USING "###.###"; CHISQ
PRINT #1,
PRINT #1, USING "N(LLQQ) = #####"; N(1): PRINT #1, USING "N(LLQR) =
#####"; N(2)
PRINT #1, USING "N(LLRR) = #####"; N(3): PRINT #1, USING "N(LMQQ) =
#####"; N(4)
PRINT #1, USING "N(LMQR) = #####"; N(5): PRINT #1, USING "N(LMRR) =
#####"; N(6)
PRINT #1, USING "N(MMQQ) = #####"; N(7): PRINT #1, USING "N(MMQR) =
#####"; N(8)
PRINT #1, USING "N(MMRR) = #####"; N(9)
PRINT #1, USING "N = #####"; N: PRINT #1,
PRINT #1, USING "P(L) = #.#####"; PA: PRINT #1, USING "P(M) =
#.#####"; QA
PRINT #1, "s.e.[P(L)] = s.e.[P(M)] = ";
PRINT #1, USING "#.##### (sat.data), #.##### (binomial)"; SQR(VPA1);
SQR(VPA2)
PRINT #1, USING "P(Q) = #.#####"; PB: PRINT #1, USING "P(R) =
#.#####"; QB
PRINT #1, "s.e.[P(Q)] = s.e.[P(R)] = ";
PRINT #1, USING "#.##### (sat.data), #.##### (binomial)"; SQR(VPB1);
SQR(VPB2)
PRINT #1,
X1 = PA * PB: X2 = PA * QB: X3 = QA * PB: X4 = QA * QB: i = 0
LOOPNUMBERONE:
X = X1 * X4 / (X1 * X4 + X2 * X3)
DAB = X1 - PA * PB
X11 = (2 * N(1) + N(2) + N(4) + N(5) * X) / (2 * N)
X21 = (N(2) + 2 * N(3) + N(5) * (1 - X) + N(6)) / (2 * N)
X31 = (N(4) + N(5) * (1 - X) + 2 * N(7) + N(8)) / (2 * N)
X41 = (N(5) * X + N(6) + N(8) + 2 * N(9)) / (2 * N)
REM X21 = PA - X11: X31 = PB - X11: X41 = 1 - X11 - X21 - X31
XN = X11 * X41 / (X11 * X41 + X21 * X31)
IF ABS(X - XN) <= .00000001# THEN
    GOTO CONTPRGM
ELSE
    X1 = X11: X2 = X21: X3 = X31: X4 = X41
    i = i + 1: GOTO LOOPNUMBERONE
END IF
CONTPRGM:
PRINT #1, USING "P(LQ) = #.#####"; X1
PRINT #1, USING "P(LR) = #.#####"; X2

```

```

PRINT #1, USING "P(MQ) = #.#####"; X3
PRINT #1, USING "P(MR) = #.#####"; X4: PRINT #1,
PRINT #1, USING "D(LQ) = #.#####"; DAB
PRINT #1,
L0 = N(1) * LOG(PA ^ 2 * PB ^ 2) + N(2) * LOG(2 * PA ^ 2 * PB * QB)
L0 = L0 + N(3) * LOG(PA ^ 2 * QB ^ 2) + N(4) * LOG(2 * PA * QA * PB
^ 2)
L0 = L0 + N(5) * LOG(4 * PA * QA * PB * QB)
L0 = L0 + N(6) * LOG(2 * PA * QA * QB ^ 2) + N(7) * LOG(QA ^ 2 * PB
^ 2)
L0 = L0 + N(8) * LOG(2 * QA ^ 2 * PB * QB) + N(9) * LOG(QA ^ 2 * QB
^ 2)
L1 = N(1) * LOG(X11 ^ 2) + N(2) * LOG(2 * X11 * X21)
L1 = L1 + N(3) * LOG(X21 ^ 2) + N(4) * LOG(2 * X11 * X31)
L1 = L1 + N(5) * LOG(2 * X11 * X41 + 2 * X21 * X31)
L1 = L1 + N(6) * LOG(2 * X21 * X41) + N(7) * LOG(X31 ^ 2)
L1 = L1 + N(8) * LOG(2 * X31 * X41) + N(9) * LOG(X41 ^ 2)
L2 = N(1) * LOG(N(1)) + N(2) * LOG(N(2)) + N(3) * LOG(N(3)) + N(4) *
LOG(N(4))
L2 = L2 + N(5) * LOG(N(5)) + N(6) * LOG(N(6)) + N(7) * LOG(N(7)) +
N(8) * LOG(N(8))
L2 = L2 + N(9) * LOG(N(9)) - N * LOG(N)
PRINT #1, "h0 : random mating, linkage equilibrium"
PRINT #1, "h1 : random mating, linkage disequilibrium"
PRINT #1, "h2 : observed (saturated) set of data"
PRINT #1, "Log-likelihoods under h0, h1, and h2"
PRINT #1, USING "L0 = #####.#####"; L0; : PRINT #1, "; d.f. = 2"
PRINT #1, USING "L1 = #####.#####"; L1; : PRINT #1, "; d.f. = 3"
PRINT #1, USING "L2 = #####.#####"; L2; : PRINT #1, "; d.f. = 8"
PRINT #1, "Log-likelihood ratio chi-squared tests [chi-sq. ~ 2(Li-
Lj), i > j]"
PRINT #1, "h1 vs h0 (test of Daibj=0):                chi-sq.(1
d.f.) = ";
PRINT #1, USING "###.##"; 2 * (L1 - L0)
PRINT #1, "h2 vs h0 (test of random mating + Daibj = 0): chi-sq.(6
d.f.) = ";
PRINT #1, USING "###.##"; 2 * (L2 - L0)
PRINT #1, "h2 vs h1 (test of random mating):          chi-sq.(5
d.f.) = ";
PRINT #1, USING "###.##"; 2 * (L2 - L1)
PRINT #1,
NEXT j
CLOSE #1
END
CHISQHW:
CHISQ = (H ^ 2 - 4 * D * R) ^ 2 * N / ((D + 2 * H) * (2 * H + R)) ^
2
RETURN

