



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANDRÉ DE SOUZA NOGUEIRA

**INFLUÊNCIA DO *status* DA ENZIMA PARAOXONASE1 (PON1) NO
PERFIL LIPÍDICO E MARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO EM
INDIVÍDUOS DO MUNICÍPIO DE CAMBÉ-PR**

ANDRÉ DE SOUZA NOGUEIRA

**INFLUÊNCIA DO *status* DA ENZIMA PARAOXONASE1 (PON1) NO
PERFIL LIPÍDICO E MARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO EM
INDIVÍDUOS DO MUNICÍPIO DE CAMBÉ-PR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a Dr^a Estefânia Gastaldello Moreira

Londrina
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

N778i Nogueira, André de Souza.

Influência do *status* da enzima paraoxonase1 (PON1) no perfil lipídico e marcadores do estresse oxidativo em indivíduos do município de Cambé-PR. – Londrina, 2014.
63 f. il.

Orientador: Estefânia Gastaldello Moreira.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2014.

Inclui bibliografia.

1. Enzimas – Teses. 2. Tabagismo – Teses. 3. Lipídios – Teses. 4. Estresse oxidativo – Teses. I. Moreira, Estefânia Gastaldello. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDU 615.35:613.84

ANDRÉ DE SOUZA NOGUEIRA

**INFLUÊNCIA DO *status* DA ENZIMA PARAOXONASE1 (PON1) NO PERFIL
LIPÍDICO E MARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO EM INDIVÍDUOS DO
MUNICÍPIO DE CAMBÉ-PR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Estefânia Gastaldello Moreira
UEL – Londrina - PR

Prof^a Dr^a Edna Maria Vissoci Reiche
UEL – Londrina - PR

Prof. Dr. Alberto Durán González
UEL – Londrina - PR

Londrina, 26 de fevereiro de 2014.

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo e de todos, agradeço a Deus pelas bênçãos, por Sua graça, misericórdia, companhia e capacitação em mais esta etapa da minha vida.

Aos meus pais, Horácio Toledo Nogueira e Mirian de Souza Nogueira, por todo amor, carinho, compreensão e apoio que me deram, não só nestes dois anos de pós-graduação, mas por estarem presentes em cada dia, a cada conquista. Sem vocês, este trabalho jamais seria possível.

À minha noiva, Fernanda Sofia Primo, que compreensivamente, suportou e me apoiou em cada crise de ansiedade, que com paciência e amor imensuráveis me ajudou nos momentos mais difíceis e brindou comigo nos momentos de alegria. Todo o esforço foi por nós.

À grande protagonista desta pesquisa, minha orientadora Prof^a Dr^a Estefânia Gastaldello Moreira, que me ensinou, com todo carisma que lhe é peculiar, as facetas do mundo acadêmico e dividiu comigo seu grande conhecimento. Momentos difíceis vieram, mas seu apoio e crédito depositados em mim, assim como palavras de otimismo, me fortaleceram e me levaram a prosseguir. Muito obrigado é pouco por tanto que me foi ofertado. Ainda mais, agradeço pelo carinho, amizade e a renovação do nosso “contrato” por mais quatro anos.

Ao Prof. Dr. Décio Sabbatini Barbosa pela ajuda no Laboratório de Pós Graduação, na padronização da metodologia, sua eterna disposição em ajudar e por suas contribuições sem medida para este trabalho.

Aos meus irmãos, Juliano Augusto de Souza Nogueira e Lucas de Souza Nogueira, e a toda a minha família, especialmente às minhas tias Odete de Souza e Débora de Souza, por me ajudarem a compreender a importância das minhas realizações.

Às grandes amigas, Prof^a M^a Conceição Aparecida Turini e Miriam de Cássia Tóffolo. Não tenho palavras para descrever o quanto admiro e respeito vocês. O apoio, ajuda e incentivo que me deram foram maiores do que minhas próprias forças e me trouxeram até aqui. Muito obrigado por fazerem parte da minha jornada.

A toda a equipe do Laboratório de Pós Graduação, Ana Laura, Andressa Keiko, Alissana Ester Camargo, Chiara Bortolasci, Carine Coneglian, Denise Santiago, Kamila Landucci, Karine Boll, Luciana Higachi, Marcela Zambrim, Marlene Bardi, Paula Godeny e

Renata Martinez. Do mesmo modo, a todas as funcionárias da Secretaria de Pós Graduação, em especial à Sandra Lage, por toda a ajuda prestada.

To Dr. Clement E. Furlong and Rebecca J. Richter for all attention and reception in your laboratory, yours collaboration for this work was immeasurable. It was a great pleasure and satisfaction working with you. Thank you so much.

To Dr. Michael Maes, contributing with statistics analyses for this work.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos que contribuíram para a realização deste trabalho. Esta conquista não é somente minha, pertence a todos nós.

*"Porque melhor é a sabedoria do que rubis, e de tudo o
que se deseja nada se pode comparar a ela"
Provérbios 8:11*

SOUZA-NOGUEIRA, André. **Influência do *status* da enzima paraoxonase1 (PON1) no perfil lipídico e marcadores do estresse oxidativo em indivíduos do município de Cambé-PR.** 2014. 63 f. Dissertação de Mestrado (Pós-Graduação em Ciências da Saúde). Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

RESUMO

A influência do *status* da enzima paraoxonase1 (PON1 *status* – genotipagem funcional do polimorfismo *PON1 Q192R*, rs662, e dosagem da atividade plasmática total) no perfil lipídico e sua associação com o tabagismo estudada em 487 indivíduos com mais de 40 anos. Foram analisados os níveis de glicemia, o perfil lipídico, marcadores de estresse oxidativo e o PON1 *status* por três ensaios enzimáticos, utilizando fenilacetato e 4-(clorometil)fenil-acetato como substratos. Ademais, os índices de Castelli 1 e 2 foram calculados pelas razões colesterol total/lipoproteínas de alta densidade (HDL) e lipoproteínas de baixa densidade(LDL)/HDL, respectivamente e, considerado como covariável das análises, o auto relato de tabagismo. Análises de regressão utilizando a medida da circunferência abdominal, idade e a interação entre o polimorfismo *PON1 Q192R**tabagismo, mostrou que o tabagismo está associado com a diminuição dos níveis de HDL colesterol ($p= 0,046$), com o aumento dos índices de Castelli 1 e 2 ($p= 0,001$; $p= 0,003$) e dos níveis de triglicerídeos ($p= 0,002$), especialmente nos indivíduos *PON1 192R*, quando comparados aos *PON1 192QQ*, ainda que o polimorfismo *PON1 192QR* não tenha apresentado, isoladamente, uma associação positiva com o perfil lipídico. Comparados com os indivíduos *PON1 192QQ*, o genótipo *PON1 192RR* esteve associado com a diminuição da atividade da PON1 ($p=0,04$). Os marcadores do estresse oxidativo não foram influenciados pelo PON1 *status*.

Palavras-chave: Perfil lipídico. Estresse oxidativo. Paraoxonase 1. Tabagismo.

SOUZA-NOGUEIRA, André. **Paraoxonase1 (PON1) enzyme *status* influence on lipid profile and oxidative stress markers in subjects in the municipality of Cambé-PR.** In 2014. 63 p. Dissertation (Master's Degree Dissertation). State University of Londrina, Londrina, 2014.

ABSTRACT

The influence of enzyme paraoxonase 1 (PON1 *status* - functional genotyping of *PON1 Q192R* polymorphism, rs662, and plasmatic activity) in lipid profile and its association with smoking has been evaluated in 487 subjects older than 40 years. We analyzed glucose, lipid profile, oxidative stress markers and PON1 *status* through three kinetic assays using phenylacetate and 4-(chloromethyl)phenyl acetate as substrates. Moreover, Castelli 1 and 2 indexes were calculated by the ratios total cholesterol/HDL cholesterol and LDL cholesterol/HDL cholesterol, respectively and, considerate as covariate, smoking self-declared. Regression analyses on abdominal circumference, age and the interaction *PON1 Q192R* polymorphism*smoking showed that smoking are associated with low HDL cholesterol levels ($p=0.046$, increased Castelli 1 and 2 indexes ($p=0.001$; $p=0.002$) and increased triglycerides levels ($p=0.002$), particularly in *PON1 192R* subjects when compared with *PON1 192QQ* ones, although the *PON1 192QR* polymorphism wasn't associated, singly, with lipid profile. Compared to *PON1 192QQ* individuals, *PON1 192RR* genotype was associated with decreased PON1 activity ($p=0.04$). Oxidative stress markers were not influenced by PON1 *status*.

Keywords: Lipid profile. Oxidative stress. Paraoxonase 1. Smoking.

LISTA DE ABREVIATURAS

AREase	Atividade arilesterase
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CMPA	<i>4-(chloromethyl)phenyl acetate</i> (4-(clorometil)fenil-acetato)
DCV	Doença cardiovascular
DZOase	Atividade diazoxonase
Gln	Glutamina
Gly	Glicina
HDL	<i>High density lipoprotein</i> (lipoproteína de alta densidade)
LDL	<i>Low density lipoprotein</i> (lipoproteína de baixa densidade)
LDLox	<i>Oxidized low density lipoprotein</i> (lipoproteína de baixa densidade oxidada)
Leu	Leucina
LOOH	Hidroperóxidos lipídicos
LPG	Laboratório de Pós-Graduação
Met	Metionina
OFs	Organofosforados
PA	<i>Phenyl acetate</i> (Fenilacetato)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
POase	Atividade paraoxonase
PON	Enzima paraoxonase
PON1	Paraoxonase1
PON2	Paraoxonase2
PON3	Paraoxonase3
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i> (polimorfismo por fragmento de restrição)
RNA _m	RNA mensageiro
RNA _t	RNA transportador
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> (polimorfismo de nucleotídeo único)
Sp1	Fator de transcrição Sp1
TRAP	<i>Total peroxy radical trapping antioxidant</i> (potencial antioxidante plasmático total)
UEL	Universidade Estadual de Londrina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	20
2.1	OBJETIVOS GERAIS	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3	MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1	POPULAÇÃO E AMOSTRAGEM	21
3.2	ANÁLISES LABORATORIAIS	22
3.2.1	Perfil Lipídico e Glicemia	22
3.2.2	Estresse Oxidativo	23
3.2.2.1	Potencial antioxidante plasmático total (TRAP).....	23
3.2.2.2	Hidroperóxidos lipídicos (LOOH)	24
3.2.3	Determinação do PON1 <i>status</i>	24
3.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO NO FORMATO DE ARTIGO CIENTÍFICO	27
5	CONCLUSÃO	46
	REFERÊNCIAS	47
	ANEXOS	53
	ANEXO A – Termo de Aprovação de Pesquisa	54
	ANEXO B – TRAP em Microplaca	55
	ANEXO C – Hidroperóxidos Lipídicos por Espectrofotometria	58
	ANEXO D – Determinação do PON1 <i>status</i>	60

1 INTRODUÇÃO

Os primeiros relatos da produção e utilização de compostos organofosforados (OFs) datam do século XIX, porém, o primeiro caso de intoxicação por estes agentes foi publicado somente em 1932 por Lange e Krueger (LANGE; KRUEGER, 1932 *apud* MAZUR; BODANSKY, 1946), relatando um quadro de neurotoxicidade em um trabalhador britânico e propondo uma possível relação do tipo causa-efeito. Alguns anos mais tarde, um grupo de pesquisadores publicou dois trabalhos que inflamaram as pesquisas sobre estes inseticidas: Mazur e Bodansky (1946) descreveram o mecanismo de toxicidade dos OFs como agentes inibidores das colinesterases e Mazur (1946) comprovou a presença de enzimas, no plasma de coelhos, macacos e humanos, que participariam, ao menos em parte, do processo de destoxificação dos OFs. Essas enzimas foram classificadas como α -esterases.

Nessa época, a denominação “ α -esterase” fazia referência a um grupo de diferentes enzimas com atividade catalítica semelhante, participando da hidrólise de diversos substratos. Estas enzimas foram, então, classificadas e nomeadas de acordo com o substrato para o qual apresentavam afinidade: atividade paraoxonase (ou POase) se hidrolizassem paraoxon; atividade diazoxonase (ou DZOase) se hidrolizassem o diazoxon; atividade arilesterase (ou AREase) se hidrolizassem o fenilacetato; e lactonase se hidrolizassem ésteres de lactona. Entretanto, descobriu-se que a diferença na afinidade substrato-específica tratava-se, na verdade, de seletividade distinta de uma única enzima, sendo então denominada paraoxonase ou, simplesmente, PON1 (EC 3.1.8.1). Esta nomenclatura foi adotada pelo fato do paraoxon ser o substrato clássico desta enzima, porém a utilização de diferentes metodologias nos estudos conduzidos hoje, mantém as denominações antigas (POase, DZOase e AREase) como indicadores dos substratos utilizados, muito embora sempre refiram-se à mesma enzima, a PON1 (ALBRIDGE, 1953; SORENSON et al., 1995).

Três isoformas desta enzima já foram descritas: PON1, PON2 e PON3, nomeadas de acordo com a ordem de suas identificações. Os genes *PON* (codificados no braço longo do cromossomo 7, entre q21.3 e q22.1) são similares entre si e apresentam grande homologia estrutural (COSTA et al., 2003b; MASELLI, 2007). Em humanos, as três enzimas possuem cerca de 60% de identidade em aminoácidos e cerca de 70% de identidade

em nucleotídeos.

Devido à sua recente descrição, estudos sobre a PON2 ainda são escassos. Entre os principais, um estudo conduzido por Li, Liu e Liang (2003), descreveu a importância fisiológica desta enzima, comprovando que a PON2, além de apresentar importante atividade antioxidante, é também amplamente expressa em diversos tecidos humanos, como fígado, coração, cérebro, rim, pulmão, testículo e placenta, entretanto, apresenta baixos níveis plasmáticos, dessa forma, sua ação antioxidante é, predominantemente, intracelular. Em um estudo recente, Costa et al. (2013) descreveram o efeito neuroprotetor da PON2, com concentração desta enzima em regiões dopaminérgicas de camundongos, podendo estar relacionada com o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson.

A PON1 e a PON3 possuem algumas similaridades. Ambas são glicoproteínas de síntese hepática com atividade esterásica dependente de cálcio como cofator para suas reações. Todavia, ocorre importante expressão renal da PON3, ao passo que a expressão renal da PON1 é reduzida. Outro ponto em comum entre as isoformas é a ligação a partículas de lipoproteína de alta densidade (HDL - *high density lipoprotein*). Segundo Li, Liu e Liang (2003), a afinidade da PON3 pelas partículas de HDL é cerca de 100 vezes maior e sua expressão 200 vezes menor do que a PON1.

Dentre as três isoformas, a PON1 é a mais estudada, podendo ser encontrada no plasma de diferentes mamíferos, como coelhos, ratos, macacos, símios e humanos, sempre associada às partículas de HDL. Possui 355 aminoácidos em sua estrutura, dos quais somente uma metionina, situada na porção amino-terminal, é removida entre a secreção e maturação. Como descrito anteriormente, esta enzima é uma glicoproteína de síntese predominantemente hepática, porém, também há, em grau reduzido, síntese renal e em alças intestinais. Uma vez sintetizada, a PON1 é logo conjugada a partículas de HDL, sendo encontrada, no plasma, somente nesta forma. Seu sítio catalítico para a destoxificação de OFs utiliza íons cálcio como cofator, mas ainda não há relatos de que este íon também exerça influência na atividade antioxidante desta enzima (COSTA et al., 2003b).

O gene codificador da enzima PON1 está localizado em uma região altamente polimórfica, composta por, pelo menos, nove éxons diferentes, somando mais de 160 polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs - *single nucleotide polymorphism*) descritos nas regiões promotora e codificadora (CHEN et al., 2005). Dentre os polimorfismos

presentes na região codificadora, os mais estudados são: uma substituição do aminoácido glutamina (Glu ou Q) por uma arginina (Arg ou R) na posição 192 da cadeia polipeptídica (*PON1 Q192R*, rs 662), e substituição leucina (Leu ou L) por uma metionina (Met ou M) na posição 55 (*PON1 L55M*, rs 854560). Na região promotora, o polimorfismo mais significativo é o que ocorre na posição -108, no qual há a troca de uma citosina por uma timina (*PON1 -108 C/T*, rs 705379) (BROPHY; JARVIK; FURLONG, 2002; COSTA et al., 2003b).