ETHNIC GROUP: WHITES

N(LL)   =    27   Pobs(LL) = 0.342   Pexp(LL) = 0.362
N(LM)   =    41   Pobs(LM) = 0.519   Pexp(LM) = 0.479
N(MM)   =    11   Pobs(MM) = 0.139   Pexp(MM) = 0.159
N       =    79

```

Hardy-Weinberg testing (locus {L,M}): chi-sq.(1df) = 0.187

N(QQ) = 33 Pobs(QQ) = 0.418 Pexp(QQ) = 0.417
 N(QR) = 36 Pobs(QR) = 0.456 Pexp(QR) = 0.458
 N(RR) = 10 Pobs(RR) = 0.127 Pexp(RR) = 0.126
 N = 79

Hardy-Weinberg testing (locus {Q,R}): chi-sq.(1df) = 0.001

N(LLQQ) = 4
 N(LLQR) = 14
 N(LLRR) = 9
 N(LMQQ) = 20
 N(LMQR) = 20
 N(LMRR) = 1
 N(MMQQ) = 9
 N(MMQR) = 2
 N(MMRR) = 0
 N = 79

P(L) = 0.60127
 P(M) = 0.39873
 s.e.[P(L)] = s.e.[P(M)] = 0.0373 (sat.data), 0.0390 (binomial)
 P(Q) = 0.64557
 P(R) = 0.35443
 s.e.[P(Q)] = s.e.[P(R)] = 0.0381 (sat.data), 0.0381 (binomial)

P(LQ) = 0.27272
 P(LR) = 0.32855
 P(MQ) = 0.37285
 P(MR) = 0.02588

D(LQ) = -.11544

h0 : random mating, linkage equilibrium

h1 : random mating, linkage disequilibrium

h2 : observed (saturated) set of data

Log-likelihoods under h0, h1, and h2

L0 = -155.60498; d.f. = 2

L1 = -143.09137; d.f. = 3

L2 = -141.92877; d.f. = 8

Log-likelihood ratio chi-squared tests [chi-sq. $\sim 2(L_i - L_j)$, $i > j$]

h1 vs h0 (test of $Da_{ij}=0$): chi-sq.(1 d.f.) = 25.03

h2 vs h0 (test of random mating + $Da_{ij} = 0$): chi-sq.(6 d.f.) = 27.35

h2 vs h1 (test of random mating): chi-sq.(5 d.f.) = 2.33

ETHNIC GROUP: MULATTOES

N(LL) = 36 Pobs(LL) = 0.500 Pexp(LL) = 0.522
 N(LM) = 32 Pobs(LM) = 0.444 Pexp(LM) = 0.401
 N(MM) = 4 Pobs(MM) = 0.056 Pexp(MM) = 0.077
 N = 72

Hardy-Weinberg testing (locus {L,M}): chi-sq.(1df) = 0.313

N(QQ) = 20 Pobs(QQ) = 0.278 Pexp(QQ) = 0.293
 N(QR) = 38 Pobs(QR) = 0.528 Pexp(QR) = 0.497
 N(RR) = 14 Pobs(RR) = 0.194 Pexp(RR) = 0.210
 N = 72
 Hardy-Weinberg testing (locus {Q,R}): chi-sq.(1df) = 0.101

N(LLQQ) = 5
 N(LLQR) = 21
 N(LLRR) = 10
 N(LMQQ) = 12
 N(LMQR) = 16
 N(LMRR) = 4
 N(MMQQ) = 3
 N(MMQR) = 1
 N(MMRR) = 0
 N = 72

P(L) = 0.72222
 P(M) = 0.27778
 s.e.[P(L)] = s.e.[P(M)] = 0.0353 (sat.data), 0.0373 (binomial)
 P(Q) = 0.54167
 P(R) = 0.45833
 s.e.[P(Q)] = s.e.[P(R)] = 0.0402 (sat.data), 0.0415 (binomial)

P(LQ) = 0.31519
 P(LR) = 0.40703
 P(MQ) = 0.22647
 P(MR) = 0.05131

D(LQ) = -.07601

h0 : random mating, linkage equilibrium

h1 : random mating, linkage disequilibrium

h2 : observed (saturated) set of data

Log-likelihoods under h0, h1, and h2

L0 = -135.87359; d.f. = 2

L1 = -131.29097; d.f. = 3

L2 = -129.89064; d.f. = 8

Log-likelihood ratio chi-squared tests [chi-sq. $\sim 2(L_i - L_j)$, $i > j$]

h1 vs h0 (test of $Da_{ij}=0$): chi-sq.(1 d.f.) = 9.17

h2 vs h0 (test of random mating + $Da_{ij} = 0$): chi-sq.(6 d.f.) = 11.97

h2 vs h1 (test of random mating): chi-sq.(5 d.f.) = 2.80

ETHNIC GROUP: NEGROES

N(LL) = 19 Pobs(LL) = 0.679 Pexp(LL) = 0.704
 N(LM) = 9 Pobs(LM) = 0.321 Pexp(LM) = 0.270
 N(MM) = 0 Pobs(MM) = 0.000 Pexp(MM) = 0.026
 N = 28

Hardy-Weinberg testing (locus {L,M}): chi-sq.(1df) = 0.414

```

N(QQ) = 5 Pobs(QQ) = 0.179 Pexp(QQ) = 0.184
N(QR) = 14 Pobs(QR) = 0.500 Pexp(QR) = 0.490
N(RR) = 9 Pobs(RR) = 0.321 Pexp(RR) = 0.327
N = 28

```

Hardy-Weinberg testing (locus {Q,R}): chi-sq.(1df) = 0.005

```

N(LLQQ) = 3
N(LLQR) = 8
N(LLRR) = 8
N(LMQQ) = 2
N(LMQR) = 6
N(LMRR) = 1
N(MMQQ) = 0
N(MMQR) = 0
N(MMRR) = 0
N = 28

```

```

P(L) = 0.83929
P(M) = 0.16071
s.e.[P(L)] = s.e.[P(M)] = 0.0441 (sat.data), 0.0491 (binomial)
P(Q) = 0.42857
P(R) = 0.57143
s.e.[P(Q)] = s.e.[P(R)] = 0.0654 (sat.data), 0.0661 (binomial)

```

```

P(LQ) = 0.29760
P(LR) = 0.54169
P(MQ) = 0.13097
P(MR) = 0.02974

```

D(LQ) = -.06210

```

h0 : random mating, linkage equilibrium
h1 : random mating, linkage disequilibrium
h2 : observed (saturated) set of data
Log-likelihoods under h0, h1, and h2
L0 = -46.98820; d.f. = 2
L1 = -45.68566; d.f. = 3
L2 = -44.59797; d.f. = 8
Log-likelihood ratio chi-squared tests [chi-sq. ~ 2(Li-Lj), i > j]
h1 vs h0 (test of Daibj=0): chi-sq.(1 d.f.) =
2.61
h2 vs h0 (test of random mating + Daibj = 0): chi-sq.(6 d.f.) =
4.78
h2 vs h1 (test of random mating): chi-sq.(5 d.f.) =
2.18

```

ANALYSIS OF LOCI (A,G) & (C,S)

```

REM PROGRAM FILENAME LINKDIS8.BAS
REM DADOS DE SANTOS FERREIRA [PON HAPLOTYPES]
REM EM ALGORITHM P. A. OTTO
DEFDBL A-Z: CLS : eps = .0000000001#
REM          AACC, AACG, AASS, AGCC, AGCS, AGSS, GGCC, GGCS, GGSS
DATA WHITES, 02, 12, 34, 03, 24, 03, 00, 01, 00
DATA MULATTOES, 00, 13, 23, 01, 28, 04, 03, 00, 00

```

```

DATA NEGROES,    01,    03,    09,    00,    11,    01,    01,    02,    00
REM TOTAL,      03,    28,    66,    04,    63,    08,    04,    03,    00
  FOR j = 1 TO 3
    FOR i = 1 TO 9: N(i) = 0: NEXT i: N = 0
    READ group$(j)
    FOR i = 1 TO 9
      READ N(i): IF N(i) = 0 THEN N(i) = eps
    N = N + N(i)
  NEXT i
  IF j = 1 THEN OPEN "c:\temp\ponhap_2.txt" FOR OUTPUT AS #1
  AA = N(1) + N(2) + N(3): AC = N(4) + N(5) + N(6): CC = N(7) + N(8) +
  N(9)
  PAA = AA / N: PAC = AC / N: PCC = CC / N
  BB = N(1) + N(4) + N(7): BD = N(2) + N(5) + N(8): DD = N(3) + N(6) +
  N(9)
  PBB = BB / N: PBD = BD / N: PDD = DD / N
  PA = (2 * (N(1) + N(2) + N(3)) + N(4) + N(5) + N(6)) / (2 * N): QA =
  1 - PA
  PB = (2 * (N(1) + N(4) + N(7)) + N(2) + N(5) + N(8)) / (2 * N): QB =
  1 - PB
  VPA1 = (AA / N + PA - 2 * PA ^ 2) / (2 * N)
  VPB1 = (BB / N + PB - 2 * PB ^ 2) / (2 * N)
  VPA2 = PA * QA / (2 * N): VPB2 = PB * QB / (2 * N)
  PRINT #1, "ETHNIC GROUP: "; group$(j): PRINT #1,
  PRINT #1, USING "N(AA)    = #####"; AA;
  PRINT #1, USING "  Pobs(AA) = #.###"; PAA;
  PRINT #1, USING "  Pexp(AA) = #.###"; PA ^ 2
  PRINT #1, USING "N(AG)    = #####"; AC;
  PRINT #1, USING "  Pobs(AG) = #.###"; PAC;
  PRINT #1, USING "  Pexp(AG) = #.###"; 2 * PA * QA
  PRINT #1, USING "N(GG)    = #####"; CC;
  PRINT #1, USING "  Pobs(GG) = #.###"; PCC;
  PRINT #1, USING "  Pexp(GG) = #.###"; QA ^ 2
  PRINT #1, USING "N          = #####"; N
  D = AA: H = AC: R = CC: GOSUB CHISQHW
  PRINT #1, "Hardy-Weinberg testing (locus {A,G}): chi-sq.(ldf) = ";
  PRINT #1, USING "###.###"; CHISQ
  PRINT #1,
  PRINT #1, USING "N(CC)    = #####"; BB;
  PRINT #1, USING "  Pobs(CC) = #.###"; PBB;
  PRINT #1, USING "  Pexp(CC) = #.###"; PB ^ 2
  PRINT #1, USING "N(CS)    = #####"; BD;
  PRINT #1, USING "  Pobs(CS) = #.###"; PBD;
  PRINT #1, USING "  Pexp(CS) = #.###"; 2 * PB * QB
  PRINT #1, USING "N(SS)    = #####"; DD;
  PRINT #1, USING "  Pobs(SS) = #.###"; PDD;
  PRINT #1, USING "  Pexp(SS) = #.###"; QB ^ 2
  PRINT #1, USING "N          = #####"; N
  D = BB: H = BD: R = DD: GOSUB CHISQHW
  PRINT #1, "Hardy-Weinberg testing (locus {C,S}): chi-sq.(ldf) = ";
  PRINT #1, USING "###.###"; CHISQ
  PRINT #1,
  PRINT #1, USING "N(AACC) = #####"; N(1): PRINT #1, USING "N(AACS) =
  #####"; N(2)

```

```

PRINT #1, USING "N(AASS) = #####"; N(3): PRINT #1, USING "N(AGCC) =
#####"; N(4)
PRINT #1, USING "N(AGCS) = #####"; N(5): PRINT #1, USING "N(AGSS) =
#####"; N(6)
PRINT #1, USING "N(GGCC) = #####"; N(7): PRINT #1, USING "N(GGCS) =
#####"; N(8)
PRINT #1, USING "N(GGSS) = #####"; N(9)
PRINT #1, USING "N          = #####"; N: PRINT #1,
PRINT #1, USING "P(A) =   #####"; PA: PRINT #1, USING "P(G) =
#.#####"; QA
PRINT #1, "s.e.[P(A)] = s.e.[P(G)] = ";
PRINT #1, USING "#.#### (sat.data), #.#### (binomial)"; SQR(VPA1);
SQR(VPA2)
PRINT #1, USING "P(C) =   #####"; PB: PRINT #1, USING "P(S) =
#.#####"; QB
PRINT #1, "s.e.[P(C)] = s.e.[P(S)] = ";
PRINT #1, USING "#.#### (sat.data), #.#### (binomial)"; SQR(VPB1);
SQR(VPB2)
PRINT #1,
X1 = PA * PB: X2 = PA * QB: X3 = QA * PB: X4 = QA * QB: i = 0
LOOPNUMBERONE:
X = X1 * X4 / (X1 * X4 + X2 * X3)
DAB = X1 - PA * PB
X11 = (2 * N(1) + N(2) + N(4) + N(5) * X) / (2 * N)
X21 = (N(2) + 2 * N(3) + N(5) * (1 - X) + N(6)) / (2 * N)
X31 = (N(4) + N(5) * (1 - X) + 2 * N(7) + N(8)) / (2 * N)
X41 = (N(5) * X + N(6) + N(8) + 2 * N(9)) / (2 * N)
REM X21 = PA - X11: X31 = PB - X11: X41 = 1 - X11 - X21 - X31
XN = X11 * X41 / (X11 * X41 + X21 * X31)
IF ABS(X - XN) <= .00000001# THEN
  GOTO CONTPRGM
ELSE
  X1 = X11: X2 = X21: X3 = X31: X4 = X41
  i = i + 1: GOTO LOOPNUMBERONE
END IF
CONTPRGM:
PRINT #1, USING "P(AC) = #.#####"; X1
PRINT #1, USING "P(AS) = #.#####"; X2
PRINT #1, USING "P(GC) = #.#####"; X3
PRINT #1, USING "P(GS) = #.#####"; X4: PRINT #1,
PRINT #1, USING "D(AC) = #.#####"; DAB
PRINT #1,
L0 = N(1) * LOG(PA ^ 2 * PB ^ 2) + N(2) * LOG(2 * PA ^ 2 * PB * QB)
L0 = L0 + N(3) * LOG(PA ^ 2 * QB ^ 2) + N(4) * LOG(2 * PA * QA * PB
^ 2)
L0 = L0 + N(5) * LOG(4 * PA * QA * PB * QB)
L0 = L0 + N(6) * LOG(2 * PA * QA * QB ^ 2) + N(7) * LOG(QA ^ 2 * PB
^ 2)
L0 = L0 + N(8) * LOG(2 * QA ^ 2 * PB * QB) + N(9) * LOG(QA ^ 2 * QB
^ 2)
L1 = N(1) * LOG(X11 ^ 2) + N(2) * LOG(2 * X11 * X21)
L1 = L1 + N(3) * LOG(X21 ^ 2) + N(4) * LOG(2 * X11 * X31)
L1 = L1 + N(5) * LOG(2 * X11 * X41 + 2 * X21 * X31)
L1 = L1 + N(6) * LOG(2 * X21 * X41) + N(7) * LOG(X31 ^ 2)
L1 = L1 + N(8) * LOG(2 * X31 * X41) + N(9) * LOG(X41 ^ 2)

```



```

L2 = N(1) * LOG(N(1)) + N(2) * LOG(N(2)) + N(3) * LOG(N(3)) + N(4) *
LOG(N(4))
L2 = L2 + N(5) * LOG(N(5)) + N(6) * LOG(N(6)) + N(7) * LOG(N(7)) +
N(8) * LOG(N(8))
L2 = L2 + N(9) * LOG(N(9)) - N * LOG(N)
PRINT #1, "h0 : random mating, linkage equilibrium"
PRINT #1, "h1 : random mating, linkage disequilibrium"
PRINT #1, "h2 : observed (saturated) set of data"
PRINT #1, "Log-likelihoods under h0, h1, and h2"
PRINT #1, USING "L0 = #####.#####"; L0; : PRINT #1, "; d.f. = 2"
PRINT #1, USING "L1 = #####.#####"; L1; : PRINT #1, "; d.f. = 3"
PRINT #1, USING "L2 = #####.#####"; L2; : PRINT #1, "; d.f. = 8"
PRINT #1, "Log-likelihood ratio chi-squared tests [chi-sq. ~ 2(Li-
Lj), i > j]"
PRINT #1, "h1 vs h0 (test of Daibj=0):                chi-sq.(1
d.f.) = ";
PRINT #1, USING "###.##"; 2 * (L1 - L0)
PRINT #1, "h2 vs h0 (test of random mating + Daibj = 0): chi-sq.(6
d.f.) = ";
PRINT #1, USING "###.##"; 2 * (L2 - L0)
PRINT #1, "h2 vs h1 (test of random mating):          chi-sq.(5
d.f.) = ";
PRINT #1, USING "###.##"; 2 * (L2 - L1)
PRINT #1,
NEXT j
CLOSE #1
END
CHISQHW:
CHISQ = (H ^ 2 - 4 * D * R) ^ 2 * N / ((D + 2 * H) * (2 * H + R)) ^
2
RETURN

```

ETHNIC GROUP: WHITES