De fato, os SNPs são os mais frequentes tipos de polimorfismo genético encontrados na população, com uma frequência de 1 SNP a cada 1000 pares de bases, sendo responsáveis por cerca de 90% de todas as variações genômicas humanas. Por definição, um SNP é um polimorfismo no qual ocorre a alteração de somente um nucleotídeo, com a substituição de uma única base nitrogenada (adenina, timina, citosina ou guanina), gerando um códon diferente a ser traduzido. Os SNPs não são eventos do tipo *indel* aleatórios. Em geral, para que uma alteração seja considerada como polimorfismo, esta deve ocorrer com uma frequência maior do que 1% na população geral, caso contrário, esta troca é classificada como uma mutação (NUSSBAUM; McINNES; WILLARD, 2008; WYERS et al., 2009).

Existem diferentes resultados possíveis quando nos deparamos com um SNP:

- a) O códon alterado transcreve o mesmo aminoácido do códon original. Esta troca é classificada como silenciosa ou SNP sinônimo, pois não altera o produto final da transcrição (proteína ou enzima);
- b) O códon alterado transcreve um aminoácido diferente. Neste caso existem duas outras possibilidades: os SNPs *missense*, ou não sinônimos, que são aqueles em quem a proteína gerada não apresenta função biológica ou apresenta uma função biológica distinta; os SNPs *nonsense*, quando o códon alterado transcreve um códon de parada e interrompe a tradução antes do término da cadeia polipeptídica.

Diversos estudos têm demonstrado que a distribuição dos genes *PON1* é polimórfica. As frequências alélicas dos genótipos *PON1 Q192R* e *PON1 L55M* têm sido investigadas em várias populações e os resultados mostram grande variabilidade (ALLEBRANDT; SOUZA; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, 2002; BROPHY; JARVIK; FURLONG, 2002). Por exemplo, indivíduos de origem hispânica apresentam maior frequência do alelo *PON1 192R* do que os originários do norte europeu (GHORBANIHAGHJO et al., 2005). Em um

estudo conduzido com brasileiros, foi observado que eurobrasileiros apresentam maior frequência do alelo *PON1 192Q* e os afrobrasileiros, maior frequência do alelo *PON1 192R* (ALLEBRANDT; SOUZA; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, 2002). É importante mencionar que o polimorfismo *PON1 Q192R* influencia a atividade catalítica desta enzima e que a direção dessa modificação (aumento ou diminuição) é substrato-seletiva, ou seja, não existe uma isoforma que apresente maior atividade catalítica para todos os substratos (SHIH et al., 2006).

Estudos na última década já têm mostrado que esta diferença na capacidade metabolizadora plasmática da PON1 não se restringe à sua capacidade catalítica, mas é influenciada, também, por sua expressão. Dois SNPs foram estudados para justificar esta modulação, um destes na região promotora (*PON1 -108C/T*) e outro na codificadora (*PON1 L55M*). Por fim, estudos de Costa et al. (2003a, 2003b, 2005b) e Costa, Cole e Furlong (2003) propuseram a ocorrência de um desequilíbrio de ligação entre estes dois polimorfismos, no qual o principal responsável pela modulação da expressão seria o SNP presente na região promotora, uma vez que polimorfismos presentes nesta região alteram a taxa de ligação dos fatores de transcrição e a produção de RNAm, modulando a taxa de formação de RNAt e, conseqüentemente, o nível de transcrito. O alelo *PON1 55M*, assim como o *PON1 -108T*, está associado a menor expressão da enzima (BROPHY; JARVIK; FURLONG, 2002; COSTA et al., 2003a,b, 2005b; COSTA; COLE; FURLONG, 2003).

Com o atual crescimento e avanço na área de conhecimento da biologia molecular, diferentes técnicas têm sido desenvolvidas e empregadas. A escolha destas metodologias varia muito de acordo com o objetivo dos estudos, entretanto, a utilização da técnica de polimorfismo por fragmento de restrição (RFLP - *restriction fragment length polymorphism*), que utiliza enzimas de restrição, ou endonucleases, e técnicas de *Multiplex PCR* (*polymerase chain reactions* – reação em cadeia da polimerase) parecem ser as mais utilizadas nos estudos sobre os polimorfismos da PON1 (JARVIK et al. 2000; GNASSO et al., 2002; VOETSH et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2004; ROBERTSON et al., 2003; RIOS et al., 2007; HIMBERGEN et al., 2008; LI et al., 2009; REGIELI et al., 2009; MOHAMED et al., 2010; FUJIHARA et al., 2011).

Um grupo da Universidade de Washington, Seattle, EUA, liderado pelo Dr. Clemente E. Furlong tem proposto que a genotipagem funcional da PON1 forneceria dados mais fidedignos quanto a real atividade hidrolítica plasmática dessa enzima, uma vez que

esta avalia não somente o polimorfismo genético, mas também reflete a modulação desta enzima por fatores ambientais, como o uso de medicamentos, consumo de alimentos antioxidantes, hábitos de vida e o consumo de álcool. A determinação do PON1 *status* é possível por um ensaio enzimático triplo, descrito em duas metodologias equivalentes por Richter e Furlong (1999) e Richter, Jarvik e Furlong (2008).

Para estratificar os indivíduos nos três genótipos funcionais para o polimorfismo *PON1 Q192R* (*PON1 192QQ*, *PON1 192QR* e *PON1 192RR*), dois substratos são usados. Originalmente, esses substratos eram o diazoxon e o paraoxon (RICHTER; FURLONG, 1999), intercambiáveis pelo fenilacetato (PA) e 4-(clorometil)fenil-acetato (CMPA), que têm a vantagem de serem menos tóxicos. A aloenzima *PON1 192Q* apresenta baixa eficiência para metabolizar o paraoxon (ou CMPA) e alta afinidade ao metabolizar o diazoxon. A reação com o diazoxon (ou PA) é realizada em condições de elevada salinidade com o objetivo de separar os indivíduos *PON1 192QR* dos indivíduos *PON1 192RR* e *PON1 192QQ*, utilizando-se a plotagem da taxa de hidrólise do diazoxon em elevada salinidade (ou PA em alta salinidade) *versus* a taxa de hidrólise do paraoxon (ou CMPA). Isso é possível porque em condições de alta salinidade, em um meio com 2,0 M de NaCl, ocorre a inibição da isoforma *PON1 192R* (RICHTER; FURLONG, 1999). Um terceiro ensaio enzimático conduzido com o PA em condições de baixa salinidade revela a atividade plasmática total para os três genótipos *PON1 Q192R*, pois tanto a isoforma *PON1 192Q* quanto a *PON1 192R*, hidrolisam o PA com eficiências similares em condições de baixa salinidade (FURLONG et al., 2006).

É importante mencionar que, na população, a atividade da PON1 pode variar de 1 a 50 vezes e os níveis séricos de 13 a 15 vezes. Isso demonstra a importância de se avaliar o PON1 *status* e não somente o genótipo dos indivíduos, como descrito por Costa et al. (2003b), Richter e Furlong (1999) e Richter et al. (2010).

Por participar da destoxificação de inseticidas OFs, a utilização do PON1 *status* como biomarcador de susceptibilidade nas exposições a estes agentes tem sido investigada (COSTA et al., 2005a).

O termo biomarcador é usado para quaisquer marcadores, sejam eles biológicos, bioquímicos e/ou moleculares que possam ser mensurados. Em humanos, estes marcadores devem estar acessíveis para coleta de maneira ética e simples, em materiais como sangue, urina ou células de mucosa oral (COSTA et al., 2005a). Existem três tipos de biomarcadores: de exposição ou dose interna (presença do agente tóxico ou seu metabólito

em algum compartimento corporal); de efeito (alteração bioquímica ou fisiológica mensurável decorrente do mecanismo de toxicidade do agente tóxico) e de susceptibilidade (fatores genéticos, ambientais, estilo de vida ou nutrição), os quais tornam algumas pessoas mais susceptíveis à manifestação de alguma doença ou de toxicidade (NATIONAL ACADEMIES KECK FUTURE INITIATIVE, 2011).

Embora a atividade hidrolítica da PON1 contra agentes externos já tivesse sido determinada, a partir da década de 1990 houve grande dedicação para elucidar seu papel fisiológico e em 1998, Aviram et al. descreveram a atividade antioxidante desta enzima. Segundo o autor, dos 355 aminoácidos que compõe esta enzima, três são cisteínas, duas situadas meio da cadeia polipeptídica e uma livre, que atua como importante doadora de grupamento sulfidríla, responsável por sua atividade antioxidante. O mesmo autor sugere, em outros estudos, que esta enzima seria capaz de hidrolisar, também, o ácido araquidônico, participando, então, no processo inflamatório. Entretanto, até o momento, estes dados ainda não foram totalmente elucidados (AVIRAM; VAYA, 2013).