```

N(AA)   =    48   Pobs(AA) = 0.608   Pexp(AA) = 0.636
N(AG)   =    30   Pobs(AG) = 0.380   Pexp(AG) = 0.323
N(GG)   =     1   Pobs(GG) = 0.013   Pexp(GG) = 0.041
N       =    79
Hardy-Weinberg testing (locus {A,G}): chi-sq.(1df) =    0.912

```

```

N(CC)   =     5   Pobs(CC) = 0.063   Pexp(CC) = 0.088
N(CS)   =    37   Pobs(CS) = 0.468   Pexp(CS) = 0.418
N(SS)   =    37   Pobs(SS) = 0.468   Pexp(SS) = 0.494
N       =    79
Hardy-Weinberg testing (locus {C,S}): chi-sq.(1df) =    0.406

```

```

N(AACC) =     2
N(AACS) =    12
N(AASS) =    34
N(AGCC) =     3
N(AGCS) =    24
N(AGSS) =     3
N(GGCC) =     0
N(GGCS) =     1
N(GGSS) =     0

```

N = 79

P(A) = 0.79747

P(G) = 0.20253

s.e.[P(A)] = s.e.[P(G)] = 0.0290 (sat.data), 0.0320 (binomial)

P(C) = 0.29747

P(S) = 0.70253

s.e.[P(C)] = s.e.[P(S)] = 0.0341 (sat.data), 0.0364 (binomial)

P(AC) = 0.12503

P(AS) = 0.67244

P(GC) = 0.17244

P(GS) = 0.03009

D(AC) = -.11220

h0 : random mating, linkage equilibrium

h1 : random mating, linkage disequilibrium

h2 : observed (saturated) set of data

Log-likelihoods under h0, h1, and h2

L0 = -129.34931; d.f. = 2

L1 = -114.62534; d.f. = 3

L2 = -111.21998; d.f. = 8

Log-likelihood ratio chi-squared tests [chi-sq. $\sim 2(L_i - L_j)$, $i > j$]

h1 vs h0 (test of $Da_{ibj}=0$): chi-sq.(1 d.f.) = 29.45

h2 vs h0 (test of random mating + $Da_{ibj} = 0$): chi-sq.(6 d.f.) = 36.26

h2 vs h1 (test of random mating): chi-sq.(5 d.f.) = 6.81

ETHNIC GROUP: MULATTOES

N(AA) = 36 Pobs(AA) = 0.500 Pexp(AA) = 0.532

N(AG) = 33 Pobs(AG) = 0.458 Pexp(AG) = 0.395

N(GG) = 3 Pobs(GG) = 0.042 Pexp(GG) = 0.073

N = 72

Hardy-Weinberg testing (locus {A,G}): chi-sq.(1df) = 0.627

N(CC) = 4 Pobs(CC) = 0.056 Pexp(CC) = 0.116

N(CS) = 41 Pobs(CS) = 0.569 Pexp(CS) = 0.449

N(SS) = 27 Pobs(SS) = 0.375 Pexp(SS) = 0.435

N = 72

Hardy-Weinberg testing (locus {C,S}): chi-sq.(1df) = 1.278

N(AACC) = 0

N(AACS) = 13

N(AASS) = 23

N(AGCC) = 1

N(AGCS) = 28

N(AGSS) = 4

N(GGCC) = 3

N(GGCS) = 0

N(GGSS) = 0

N = 72

P(A) = 0.72917
 P(G) = 0.27083
 s.e.[P(A)] = s.e.[P(G)] = 0.0339 (sat.data), 0.0370 (binomial)
 P(C) = 0.34028
 P(S) = 0.65972
 s.e.[P(C)] = s.e.[P(S)] = 0.0338 (sat.data), 0.0395 (binomial)

P(AC) = 0.10132
 P(AS) = 0.62785
 P(GC) = 0.23896
 P(GS) = 0.03188

D(AC) = -.14680

h0 : random mating, linkage equilibrium
 h1 : random mating, linkage disequilibrium
 h2 : observed (saturated) set of data
 Log-likelihoods under h0, h1, and h2
 L0 = -125.15110; d.f. = 2
 L1 = -105.81333; d.f. = 3
 L2 = -100.31651; d.f. = 8
 Log-likelihood ratio chi-squared tests [$\chi^2 \sim 2(L_i - L_j)$, $i > j$]
 h1 vs h0 (test of $D_{aibj}=0$): χ^2 (1 d.f.) = 38.68
 h2 vs h0 (test of random mating + $D_{aibj} = 0$): χ^2 (6 d.f.) = 49.67
 h2 vs h1 (test of random mating): χ^2 (5 d.f.) = 10.99

ETHNIC GROUP: NEGROES

N(AA) = 13 Pobs(AA) = 0.464 Pexp(AA) = 0.460
 N(AG) = 12 Pobs(AG) = 0.429 Pexp(AG) = 0.436
 N(GG) = 3 Pobs(GG) = 0.107 Pexp(GG) = 0.103
 N = 28
 Hardy-Weinberg testing (locus {A,G}): χ^2 (1df) = 0.004

N(CC) = 2 Pobs(CC) = 0.071 Pexp(CC) = 0.128
 N(CS) = 16 Pobs(CS) = 0.571 Pexp(CS) = 0.459
 N(SS) = 10 Pobs(SS) = 0.357 Pexp(SS) = 0.413
 N = 28
 Hardy-Weinberg testing (locus {C,S}): χ^2 (1df) = 0.425

N(AACC) = 1
 N(AACS) = 3
 N(AASS) = 9
 N(AGCC) = 0
 N(AGCS) = 11
 N(AGSS) = 1
 N(GGCC) = 1
 N(GGCS) = 2
 N(GGSS) = 0
 N = 28

P(A) = 0.67857
 P(G) = 0.32143
 s.e.[P(A)] = s.e.[P(G)] = 0.0630 (sat.data), 0.0624 (binomial)
 P(C) = 0.35714
 P(S) = 0.64286
 s.e.[P(C)] = s.e.[P(S)] = 0.0557 (sat.data), 0.0640 (binomial)

P(AC) = 0.09663
 P(AS) = 0.58194
 P(GC) = 0.26052
 P(GS) = 0.06091

D(AC) = -.14572

h0 : random mating, linkage equilibrium

h1 : random mating, linkage disequilibrium

h2 : observed (saturated) set of data

Log-likelihoods under h0, h1, and h2

L0 = -52.25498; d.f. = 2

L1 = -45.91887; d.f. = 3

L2 = -42.46773; d.f. = 8

Log-likelihood ratio chi-squared tests [$\chi^2 \sim 2(L_i - L_j)$, $i > j$]

h1 vs h0 (test of $D_{aibj}=0$): χ^2 (1 d.f.) = 12.67

h2 vs h0 (test of random mating + $D_{aibj} = 0$): χ^2 (6 d.f.) = 19.57

h2 vs h1 (test of random mating): χ^2 (5 d.f.) = 6.90

Anexo F: Cópia da aprovação do protocolo de pesquisa e termo de consentimento por pela CAPPesq.



HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

A Inuologia

01/09/2004

 ELIANA LOUZA PONTE
 Secretária do Departamento de Clínica
 Médica

DIRETORIA CLÍNICA

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 26.08.04, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 543/04, intitulado: "Frequência das Mutações GLN 192ARG e LEU55MET no Gene da Paraoxonase 1 e das Mutações SER311CIS e A148G no Gene da Paraoxonase 2 em brasileiros de diferentes origens étnicas" apresentado pelo Departamento de CLÍNICA MÉDICA, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Pesquisador(a) Responsável: Prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski

Pesquisador(a) Executante: Sr. Paulo Roberto Santos Ferreira

CAPPesq, 26 de Agosto de 2004.

PROF. DR. CLAUDIO LEONE
 Vice-Presidente da Comissão de Ética para Análise
 de Projetos de Pesquisa

Anexo G: Modelo do termo de consentimento livre e esclarecido apresentado aos doadores.

Anexo I

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

**I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU
RESPONSÁVEL LEGAL**

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

2. ETNIA:

2A. Informações fornecidas pelo doador:

COR DA CÚTIS:	Branca	Negra	Amarela	Outra:.....
Pai:	Branca	Negra	Amarela	Outra:.....
Mãe:	Branca	Negra	Amarela	Outra:.....
Avó paterna:	Branca	Negra	Amarela	Outra:.....
Avô paterno:	Branca	Negra	Amarela	Outra:.....
Avó materna:	Branca	Negra	Amarela	Outra:.....
Avô materno:	Branca	Negra	Amarela	Outra:.....

2B. Informações avaliadas pelo entrevistador:

COR DA CÚTIS:	Branca	Negra	Amarela	Outra:.....
NARIZ:	Branca	Negra	Amarela	Outra:.....
LÁBIOS:	Branca	Negra	Amarela	Outra:.....
OLHOS:	Branca	Negra	Amarela	Outra:.....
CABELOS:	Branca	Negra	Amarela	Outra:.....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Frequência das mutações Gln192Arg e Leu55Met no gene da paraoxonase 1 e das mutações Ser311Cis e A148G no gene da paraoxonase 2 em brasileiros de diferentes origens étnicas habitantes da cidade de São Paulo.