Desta forma, a participação da PON1 em diversas doenças que envolvem estresse oxidativo ou a resposta inflamatória tem sido investigada. Estudos foram conduzidos buscando a associação desta enzima e doenças como o Alzheimer (KLIMKOWICZ-MROWIEC et al. 2011), Parkinson (BELIN et al. 2012), câncer (ANTOGNELLI et al., 2009), esclerose lateral amiotrófica (VALDMANIS et al., 2008), síndrome metabólica (RUPÉREZ et al. 2013), diabetes (KOREN-GLUZER et al., 2011), dislipidemias (MACKNESS et al., 1991) e a aterosclerose (AGRAWAL et al., 2009; HASSAN et al., 2013; TANG et al., 2012; ZHANG et al., 2013), sendo esta última a mais estudada e discutida entre elas.

As doenças cardiovasculares (DCV) constituem a primeira causa de morte não violenta no mundo e é a principal *causa mortis* no Brasil. Somente no ano de 2011, o Ministério da Saúde registrou 972.048 óbitos em indivíduos com 40 anos ou mais, destes, 33,1% foram ocasionados por DCV, sendo 31,3% por doença isquêmica do coração e 30,4% por doença cerebrovascular. As causas atribuíveis à aterosclerose somaram 65,3% dos óbitos por DCV (DATASUS, 2013).

Fatores externos, como a má alimentação e o sedentarismo, embora extremamente importantes, não são os únicos relacionados ao desenvolvimento de desordens do aparato cardiocirculatório. Na realidade, sabe-se que há uma miscelânea de

fatores que contribuem para tal desfecho, dentre eles, predisposições genéticas e metabólicas têm sido investigadas.

O estresse oxidativo é o desbalanço homeostático entre a formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, e a produção de agentes antioxidantes (SIES, 1997), sendo a causa primária no processo de instalação das DCV e aterogênicas, segundo Afonso, Sant'Ana e Mancini-Filho (2010), uma vez que este desequilíbrio leva ao processo de lipoperoxidação.

Sabe-se que a HDL atua inibindo ou diminuindo a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL - *low density lipoprotein*) (BLATTER et al., 1993; NAVAB et al., 1997). Quando há baixa quantidade de HDL no organismo, há grande formação de LDL oxidado (LDLox), o que leva à estimulação da quimiotaxia dos monócitos, à formação de células espumosas, à disfunção endotelial e a uma ação direta sobre a parede do endotélio estimulando a produção de citocinas pró-inflamatórias (AFONSO; SANT'ANA; MANCINI-FILHO, 2010).

Uma vez ligada à HDL, a PON1 participa triplamente na proteção contra o processo de lipoperoxidação. Por possuir atividade catalase *símile*, a PON1 é capaz de reagir com o peróxido de hidrogênio, principal pró-oxidante produzido em nosso organismo. Além disso, por ser doadora de grupamentos sulfidríla, protege a LDL contra processos oxidativos e, também, exerce ação protetora na HDL. Devido à sua importante participação no processo de lipoperoxidação, diversos estudos foram conduzidos para relacionar a atividade da PON1 e algumas doenças. Foi encontrado que níveis mais baixos da PON1 estariam relacionados com o surgimento de aterosclerose, hipercolesterolemia familiar, hipertensão arterial e diabetes (AZIZI et al., 2002; CAGIRCI et al., 2009; HORTER et al., 2002; SENTI et al., 2003; YILDIZ et al., 2007).

Por influenciar a atividade hidrolítica da PON1, há algum tempo acredita-se que o polimorfismo *PON1 Q192R* poderia influenciar a capacidade da PON1 de proteger a LDL contra oxidação. Senti et al. (2003) e Costa et al. (2005b) propuseram que o alelo *PON1 192Q* favoreceria a saúde cardiovascular por conferir maior capacidade hidrolítica de lipídeos oxidados. Aviram et al. (1998) também relacionaram o alelo *PON1 192Q* como maior protetor, mas por acreditar que esta isoforma apresentasse uma maior estabilidade na ligação à HDL e, conseqüentemente, maior atividade hidrolítica.

Entretanto, uma meta-análise conduzida com 43 estudos mostrou associação fraca entre o polimorfismo *PON1 Q192R* e doença coronária e concluiu que a associação era de significância incerta (WHEELER et al., 2004). Diferentemente do que descreveram Aviram et al. (1998), Gaidukov et al. (2006) relataram que o alelo *PON1 192R* favoreceria a ligação da PON1 à HDL, e não o *PON1 192Q*. Bhattacharyya et al. (2008) encontraram em pacientes com genótipo *PON1 192Q*, maior incidência de eventos cardíacos. Outros estudos relataram falta de associação entre o polimorfismo *PON1 Q192R* e doença cardiovascular (GARDEMANN et al., 2000; OMBRES et al., 1998).

Esta divergência de resultados fortalece o que vem sendo preconizado pelo grupo do Dr. Furlong, sugerindo que, para investigar a PON1 como biomarcador de susceptibilidade para DVCs, precisa-se ir além da genotipagem. A determinação do PON1 *status* seria o marcador mais fidedigno, uma vez que considera tanto o polimorfismo *PON1 Q192R*, quanto a atividade plasmática total da enzima, modulada por fatores ambientais.

Vale ressaltar que a mensuração da atividade plasmática total da PON1 apresenta maior fidelidade de resultados do que a própria análise dos polimorfismos *PON1 L55M* ou *PON1 -108C/T*, uma vez que até mesmo dentre os indivíduos homocigotos ou heterocigotos para estes dois SNPs existe uma variabilidade de até 50 vezes na atividade plasmática. Isso ocorre devido à modulação da PON1 por fatores externos (COSTA et al., 2005b; NUS et al., 2007; ROEST et al., 2007; COSTA; GIORDANO; FURLONG, 2011).

Há consenso na literatura que a variação dos níveis plasmáticos da PON1 é explicada em até 90% pelos SNPs *PON1 -108C/T* e *PON1 L55M*. Todavia, os fatores ambientais e metabólicos influenciam de 20% a cerca de 60% dessa variabilidade e, em alguns casos, a expressão da PON1 pode aumentar em até 200% devido à influência de alguns alimentos (FERRÉ et al., 2003; RAINWATER et al., 2009; COSTA; GIORDANO; FURLONG, 2011).

O uso de algumas classes de medicamentos e o consumo de alimentos com alto poder antioxidante são os mais estudados fatores ambientais que influenciam a atividade plasmática da PON1. Costa, Giordano e Furlong (2011) relatam diversos medicamentos envolvidos nesta modulação, dentre os quais, os hipolipemiantes orais da classe das estatinas e fibratos, as sulfonilureias e a aspirina, quando utilizada como antiagregante plaquetária, recebem destaque, não somente pela sua ampla utilização na população, mas também pela importância na elevação da atividade desta enzima (5%-23%,

18%-59%, 28%-64% e 13%, respectivamente). As sulfonilureias, entretanto, aumentam somente os níveis hepáticos da PON1, exercendo pouca ou nenhuma influência nos níveis plasmáticos.

Dentre os fatores metabólicos que contribuem para a alteração dos níveis de PON1, Costa, Giordano e Furlong (2011) citam a presença de doenças, como o diabetes, Alzheimer, Parkinson, DCV, doença renal crônica e transplante hepático.

Os níveis de apolipoproteína AI e AII, HDL, triglicerídeos (RAINWATER et al. 2009), sobrepeso e o tabagismo (FERRÉ et al., 2003) já foram descritos como fatores que influenciam a expressão da PON1. De fato, nos dois estudos os autores afirmam que os níveis plasmáticos da PON1 são bastante influenciados pela idade, havendo pouca expressão em neonatos, ocorrendo uma progressão até os dois anos, fato que se justificaria pela imaturidade funcional do fígado ao nascimento. Em indivíduos idosos, os níveis tendem a decair, provavelmente pelo aumento do estresse oxidativo e da diminuição da função hepática (COLE et al., 2003; COSTA et al., 2005b).

Dentre todos estes fatores, Mouhamed et al. (2012) destacam o tabagismo como importante cofator capaz de influenciar a atividade da PON1. Segundo os autores, o consumo de tabaco não seria prejudicial somente por sua ação no estresse oxidativo, mas também por ser um importante fator na oxidação das partículas de LDL e por diminuir os níveis plasmáticos dos agentes antioxidantes, com destaque para a PON1. Os autores encontraram níveis de atividade mais baixos nos indivíduos tabagistas, além da capacidade de inibição da PON1, *in vitro*, pelo extrato do tabaco.

Existem, também, substâncias que são inibidoras da PON1, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. *In vitro*, a PON1 é inibida irreversivelmente pelo EDTA, devido ao sequestro dos íons cálcio, cofator indispensável para a atividade desta enzima. Além deste, íons de bário, cobre, zinco, mercúrio e lantânio inibem a atividade da PON1 no fígado, por mecanismo de quelação. Zinco, cádmio, ferro e mercúrio são potentes inibidores, *in vitro*, do alelo *PON1 192R*, inibindo até 80% desta isoforma. A não correlação desta inibição *in vivo*, provavelmente está relacionada com a ação carreadora das proteínas plasmáticas, ligando-se aos metais e protegendo a PON1 da inibição por estes íons (COLE et al., 2002 apud MASELLI, 2007; HOFMANN et al., 2009, 2010; RICHTER, JARVIK e FURLONG, 2008). Além destes, o álcool pode atuar inibindo ou estimulando a expressão da PON1, isso porque, em baixas doses, o etanol é capaz de modular os níveis de HDL, e mais, Osaki et al. (2004)

observaram que o álcool, mediante seu efeito na proteinaquinase C, pode fosforilar a Sp1 e regular sua ligação no receptor de Sp1 na região promotora da PON1. Em contrapartida, este efeito não foi observado em indivíduos e animais com ingestão de altas doses de álcool, efeito atribuído ao dano hepático associado ao uso desta substância.

Por ser facilmente inibida por agentes oxidantes, sejam eles exógenos ou endógenos, buscou-se uma forma de aumentar a expressão da PON1 utilizando alimentação rica em antioxidantes. Costa, Giordano e Furlong (2011) descreveram a influência de diversos destes alimentos, como as vitaminas C e E (aumentam de 7%-80% a atividade da PON1), a quercitina (30%-200%), chá verde (17%-40%) e açaí (75%). Entretanto, ainda não foi esclarecido se todos estes alimentos aumentam a expressão da PON1 ou se apenas aumentam sua atividade por diminuírem os níveis de agentes oxidantes presentes no plasma.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Em uma população da cidade de Cambé, PR:

- 1) Avaliar a relação entre o PON1 *status* e o tabagismo;
- 2) Avaliar a relação entre o PON1 *status* e o perfil lipídico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Mensurar o potencial antioxidante plasmático total (TRAP) dos indivíduos participantes do projeto;
- b) Avaliar os níveis de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) presentes no soro;
- c) Determinar, por análise funcional, o genótipo para o polimorfismo *PON1 Q192R*;
- d) Avaliar a atividade plasmática total da PON1;
- e) Determinar o PON1 *status* de cada participante;
- f) Relacionar o PON1 *status* com os níveis de TRAP, LOOH e com as variáveis bioquímicas analisadas (colesterol total, HDL colesterol, LDL colesterol, triglicerídeos e glicemia);
- g) Relacionar o PON1 *status* com os indicadores de risco cardiovascular Castelli 1 e Castelli 2.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo utilizou parte das amostras coletadas em um estudo de base populacional intitulado “Doenças cardiovasculares no estado do Paraná: mortalidade, perfil de risco, terapia medicamentosa e complicações” (VIGICARDIO), conduzido sob a coordenação da Prof^a Dr^a Regina Kazue Tanno de Souza do Departamento de Saúde Coletiva, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina. O Projeto de Pesquisa (VIGICARDIO) visa ampliar o conhecimento do perfil de risco, das complicações, das principais terapias e do acesso às ações de prevenção, tratamento e controle das doenças cardiovasculares no Estado do Paraná.

Os princípios éticos adotados estão contemplados na resolução 196/96, que regulamenta a pesquisa envolvendo seres humanos (BRASIL, 1996). O projeto principal (VIGICARDIO) foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UEL e a determinação do PON1 *status* foi submetida e aprovada pelo mesmo Comitê como adendo ao projeto principal (CAAE: 0192.0.268.000-10).

3.1 POPULAÇÃO E AMOSTRAGEM

Considerando a prevalência de fatores de risco e a predominância das DCV na população residente na região urbana do município de Cambé-PR, que compreende 96% dos habitantes do município, o tamanho da amostra foi calculado utilizando-se o aplicativo Epi Info 3.5.1, com uma proporção esperada de 50%, margem de erro de 3% e intervalo de confiança de 95% resultando em uma amostra de 1.066 pessoas com idade igual ou superior a 40 anos a serem entrevistadas. Prevendo possíveis perdas durante o desenvolvimento do projeto, acrescentou-se 25% sobre este número, totalizando 1332 sujeitos, com um total de 1336 indivíduos entrevistados, devido os arredondamentos nas coletas nos setores censitários. Destes, 967 compareceram para coleta de amostras de sangue. Durante a coleta de dados, variáveis antropométricas foram tomadas, como peso, altura e medição da circunferência abdominal. As informações sobre o consumo de álcool e tabaco foram autorreferidas, assim como o uso de medicamentos para o tratamento de hipertensão e diabetes, que em caso de resposta positiva, solicitou-se a apresentação dos medicamentos. Durante a entrevista, também foram realizadas três tomadas da pressão arterial em

momentos distintos. Outras informações também foram obtidas, porém estes dados não foram utilizados nesta pesquisa. Maiores informações e esclarecimentos sobre o instrumento de coleta de dados podem ser consultados em de Souza et al. (2013).

Todos os setores censitários da região urbana foram incluídos no estudo. O número de pessoas entrevistadas em cada setor foi calculado proporcionalmente à quantidade de homens e mulheres, de acordo com o Censo de 2007.

Os critérios de inclusão foram: possuir 40 anos ou mais na data da entrevista; residir na área urbana do município de Cambé - PR; ter sido sorteado (nos casos de domicílios com mais de um indivíduo elegível); aceitar participar da pesquisa assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Foram excluídos do estudo todos os indivíduos elegíveis que não estavam em plenas condições de raciocínio e/ou comunicação quando não acompanhado de cuidador apto a fornecer os dados necessários.

Para o desenvolvimento deste projeto, 487 amostras foram utilizadas, selecionadas de acordo com a disponibilidade de soro.

3.2 ANÁLISES LABORATORIAIS

A coleta de sangue foi previamente agendada com os participantes e foi realizada por punção venosa, por técnicos do Hospital Universitário de Londrina em tubos a vácuo, com gel separador e sem anticoagulante nas Unidades Básicas de Saúde da mesorregião correspondente das residências ou em locais alternativos como Centros Comunitários ou Igrejas, quando havia impossibilidade de utilizar as Unidades Básicas. Coletas domiciliares realizadas pelos mesmos técnicos foram realizadas nos casos de em que havia impossibilidade de locomoção ou incompatibilidade de horários. Após a coleta, as amostras foram mantidas sob refrigeração e transportadas ao Laboratório de Pós Graduação, no Hospital Universitário, sendo então centrifugadas por 10 minutos a 3.000 rpm para separar o soro, que foi aliquotado e mantido congelado a -80°C até o momento da análise.

3.2.1 Perfil Lipídico e Glicemia

As análises bioquímicas de perfil lipídico, composta pelos testes de colesterol total, HDL-colesterol e triglicerídeos e também os níveis de glicemia foram todos realizados no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário de Londrina, sob a supervisão da Prof^a Dr^a Alissana Ester Camargo. Os parâmetros mensuráveis foram avaliados por metodologia automatizada em equipamento Dimension[®] modelo RXL (Dade Behring, Deerfield, IL, EUA). A dosagem de LDL foi estimada pela equação de Friedewald. Para indivíduos que apresentaram níveis de triglicerídeos maiores que 400 mg/dL o valor de LDL não pode ser estimado. Foram calculados os índices de Castelli 1 e Castelli 2 para a avaliação do risco cardiovascular. O índice de Castelli 1 foi determinado pela razão entre os níveis de colesterol total e HDL-colesterol, sendo considerados valores aceitáveis, índices inferiores a 3,3. O índice de Castelli 2 foi calculado pela razão entre os níveis de LDL-colesterol e HDL-colesterol, sendo considerado normal quando inferior a 2,9 (CASTELLI; ABBOTT; McNAMARA, 1983).