PESQUISADOR: Paulo Roberto Santos Ferreira

CARGO/FUNÇÃO: Pós-graduando

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL: Nº. 8670

UNIDADE DO HCFMUSP: Serviço de Imunologia Clínica e Alergia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO
 RISCO BAIXO RISCO MAIOR

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 03 anos

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

1. justificativa e os objetivos da pesquisa; 2. procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais; 3. desconfortos e riscos esperados; 4. benefícios que poderão ser obtidos; 5. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo.

1. Estudaremos o sangue de doadores e as mudanças que ocorrem nos lipídeos de seu sangue para tentar explicar a possível razão deste aumento.

2. Para isto teremos de realizar os seguintes testes laboratoriais: pesquisa do “protetor de gorduras” (Paraoxonase) no seu sangue, dosagens das gorduras do sangue (colesterol, triglicérides e frações de colesterol) e a dosagem da substância existente no sangue chamada Paraoxonase.

3. As amostras de sangue para estes testes laboratoriais serão coletadas uma única vez, juntamente com as amostras coletadas no momento da doação para os exames da bolsa de sangue doada. Assim, os desconfortos e riscos serão mínimos, sendo apenas os de uma coleta de amostra de sangue. Será utilizada a mesma punção venosa feita para a doação e não serão pedidas ao senhor novas amostras de sangue.

4. Os benefícios serão os de contribuir para uma pesquisa científica.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

1. Serão dadas, a qualquer tempo, informações sobre os testes de laboratório, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para esclarecer qualquer dúvida.
2. O doador terá liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem que isto lhe traga qualquer prejuízo.
3. Haverá salvaguarda de confidencialidade, sigilo e privacidade.
4. Disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde , decorrentes da pesquisa.
5. Viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski

Paulo Roberto Santos Ferreira

Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155 (PAMB) – 1.º andar – sala 43 – fone: 3061-5544 r. 264/ 3082-2398

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, ____ de _____ de 200__.

Assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)

INSTRUÇÕES PARA PREENCHIMENTO
(Resolução Conselho Nacional de Saúde 196, de 10 outubro 1996)

1. Este termo conterà o registro das informações que o pesquisador fornecerá ao sujeito da pesquisa, em linguagem clara e acessível, evitando-se vocábulos técnicos não compatíveis com o grau de conhecimento do interlocutor.
2. A avaliação do grau de risco deve ser minuciosa, levando em conta qualquer possibilidade de intervenção e de dano à integridade física do sujeito da pesquisa.
3. O formulário poderá ser preenchido em letra de forma legível, datilografia ou meios eletrônicos.
4. Este termo deverá ser elaborado em duas vias, ficando uma via em poder do paciente ou seu representante legal e outra deverá ser juntada ao prontuário do paciente.
5. A via do Termo de Consentimento Pós-Informação submetida à análise da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq deverá ser idêntica àquela que será fornecida ao sujeito da pesquisa.

Anexo H: Resultados de estudos populacionais no mundo com os valores das freqüências alélicas dos polimorfismos da posição 55 (L/M) e 192 (Q/R) do gene da PON1.

Continentes	Populações	*55L	*55M	n	Referências
Oceania					
	Cáucaso - australianos	0,6*	-	-	Brophy <i>et al.</i> , 2002*
América					
	Ameríndios (BRA)	0,970	0,030	259	Dos Santos <i>et al.</i> , 2005
	Brasileiros	0,670	0,330	727	Oliveira <i>et al.</i> , 2003
	Euro-brasileiros	0,610	0,390	101	Allebrandt <i>et al.</i> , 2002
	Afro-brasileiros	0,714	0,286	70	Allebrandt <i>et al.</i> , 2002
	Mexicanos	0,840	0,160	214	Rojas-Gracia <i>et al.</i> , 2005
Ásia					
	Tailandeses	0,950	0,050	202	Phuntuwate <i>et al.</i> , 2005
	Coreanos	0,945	-	-	Hong <i>et al.</i> , 2001
	Chineses	0,961	-	-	Sanghera <i>et al.</i> , 1998
	Japoneses	0,927	-	-	Yamada <i>et al.</i> , 2003
Europa					
	Turcos	0,545	0,217	381	Aynacioglu <i>et al.</i> , 1999
	Caucasianos	0,57- 0,64*	-	-	Brophy <i>et al.</i> , 2002*

* Resultados obtidos de diversas fontes e listados por Brophy *et al.*, 2002.

Continentes	Populações	*192Q	*192R	n	Referências
África	Benin	0,388	0,612	98	Scacchi <i>et al.</i> , 2003
	Etíopes	0,592	0,408	169	Scacchi <i>et al.</i> , 2003
América	Índios Oji-Cree (CAN)	0,233	0,766	344	Hegele <i>et al.</i> , 1998
	Índios Cayapa (EQU)	0,211	0,789	83	Scacchi <i>et al.</i> , 2003
	Ameríndios (BRA)	0,270	0,730	259	Dos Santos <i>et al.</i> , 2005
	EUA	0,715	0,285	679	Chen <i>et al.</i> , 2002; Brophy <i>et al.</i> , 2001
	Peruanos	0,539	0,461	89	Cataño <i>et al.</i> , 2006
	Costarriquenhos	0,757	0,243	518	Sen-Banerjee <i>et al.</i> , 2000
	Mexicanos	0,510	0,490	214	Rojas-Gracia <i>et al.</i> , 2005
	Mexicanos (<i>mestizos</i>)	0,522	0,478	182	Gamboa <i>et al.</i> , 2006
	Chilenos (norte de Santiago)	0,569	0,431	195	Acuña <i>et al.</i> , 2004
	Chilenos (leste de Santiago)	0,663	0,337	129	Acuña <i>et al.</i> , 2004
	Hispânicos (org Caribe)	0,597	0,403	127	Chen <i>et al.</i> , 2002
	Brasileiros	0,680	0,320	727	Oliveira <i>et al.</i> , 2003
	Euro-brasileiros	0,693	0,307	101	Allebrandt <i>et al.</i> , 2002
	Afro-brasileiros	0,471	0,592	70	Allebrandt <i>et al.</i> , 2002
	Caucaso-americanos	0,730	0,270	82	Chen <i>et al.</i> , 2003
	Afro-americanos	0,378	0,622	86	Chen <i>et al.</i> , 2002
	Ásia	Japoneses	0,354	0,646	889
Chineses		0,368	0,632	367	Padungtod <i>et al.</i> , 1999; Ko <i>et al.</i> , 1998
Coreanos		-	0,620	-	Hong <i>et al.</i> , 2001
Tailandeses		0,710	0,290	202	Phuntuwate <i>et al.</i> , 2005
Indianos (Nova Déli)		0,670	0,330	165	Sanguera <i>et al.</i> , 1998
				continua	
	Indianos	0,723	0,276	269	Pati and Pati, 1998;
Europa	Franceses	0,717	0,283	796	Ruiz <i>et al.</i> , 1995; Herrmann <i>et al.</i> , 1996

continua

Ingleses	0,710	0,290	282	Mackness <i>et al.</i> , 2001
Espanhóis	0,700	0,300	141	Hernandez <i>et al.</i> , 2003
Irlandeses	0,712	0,288	170	Herrmann <i>et al.</i> , 1996
Alemães	0,718	0,282	2784	Gardamm <i>et al.</i> , 2000
Holandeses	0,691	0,309	815	Heijmans <i>et al.</i> , 2000; Leus <i>et al.</i> , 2000
Finlandeses	0,737	0,263	169	Antikainen <i>et al.</i> , 1996
Italianos	0,678	0,313	179	Scacchi <i>et al.</i> , 2003
Italianos (Sardenha)	0,752	0,248	161	Scacchi <i>et al.</i> , 2003
Turcos	0,690	0,310	381	Aynacioglu <i>et al.</i> , 1999

5 REFERÊNCIAS

Acuna M, Eaton L, Cifuentes L. Genetic variants of the paraoxonases (PON1 and PON2) in the Chilean population. *Hum Biol.* 2004 Apr;76(2):299-305.

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

Agostinho MF, Arruda VR, Basseres DS, Bordin S, Soares MC, Menezes RC, et al. Mutation analysis of the HFE gene in Brazilian populations. *Blood Cells Mol Dis.* 1999 Oct-Dec;25(5-6):324-7.

Aharoni A, Gaidukov L, Yagur S, Toker L, Silman I, Tawfik DS. Directed evolution of mammalian paraoxonases PON1 and PON3 for bacterial expression and catalytic specialization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Jan 13;101(2):482-7.

Ahmed Z, Ravandi A, Maguire GF, Emili A, Draganov D, La Du BN, et al. Apolipoprotein A-I promotes the formation of phosphatidylcholine core aldehydes that are hydrolyzed by paraoxonase (PON-1) during high density lipoprotein oxidation with a peroxynitrite donor. *J Biol Chem.* 2001 Jul 6;276(27):24473-81.

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

Aldridge WN. Serum esterases. II. An enzyme hydrolysing diethyl p-nitrophenyl phosphate (E600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera. *Biochem J.* 1953 Jan;53(1):117-24.

Allebrandt KV, Souza RL, Chautard-Freire-Maia EA. Variability of the paraoxonase gene (PON1) in Euro- and Afro-Brazilians. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2002 May 1;180(3):151-6.

Anderson MR, Moscou S. Race and ethnicity in research on infant mortality. *Fam Med.* 1998 Mar;30(3):224-7.

Antikainen M, Murtomaki S, Syvanne M, Pahlman R, Tahvanainen E, Jauhiainen M, et al. The Gln-Arg191 polymorphism of the human paraoxonase gene (HUMPONA) is not associated with the risk of coronary artery disease in Finns. *J Clin Invest.* 1996 Aug 15;98(4):883-5.

Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS, Primo-Parmo SL, La Du BN. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest.* 1998 Apr 15;101(8):1581-90.

Aynacioglu AS, Cascorbi I, Mrozikiewicz PM, Nacak M, Tapanyigit EE, Roots I. Paraoxonase 1 mutations in a Turkish population. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1999 Jun 15;157(3):174-7.

Aynacioglu AS, Kepekci Y. The human paraoxonase Gln-Arg192 (Q/R) polymorphism in Turkish patients with coronary artery disease. *Int J Cardiol.* 2000 Jun 12;74(1):33-7.

Bassam BJ, Caetano-Anolles G, Gresshoff PM. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem.* 1991

Jul;196(1):80-3.

Billecke S, Draganov D, Counsell R, Stetson P, Watson C, Hsu C, et al. Human serum paraoxonase (PON1) isozymes Q and R hydrolyze lactones and cyclic carbonate esters. *Drug Metab Dispos.* 2000 Nov;28(11):1335-42.

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

Brophy VH, Jarvik GP, Furlong CE. PON1 polymorphisms. In: Costa LG, Furlong CE, editors *Paraoxonase (PON1) in health and disease*. Kluwer, Norwell; 2002. p.53-78.

Brophy VH, Hastings MD, Clendenning JB, Richter RJ, Jarvik GP, Furlong CE. Polymorphisms in the human paraoxonase (PON1) promoter. *Pharmacogenetics.* 2001 Feb;11(1):77-84.

Bydlowski SP, de Moura-Neto RS, Soares RP, Silva R, Debes-Bravo AA, Morganti L. Genetic data on 12 STRs (F13A01, F13B, FESFPS, LPL, CSF1PO, TPOX, TH01, vWA, D16S539, D7S820, D13S317, D5S818) from four ethnic groups of Sao Paulo, Brazil. *Forensic Sci Int.* 2003 Jul 29;135(1):67-71.

Caldwell SH, Popenoe R. Perceptions and misperceptions of skin color. *Ann Intern Med.* 1995 Apr 15;122(8):614-7.

Campo S, Sardo AM, Campo GM, Avenoso A, Castaldo M, D'Ascola A, et al. Identification of paraoxonase 3 gene (PON3) missense mutations in

a population of southern Italy. *Mutat Res.* 2004 Feb 26;546(1-2):75-80.

Catano HC, Cueva JL, Cardenas AM, Izaguirre V, Zavaleta AI, Carranza E, et al. Distribution of paraoxonase-1 gene polymorphisms and enzyme activity in a Peruvian population. *Environ Mol Mutagen.* 2006 Dec;47(9):699-706.

Chan PC, Wong BYL, Cole DEC. Ethnic differences in allele frequencies at polymorphic sites of the paraoxonase genes, PON1 and PON2. *Clin Biochem.* 2000 33: 226.

Censo 2000. IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [Internet]. [citado em fev 2007]. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?z=t&o=21&i=P>.

Chen Q, Reis SE, Kammerer CM, McNamara DM, Holubkov R, Sharaf BL, et al. Association between the severity of angiographic coronary artery disease and paraoxonase gene polymorphisms in the National Heart, Lung, and Blood Institute-sponsored Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE) study. *Am J Hum Genet.* 2003 Jan;72(1):13-22.

Costa LG, Cole TB, Jarvik GP, Furlong CE. Functional genomic of the paraoxonase (PON1) polymorphisms: effects on pesticide sensitivity, cardiovascular disease, and drug metabolism. *Annu Rev Med.* 2003;54:371-92.

Costa LG, Vitalone A, Cole TB, Furlong CE. Modulation of paraoxonase (PON1) activity. *Biochem Pharmacol.* 2005 Feb 15;69(4):541-50.

Deakin SP, James RW. Genetic and environmental factors modulating

serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase-1. *Clin Sci (Lond)*. 2004 Nov;107(5):435-47.

dos Santos NPC, Ribeiro-dos-Santos AKC, Santos EB. Frequency of the Q192R and L55M polymorphisms of the human serum paraoxonase gene (PON1) in ten Amazonian Amerindian tribes. *Genet mol biol*. 2005 28 (1): 36-9.

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

Draganov DI, Stetson PL, Watson CE, Billecke SS, La Du BN. Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation. *J Biol Chem*. 2000 Oct 27;275(43):33435-42.

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

Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001 Apr;21(4):473-80.

Ferreira AV, Viana MC, Mill JG, Asmar RG, Cunha RS. Racial differences in aortic stiffness in normotensive and hypertensive adults. *J Hypertens*. 1999 May;17(5):631-7.

Fuchs SC, Guimaraes SM, Sortica C, Wainberg F, Dias KO, Ughini M, et al. Reliability of race assessment based on the race of the ascendants: a cross-sectional study. *BMC Public Health*. 2002;2:1.

Fuhrman B, Volkova N, Aviram M. Paraoxonase 1 (PON1) is present in postprandial chylomicrons. *Atherosclerosis*. 2005 May;180(1):55-61.

Gamboa R, Zamora J, Rodriguez-Perez JM, Fragoso JM, Cardoso G, Posadas-Romero C, et al. Distribution of paraoxonase PON1 gene polymorphisms in Mexican populations. Its role in the lipid profile. *Exp Mol Pathol*. 2006 Feb;80(1):85-90.

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*. 2000 Oct;152(2):421-31.

Garin MC, James RW, Dussoix P, Blanche H, Passa P, Froguel P, et al. Paraoxonase polymorphism Met-Leu54 is associated with modified serum concentrations of the enzyme. A possible link between the paraoxonase gene and increased risk of cardiovascular disease in diabetes. *J Clin Invest*. 1997 Jan 1;99(1):62-6.

Geldmacher-von Mallinckrodt M, Diepgen TL, Duhme C, Hommel G. A study of the polymorphism and ethnic distribution differences of human serum paraoxonase. *Am J Phys Anthropol*. 1983 Nov;62(3):235-41.

Getz GS, Reardon CA. Paraoxonase, a cardioprotective enzyme: continuing issues. *Curr Opin Lipidol*. 2004 Jun;15(3):261-7.

Gnasso A, Motti C, Irace C, Di Gennaro I, Pujia A, Leto E, et al. The Arg allele in position 192 of PON1 is associated with carotid atherosclerosis in subjects with elevated HDLs. *Atherosclerosis*. 2002 Oct;164(2):289-95.

Harel M, Aharoni A, Gaidukov L, Brumshtein B, Khersonsky O, Meged

R, et al. Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nat Struct Mol Biol.* 2004 May;11(5):412-9.

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

Hegele RA, Harris SB, Connelly PW, Hanley AJ, Tsui LC, Zinman B, et al. Genetic variation in paraoxonase-2 is associated with variation in plasma lipoproteins in Canadian Oji-Cree. *Clin Genet.* 1998 Nov;54(5):394-9.

Herrmann SM, Blanc H, Poirier O, Arveiler D, Luc G, Evans A, et al. The Gln/Arg polymorphism of human paraoxonase (PON 192) is not related to myocardial infarction in the ECTIM Study. *Atherosclerosis.* 1996 Oct 25;126(2):299-303.

Heijmans BT, Westendorp RG, Lagaay AM, Knook DL, Kluft C, Slagboom PE. Common paraoxonase gene variants, mortality risk and fatal cardiovascular events in elderly subjects. *Atherosclerosis.* 2000 Mar;149(1):91-7.

Hernandez AF, Mackness B, Rodrigo L, Lopez O, Pla A, Gil F, et al. Paraoxonase activity and genetic polymorphisms in greenhouse workers with long term pesticide exposure. *Hum Exp Toxicol.* 2003 Nov;22(11):565-74.

Hong SH, Song J, Min WK, Kim JQ. Genetic variations of the paraoxonase gene in patients with coronary artery disease. *Clin Biochem.* 2001 Sep;34(6):475-81.

Imai Y, Morita H, Kurihara H, Sugiyama T, Kato N, Ebihara A, et al. Evidence for association between paraoxonase gene polymorphisms and atherosclerotic diseases. *Atherosclerosis*. 2000 Apr;149(2):435-42.

Jakubowski H. Calcium-dependent human serum homocysteine thiolactone hydrolase. A protective mechanism against protein N-homocysteinylation. *J Biol Chem*. 2000 Feb 11;275(6):3957-62.

James RW, Deakin SP. The importance of high-density lipoproteins for paraoxonase-1 secretion, stability, and activity. *Free Radic Biol Med*. 2004 Dec 15;37(12):1986-94.

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

Khersonsky O, Tawfik DS. Structure-reactivity studies of serum paraoxonase PON1 suggest that its native activity is lactonase. *Biochemistry*. 2005 Apr 26;44(16):6371-82.

Ko YL, Ko YS, Wang SM, Hsu LA, Chang CJ, Chu PH, et al. 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*. 1998 Dec;141(2):259-64.

Krieger H, Morton NE, Mi MP, Azevedo E, Freire-Maia A, Yasuda N. Racial admixture in north-eastern Brazil. *Ann Hum Genet*. 1965 Nov;29(2):113-25.

La Du BN, Adkins S, Bayoumi RA. Analysis of the serum paraoxonase/arylesterase polymorphism in some Sudanese families. *Prog*

Clin Biol Res. 1986;214:87-98.

La Du BN, Aviram M, Billecke S, Navab M, Primo-Parmo S, Sorenson RC, et al. On the physiological role(s) of the paraoxonases. Chem Biol Interact. 1999 May 14;119-120:379-88.

La Du BN, Billecke S, Hsu C, Haley RW, Broomfield CA. Serum paraoxonase (PON1) isozymes: the quantitative analysis of isozymes affecting individual sensitivity to environmental chemicals. Drug Metab Dispos. 2001 Apr;29(4 Pt 2):566-9.

Lessa I, Fonseca J. [Race, compliance to treatment and/or consultation and control of arterial hypertension]. Arq Bras Cardiol. 1997 Jun;68(6):443-9.

Leus FR, Voorbij HAM, Kastelein JJP. Paraoxonase 2 (PON2) gene polymorphism is associated with cardiovascular disease (CVD) in patients with familial hypercholesterolemia (FH). Atherosclerosis. 2000, 114 (suppl. 1): 116-7.

Leus FR, Zwart M, Kastelein JJ, Voorbij HA. PON2 gene variants are associated with clinical manifestations of cardiovascular disease in familial hypercholesterolemia patients. Atherosclerosis. 2001 Feb 15;154(3):641-9.

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. 2001 Apr;42(4):528-35.

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

Lu H, Zhu J, Zang Y, Ze Y, Qin J. Cloning, high level expression of

human paraoxonase-3 in Sf9 cells and pharmacological characterization of its product. *Biochem Pharmacol.* 2005 Oct 1;70(7):1019-25.

Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature.* 2000 Sep 14;407(6801):233-41.

Mackness B, Davies GK, Turkie W, Lee E, Roberts DH, Hill E, et al. Paraoxonase status in coronary heart disease: are activity and concentration more important than genotype? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001 Sep;21(9):1451-7.

Mackness B, Durrington P, McElduff P, Yarnell J, Azam N, Watt M, et al. Low paraoxonase activity predicts coronary events in the Caerphilly Prospective Study. *Circulation.* 2003 Jun 10;107(22):2775-9.

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