3.2.2 Estresse Oxidativo

As provas de avaliação do estresse oxidativo foram realizadas no Laboratório de Pós Graduação do Centro de Ciências da Saúde da UEL. Todos os testes foram realizados em triplicata e os resultados que apresentam variação maior do que 10% foram reprocessados.

3.2.2.1 Potencial antioxidante plasmático total (TRAP)

Esta técnica baseia-se na mensuração de antioxidantes de origem lipossolúvel e hidrossolúvel presentes no plasma, por metodologia de quimioluminescência. Utilizou-se uma adaptação do método descrito por Repetto et al. (1996), conduzida em leitor de microplaca Victor X3 (Perkin Elmer, Bridgeville, PA, EUA). A metodologia consiste em uma leitura contínua de 25 minutos, com intervalo de um minuto entre as leituras, em um modo de contagem não coincidente, com uma faixa de resposta entre 300 a 620 nm, a 30°C. O sistema foi, previamente, calibrado com um análogo de vitamina E (Trolox). Os

resultados, expressos em equivalentes de Trolox, são referentes à comparação entre o tempo de indução pelo reativo 2-2'azobis (ABAP) após a adição de concentrações conhecidas de Trolox e plasma.

3.2.2.2 Hidroperóxidos lipídicos (LOOH)

A mensuração dos níveis de hidroperóxidos lipídicos foi realizada baseada na capacidade destas substâncias em oxidarem íons ferrosos para íons férricos, em condições ácidas, que por sua vez, reagem com o corante indicador (xilenol *Orange* – reativo de FOX), formando um complexo colorido, que absorve luz a 560nm, comprimento de onda no qual é realizada a análise, de acordo com a metodologia descrita por Jiang, Hunt e Wolff (1992). O sistema é previamente calibrado com uma solução padrão de lipídeos oxidados (1,1,3,3-tetraoxipropano) e os resultados são expressos em mM.

3.2.3 Determinação do PON1 *status*

A determinação do PON1 *status* consiste na avaliação funcional do polimorfismo *PON1 Q192R*, além da mensuração da atividade plasmática total da enzima. A análise é realizada em um ensaio enzimático triplo, como descrito por Richter, Jarvik e Furlong (2008), utilizando o PA e o CMPA como substratos para as reações. As análises foram feitas no leitor de microplacas EnSpire (Perkin Elmer, Bridgeville, PA, EUA).

A avaliação funcional do polimorfismo *PON1 Q192R* é baseada na diferença catalítica que esta enzima apresenta frente aos substratos (PA e CMPA), conferida pelos alelos *PON1 192Q* ou *PON1 192R*. De maneira breve:

Mensuração da taxa de hidrólise do CMPA. A leitura foi realizada em 280nm por 4 minutos a 25°C, utilizando 20 µL de soro diluído 1:40 em tampão de diluição composto de 20,0 mmol/L de Tris-HCl (pH 8,0), 1,0 mmol/L de CaCl₂. O alelo *PON1 192R* apresenta alta afinidade para degradação do CMPA.

Mensuração da taxa de hidrólise do PA em condições de alta salinidade. A leitura foi realizada em 270nm por 4 minutos a 25°C, utilizando 20 µL de soro diluído 1:40 em tampão de diluição. O meio salino foi preparado adicionando 2,0 mol/L de NaCl ao tampão. O alelo *PON1 192R* é inibido nestas condições de salinidade, portanto, a leitura

consiste na atividade do alelo *PON1 192Q*, não inibida pela adição do sal.

Mensuração da taxa de hidrólise do PA sem a adição de sal. A leitura foi realizada em 270nm por 4 minutos a 25°C, utilizando 20 µL de soro diluído 1:80 em tampão de diluição. O sítio catalítico para a hidrólise do PA não está localizado na região do polimorfismo *PON1 Q192R*, portanto, em condições de baixa salinidade, este SNP não influencia a hidrólise do PA, indicando a atividade total da enzima circulante.

Os resultados obtidos nos dois primeiros ensaios foram plotados em um gráfico bidimensional (hidrólise do PA em elevada salinidade *versus* hidrólise do CMPA), obtendo-se a separação dos indivíduos nos três genótipos: *PON1 192QQ*, *PON1 192QR* e *PON1 192RR*.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente, foi conduzida uma análise exploratória para avaliar se as variáveis apresentavam distribuição normal (teste de Kolmogorov-Smirnov) e se havia homogeneidade de variância entre os grupos (teste de Levene). Os níveis de HDL-colesterol, LDL-colesterol, colesterol total, triglicerídeos e os índices de Castelli 1 e 2 apresentaram distribuição normal após sofrerem transformação logaritmo natural. A glicemia e LOOH não apresentaram distribuição normal mesmo após transformação e, portanto, foram analisados utilizando-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Para se avaliar a distribuição das variáveis entre os três genótipos funcionais do polimorfismo *PON1 Q192R*, as variáveis contínuas (idade, peso corporal, circunferência abdominal, atividade plasmática total da PON1, TRAP, LOOH, perfil lipídico, Castelli 1 e 2) foram analisadas utilizando-se ANOVA e o sexo (variável categórica), utilizando-se o teste de Chi-quadrado.

Análises de covariância (ANCOVA) foram empregadas para se investigar diferenças em variáveis contínuas (perfil lipídico, índices Castelli, TRAP) quando controladas algumas covariáveis. Nesse delineamento, os fatores fixos foram polimorfismo funcional *PON 1 Q192R* e o sexo enquanto as covariáveis foram atividade plasmática da PON1, idade e circunferência abdominal. Quando os fatores fixos se mostraram estatisticamente significantes na ANCOVA, o teste de Tukey foi utilizado para comparação entre os grupos. Quando as covariáveis se mostraram significantes na ANCOVA, análise de regressão foi

realizada para se obter informação sobre a direção da relação entre as variáveis contínuas.

Todos os testes estatísticos foram conduzidos no programa SPSS (IBM, versão 17) e o nível de significância adotado para o estabelecimento das conclusões foi $\alpha=0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO NO FORMATO DE ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo a ser submetido à Clinical Biochemistry

Interactions between paraoxonase 1 Q192R polymorphism and smoking are associated with a high Castelli 1 and 2 index, LDL cholesterol and triglycerides levels and low HDL cholesterol levels.

André de Souza-Nogueira¹, Alissana Ester Camargo², Mônica Maria Bastos Paoliello², Rebecca J. Richter³, Clement E. Furlong³, Michael Maes^{4,5}, Décio Sabbatini Barbosa^{1,2}, Estefânia Gastaldello Moreira^{6,1,*}.

Abstract

Objectives: To evaluate the influence of paraoxonase 1 (*PON1*) *status* (functional *PON1* *Q192R* polymorphism and plasmatic activity) in lipid profile and its association with smoking.

Design & Methods: Anthropometric data were collected. We analyzed glucose and lipid profile, oxidative stress markers and *PON1 status* through three kinetic assays using phenylacetate and 4-(chloromethyl)phenyl acetate as substrates in 487 subjects older than 40 years. Moreover, Castelli 1 and 2 indexes were calculated by the ratios total cholesterol/HDL and LDL/HDL, respectively.

Results: Regression analyses on abdominal circumference, age and the interaction *PON1* *Q192R* polymorphism*smoking showed an association between smoking and decreased HDL cholesterol levels and increased triglycerides levels, Castelli 1 and 2 indexes, particularly in *PON1* *192R* phenotype carriers. Compared to *PON1* *192QQ*, *PON1* *192RR* genotype was

¹ Graduation Program in Health Sciences, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

² Department of Pathology, Clinical and Toxicological Analysis, State University of Londrina, Paraná, Brazil

³ Department of Genome Sciences and Medicine, Division of Medical Genetics, University of Washington, Seattle, Washington, USA.

⁴ Impact Strategic Research Centre, School of Medicine, Deakin University, Geelong, Victoria, Australia.

⁵ Department of Psychiatry, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.

⁶ Department of Physiological Sciences, State University of Londrina, Paraná, Brazil

* **Corresponding author at:** Departamento de Ciências Fisiológicas, CCB, UEL, Lab.06, CEP 86051-980 Londrina/PR, Brasil. Tel. +55 43 3371 4307, Fax +55 43 3371 4467.

E-mail address: egmoreira@uel.br

associated with decreased PON1 activity ($p=0.04$). Oxidative stress markers were not influenced by PON1 *status*.