Mackness B, Mackness MI, Durrington PN, Arrol S, Evans AE, McMaster D, et al. Paraoxonase activity in two healthy populations with differing rates of coronary heart disease. *Eur J Clin Invest.* 2000 Jan;30(1):4-10.

Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett.* 1991 Jul 29;286(1-2):152-4.

Mackness MI, Durrington PN, Mackness B. The role of paraoxonase 1 activity in cardiovascular disease: potential for therapeutic intervention. *Am J Cardiovasc Drugs.* 2004;4(4):211-7.

Marathe GK, Zimmerman GA, McIntyre TM. Platelet-activating factor acetylhydrolase, and not paraoxonase-1, is the oxidized phospholipid

hydrolase of high density lipoprotein particles. *J Biol Chem.* 2003 Feb 7;278(6):3937-47.

Matters S. Ethnicity, race, and culture: guidelines for research, audit, and publication. *Bmj.* 1996 Apr 27;312(7038):1094.

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

Metodologia do censo demográfico 2000. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [Internet]. 2003 [citado dez 2006];[241p]. Disponível em:<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2000/metodologia/metodologiacenso2000.pdf>.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988 Feb 11;16(3):1215.

Motti C, Dessi M, Gnasso A, Irace C, Indigeno P, Angelucci CB, et al. A multiplex PCR-based DNA assay for the detection of paraoxonase gene cluster polymorphisms. *Atherosclerosis.* 2001 Sep;158(1):35-40.

Ng CJ, Shih DM, Hama SY, Villa N, Navab M, Reddy ST. The paraoxonase gene family and atherosclerosis. *Free Radic Biol Med.* 2005 Jan 15;38(2):153-63.

Ng CJ, Wadleigh DJ, Gangopadhyay A, Hama S, Grijalva VR, Navab M, et al. Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *J Biol Chem.* 2001 Nov 30;276(48):44444-9.

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

Ombres D, Pannitteri G, Montali A, Candeloro A, Seccareccia F, Campagna F, et al. The gln-Arg192 polymorphism of human paraoxonase gene is not associated with coronary artery disease in Italian patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998 Oct;18(10):1611-6.

Padungtod C, Niu T, Wang Z, Savitz DA, Christiani DC, Ryan LM, et al. Paraoxonase polymorphism and its effect on male reproductive outcomes among Chinese pesticide factory workers. *Am J Ind Med.* 1999 Sep;36(3):379-87.

Pati N, Pati U. Paraoxonase gene polymorphism and coronary artery disease in Indian subjects. *Int J Cardiol.* 1998 Sep 30;66(2):165-8.

Pena SDJ, Carvalho-Silva DR, Alves-Silva J, Prado VF, Santos FR. Retrato molecular do Brasil. *Ciência Hoje.* 2000; 27, 159:16-25.

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

Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics.* 1996 May 1;33(3):498-507.

Reddy ST, Wadleigh DJ, Grijalva V, Ng C, Hama S, Gangopadhyay A, et al. Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized

lipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001 Apr;21(4):542-7.

Rodrigo L, Mackness B, Durrington PN, Hernandez A, Mackness MI. Hydrolysis of platelet-activating factor by human serum paraoxonase. *Biochem J.* 2001 Feb 15;354(Pt 1):1-7.

Rojas-Garcia AE, Solis-Heredia MJ, Pina-Guzman B, Vega L, Lopez-Carrillo L, Quintanilla-Vega B. Genetic polymorphisms and activity of PON1 in a Mexican population. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005 Jun 15;205(3):282-9.

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

Ruiz J, Blanche H, James RW, Garin MC, Vaisse C, Charpentier G, et al. Gln-Arg192 polymorphism of paraoxonase and coronary heart disease in type 2 diabetes. *Lancet.* 1995 Sep 30;346(8979):869-72.

Sanghera DK, Aston CE, Saha N, Kamboh MI. DNA polymorphisms in two paraoxonase genes (PON1 and PON2) are associated with the risk of coronary heart disease. *Am J Hum Genet.* 1998 Jan;62(1):36-44.

Scacchi R, Corbo RM, Rickards O, De Stefano GF. New data on the world distribution of paraoxonase (PON1 Gln 192 --> Arg) gene frequencies. *Hum Biol.* 2003 Jun;75(3):365-73.

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.* 2000 Sep;20(9):2120-6.

Senti, Tomas M, Anglada R, Elosua R, Marrugat J, Covas MI, et al.

Interrelationship of smoking, paraoxonase activity, and leisure time physical activity: a population-based study. *Eur J Intern Med.* 2003 May;14(3):178-84.

Serrato M, Marian AJ. A variant of human paraoxonase/arylesterase (HUMPONA) gene is a risk factor for coronary artery disease. *J Clin Invest.* 1995 Dec;96(6):3005-8.

Shih DM, Gu L, Xia YR, Navab M, Li WF, Hama S, et al. Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature.* 1998 Jul 16;394(6690):284-7.

Sorenson RC, Aviram M, Bisgaier CL, Billecke S, Hsu C, La Du BN. Properties of the retained N-terminal hydrophobic leader sequence in human serum paraoxonase/arylesterase. *Chem Biol Interact.* 1999 May 14;119-120:243-9.

Sorenson RC, Primo-Parmo SL, Kuo CL, Adkins S, Lockridge O, La Du BN. Reconsideration of the catalytic center and mechanism of mammalian paraoxonase/arylesterase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Aug 1;92(16):7187-91.

Suehiro T, Nakamura T, Inoue M, Shiinoki T, Ikeda Y, Kumon Y, et al. A polymorphism upstream from the human paraoxonase (PON1) gene and its association with PON1 expression. *Atherosclerosis.* 2000 Jun;150(2):295-8.

Suehiro T, Nakauchi Y, Yamamoto M, Arai K, Itoh H, Hamashige N, et al. Paraoxonase gene polymorphism in Japanese subjects with coronary heart disease. *Int J Cardiol.* 1996 Nov 15;57(1):69-73.

Teiber JF, Draganov DI, La Du BN. Lactonase and lactonizing

activities of human serum paraoxonase (PON1) and rabbit serum PON3. *Biochem Pharmacol.* 2003 Sep 15;66(6):887-96.

Thompson MW, McInnes RR, Willard HF. *Thompson & Thompson – Genética médica.* 5a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1991. Cap.7, p.100-114: Genes nas populações.

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

Yamada Y, Ando F, Niino N, Miki T, Shimokata H. Association of polymorphisms of paraoxonase 1 and 2 genes, alone or in combination, with bone mineral density in community-dwelling Japanese. *J Hum Genet.* 2003;48(9):469-75.

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