Conclusions: *PON1 Q192R* polymorphism was not significantly related to lipid profile but a significant interaction between this polymorphism and smoking was observed. The effects of smoking on HDL cholesterol, triglycerides and Castelli indexes were more deleterious in *PON1 192R* individuals than in *PON1 192QQ* or *PON1 192QR* subjects.

Keywords: lipid profile; oxidative stress; paraoxonase 1; smoking.

1 Introduction

Human serum paraoxonase 1 enzyme (PON1; EC 3.1.8.1) is a glycoprotein synthesized in the liver and mostly bound to high density lipoproteins (HDL) particles. PON1 protects low density lipoproteins (LDL) [1] and HDL [2] from oxidation possibly by hydrolyzing phospholipid or cholesteryl ester hydroperoxides [3]. Evidence for the role of PON1 in the anti-oxidative properties of HDL is provided by the fact that PON1 knockout mice are more susceptible to atherosclerosis when fed on a fat-rich diet [4].

PON1 has a polymorphic distribution in humans and many single nucleotides polymorphisms (SNP) have been described both in the promoter and coding regions of *PON1*. The most studied polymorphism in the coding region (rs 662) results in an exchange of a glutamine (Q) by an arginine (R) at position 192 of the amino acid sequence. It is important to note that *PON1 Q192R* polymorphism influences the catalytic activity of PON1 but the direction of this change, i.e., increase or decrease, is substrate-dependent. Even though the *PON1 192R* isoform is more efficient at hydrolyzing paraoxon than the *PON1 192Q* one [5], it has been reported to be less efficient in hydrolyzing lipid peroxides than the *PON1 192Q* allozyme as well as hydrolyzing the nerve agents soman and sarin with *in vitro* assays [6].

Different PON1 genotypes have been investigated as markers of susceptibility to several diseases, including cardiovascular disease [7]. Since *PON1 Q192R* polymorphism influences PON1 hydrolytic activity, it is believed that it could influence the ability of this enzyme to protect LDL particle against oxidation. There is, however, a great controversy in the literature since both *PON1 192Q* allele [8,9] and *PON1 192R* allele [10-12]

have been associated with increased risk for cardiovascular disease. Moreover, studies describing lack of association between *PON1 Q192R* genotype and cardiovascular disease risk have also been published [13-15]. One factor that may play a role in this controversy is the approach used to evaluate PON1. Most of the studies have investigated only PON1 genotype and did not include the measurement of plasma PON1 activity. It has been described that total PON1 plasmatic activity *per se* has a negative relationship with increased risk for cardiovascular disease [8,16-18]. In this way, the determination of PON1 *status*, i.e. *PON1 Q192R* polymorphism and PON1 activity [19] has been reported to be a more reliable marker than genotype or plasmatic total activity measurement alone [7,20].

PON1 *status* may be measured by a triple enzymatic assay. To stratify individuals in the three functional genotypes for the *PON1 Q192R* polymorphism (*PON1 192QQ*, *PON1 192QR*, *PON1 192RR*) two substrates are used. Originally, these substrates were diazoxon and paraoxon [21] but they may be substituted by phenylacetate (PA) and 4-(chloromethyl)phenyl acetate (CMPA), respectively [22]. *PON1 192Q* allozyme presents low efficiency to metabolize paraoxon (or CMPA) whereas both alloforms hydrolyze diazoxon (or PA) with approximately the same efficiency. The reaction with diazoxon or PA is conducted under high salt condition in order to separate the *PON1 192QR* data points from the *PON1 192R* data points with the plot of diazoxon (or PA) *versus* paraoxon (or CMPA) hydrolysis rates, since high salt condition inhibits hydrolysis of diazoxon (or PA) by the R192 allozyme [21]. A third enzymatic assay conducted with PA in low salt condition reveals plasma PON1 activity levels for all 3 *PON1 Q192R* genotypes because, as mentioned previously, both alloforms hydrolyze PA with approximately the same efficiency under conditions of low salt [23].

Dyslipidemia is recognized as one of the major risk factors for cardiovascular disorders and low total cholesterol and LDL levels are known to have a protective effect for these disorders. Moreover, high HDL protects against atherosclerosis by increasing reverse transport, i.e., by transporting cholesterol to the liver to be cleared. Risk assessment of cardiovascular diseases includes LDL cholesterol and total cholesterol as well as HDL cholesterol. Moreover, Castelli 1 and 2 indexes, which represent the relation between total cholesterol per HDL cholesterol and LDL cholesterol *per* HDL cholesterol, respectively, have also been successfully employed to predict risk for cardiovascular diseases [24]. Also, smoking is an important factor in cardiovascular risk analyses, influencing LDL

oxidation and decreasing plasmatic antioxidants agents levels, including the PON1 activity [25].

This study aimed to evaluate the influence of PON1 *status* in lipid profile, a well established risk factor for cardiovascular outcomes. Moreover, considering that PON1 has antioxidant properties [26], the influence of PON1 *status* on plasma markers of oxidative stress was also evaluated.

2 Methods

2.1 Subjects

A subset of 487 individuals was selected, based on serum availability, from a main project (cross section, population basis, 1336 respondents, 967 sampled) on cardiovascular health that is being conducted by the Public Health Department, State University of Londrina, Brazil. All subjects were older than 40 years and lived in Cambé, Paraná State, Brazil.

The study was approved by the local Ethics Committee on Human Research (CAAE: 0192.0.268.000-10). All subjects gave written informed consent to participate in the study.

2.2 Demographic and anthropometric data

All subjects were interviewed before blood sampling, in order to get socio-demographic data (sex, age, self-declared smoking and use of medication) and anthropometrics variables (weigh, height and abdominal circumference). Blood pressure was verified. For more information about data collection, please refer to de Souza *et al.* [27].

2.3 Laboratory measurements

Blood samples were collected by venipuncture into tubes without anticoagulant fasted for twelve hours. The samples were collected in Health Centers or at home, if any mobility inability, after venipuncture, the samples were refrigerated (4°C) and

transported to Laboratory, been centrifuged and the serum was aliquoted and stored at -80°C until processing. Different aliquots were used for the analysis in order to avoid repeated unthawing.

Glucose and lipid profile were assessed by enzymatic colorimetric methods in an automated clinical chemistry system (Dimension RXL, Siemens Healthcare Diagnostics Inc, USA), except for LDL cholesterol that was determined by Friedewald calculation [27]. LDL was not estimated in individuals with tryglicerides values higher than 400 mg/dL (9 individuals). The interassay coefficients of variation for the lipid measures were lower than 10%.

Castelli 1 index was determined by the ratio between total cholesterol and HDL cholesterol whereas Castelli 2 by the ratio between LDL cholesterol and HDL cholesterol [29].

Two markers of oxidative stress were evaluated: the total peroxy radical trapping antioxidant parameter (TRAP) and lipid hydroperoxides (LOOH). TRAP was determined by chemiluminescence according to Repetto *et al.* [30], adapted to serum analysis in a microplate reader (Victor, Perkin Elmer, USA). LOOH were assayed spectrophotometrically (560nm) using ferrous oxidation in xylenol orange as described by Jiang *et al.* [31].

PON1 *status* (functional *PON1 Q192R* genotype and plasmatic activity) were determined through three kinetic assays as described in Richter *et al.* [22]. The substrates used were PA (Sigma, USA) and CMPA (Sigma, USA) and the analysis was conducted in a spectrophotometer reader (EnSpire, Perkin Elmer, USA) using ultraviolet transparent 96-well microplates. All assays were carried out in triplicate and replicates that varied by 10% were repeated.

Functional determination of *PON1 Q192R* polymorphism is based on the difference in catalytic activity against the substrates (PA and CMPA) presented by the *PON1 192Q* or *PON1 192R* allele. Briefly, CMPA hydrolysis was measured at 280nm for 4 minutes at 25°C using 20 µL of plasma diluted 1:40 in dilution buffer [20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 1.0 mmol/L CaCl₂]. PA hydrolysis under high salt conditions were measured at 270nm for 4 minutes at 25°C using 20 µL of plasma diluted 1:40 in dilution buffer. High salt media was composed by PA added to 2 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 1.0 mmol/L CaCl₂. The results obtained with these two assays were used to plot a 2-dimensional enzyme activity

graphic that displays rates of PA hydrolysis under high salt conditions versus CMPA hydrolysis.

A third assay that measures rates of PA hydrolysis at low salt concentration reveals plasma PON1 activity since under these assay conditions, the *PON1 Q192R* polymorphism does not influence PON1 catalytic activity against PA [23]. For this assay, rates of hydrolysis of PA were measured at 270nm for 4 minutes at 25°C using 20 µL of plasma diluted 1:80 in dilution buffer.

2.4 Statistics

An exploratory analysis was conducted to evaluate normal distribution (Kolmogorov-Smirnov) and homogeneity of variance (Levene test) of each variable. In order to normalize data distribution, HDL, LDL and total cholesterol, as well as tryglicerides, Castelli 1 and Castelli 2 indexes data were subjected to natural log transformation. Even after transformation, LOOH and glucose data did not present normal distribution and were analyzed through the Kruskal-Wallis test.

In order to ascertain the distribution of variables among *PON1 Q192R* functional genotypes, continuous variables (age, body weight, abdominal circumference, PON1 activity, TRAP, LOOH, lipid profile, Castelli 1 and 2) were evaluated through ANOVA and the discrete variable (sex) through the Chi-square test.

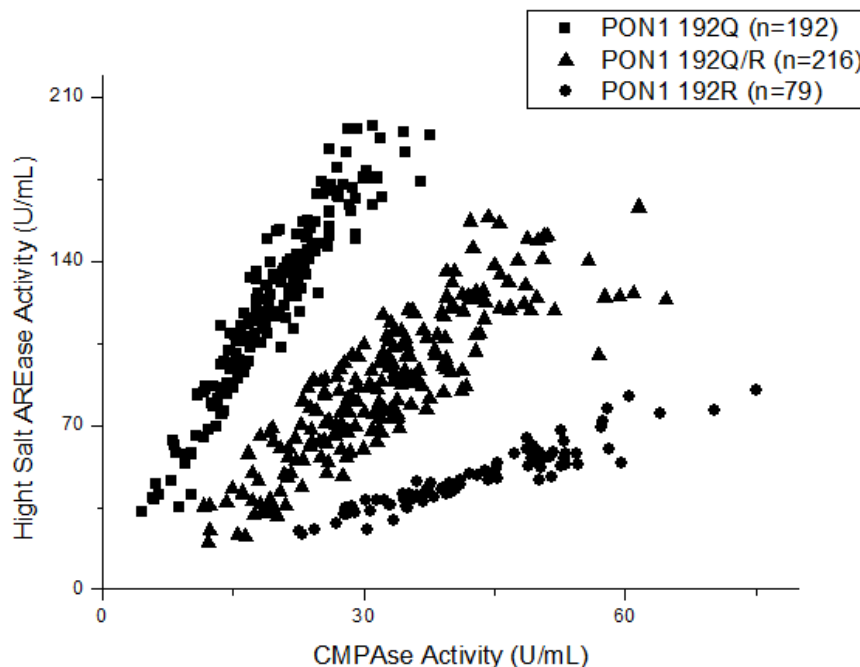
Factorial design univariate analysis (ANCOVA) were employed to delineate the differences in continuous variables (lipid profile, Castelli indexes, TRAP) while controlling for covariates. In this design, fixed factors were *PON1 Q192R* polymorphism and sex whereas covariates were PON1 activity, abdominal circumference and age. If the fixed factors were significant, the Tukey test was employed to check planned comparisons among multiple treatment means. If the covariates were significant, regression analysis were performed in order to get the direction of the relation. The SPSS package (IBM, Version 17) was employed to analyze all data. Statistical significance was set at $\alpha=0.05$, two tailed.

3 Results

3.1 Demographic data

The 487 participants were divided into three different groups according to their *PON1* Q192R polymorphism: 192 individuals (39.4%) were homozygous for *PON1* 192Q allele; 216 (44.4%) were heterozygous (*PON1* 192Q/R) and 79 (16.2%) were homozygous for *PON1* 192R allele, and this distribution is in Hardy-Weinberg equilibrium. Figure 1 shows the classification of the subjects from this study and its distribution according functional genotyping.

Figure 1 - Distribution of *PON1* Q192R polymorphism according to functional genotyping, with plot of hydrolysis of 4-(chloromethyl)phenyl acetate versus phenylacetate



Each data point indicates one individual. ■ represents *PON1* 192QQ individuals (39.4%); ● represents *PON1* 192QR individuals (44.4%); ▲ represents *PON1* 192RR individuals (16.2%).

As shown in Table 1, there was no significant difference between the *PON1* Q192R polymorphisms related to sex ratio, age, body weight, abdominal circumference, TRAP, LOOH, LDL cholesterol, total cholesterol, triglycerides, glycemia and self-declared arterial hypertension, smoking and use of antihypertensives and hypoglycemics ($P > 0.05$). On the other hand, compared to *PON1* 192QQ individuals, the *PON1* 192RR phenotype was associated with decreased *PON1* activity whereas the *PON1* 192QR phenotype was associated with decreased HDL cholesterol and, consequently, increased Castelli 1 and 2 indexes ($p < 0.05$, ANOVA complemented with Tukey).

Table 1 - Demographic, anthropometric and laboratorial characteristics according to individuals by *PON1* Q192R polymorphism.

Variable	<i>PON1</i> Q192R polymorphism			P value
	QQ	QR	RR	
Number of individuals	192	216	79	--
Sex (female/male) ^a				0.43
Female	116 (60.4%)	118 (54.6%)	48 (60.7%)	--
Male	76 (39.6%)	98 (45.4%)	31 (39.3%)	--
Age (years) ^b	54.9±10.4	55.1±10.2	54.1±9.9	0.77
Body weight (Kg) ^b	71.0±14.3	73.3±15.1	72.1±13.3	0.31
Abdominal circumference (cm) ^b	93.8±11.9	94.9±13.6	96.0±11.2	0.38
Arterial hypertension (yes/no) ^{a, d}				0.98
Yes	80 (41.7%)	91 (42.1%)	34 (43.0%)	--
No	112 (58.3%)	125 (57.8%)	45 (57.0%)	--
Antihypertensives (yes/no) ^{a, d}				0.67
Yes	62 (32.3%)	73 (33.8%)	30 (38.0%)	--
No	130 (67.7%)	144 (66.2%)	49 (62.0%)	--
Hypoglycemics (yes/no) ^{a, d}				0.82
Yes	15 (7.8%)	19 (8.8%)	9 (10.1%)	--
No	177 (92.2%)	197 (91.2%)	71 (89.9%)	--
Smoking (yes/no) ^{a, d}				0.44
Yes	29 (15.1%)	36 (16.7%)	17 (21.5%)	--
No	163 (84.9%)	180 (83.3%)	62 (78.5%)	--
<i>PON1</i> activity (U/mL) ^b	187.6±62.1	180.1±61.4	167.5±45.2*	0.04
TRAP (trolox equivalents) ^b	963.8±173.1	983.2±169.4	964.1±164.9	0.46
LOOH (mM) ^c	0.77±0.29	0.78±0.34	0.79±0.33	0.85
LDL cholesterol (mg/dL) ^b	128.1±33.2	130.7±33.5	132.7±29.9	0.54
HDL cholesterol (mg/dL) ^b	49.8±13.3	46.2±12.8*	48.6±13.2	0.01
Total cholesterol (mg/dL) ^b	205.3±39.9	207.2±41.0	210.2±37.2	0.60
Castelli 1 index ^b	4.36±1.28	4.76±1.44*	4.62±1.51	0.01
Castelli 2 index ^b	2.72±0.99	2.96±0.97*	2.86±0.98	0.04
Tryglicerides (mg/dL) ^b	141.8±95.1	162.8±178.9	172.9±224.2	0.40
Glucose (mg/dL) ^c	102.4±22.9	105.5±33.8	104.1±22.1	0.53

Data are means ± SD. ^aChi-square test; ^bANOVA complemented with Tukey; ^cKruskal-Wallis; *p<0.05 compared to QQ; ^dself-declared.

3.2 *PON1* status and lipid profile

The results of ANCOVAs on lipid profile are presented in Table 2. The evaluation of the impact of each explanatory variable (abdominal circumference, age, *PON1* activity, *PON1 Q192R* polymorphisms, smoking and interaction *PON1 Q192R* polymorphisms*smoking) on lipid profile showed that abdominal circumference was significantly related to all the variables measured/calculated, except for LDL cholesterol that was marginally altered ($p=0.052$). As expected, regression analysis indicated that abdominal circumference was shown to be negatively related to HDL cholesterol but positively related to LDL cholesterol, total cholesterol, triglycerides and Castelli 1 and 2 indexes.

The regression analyses on abdominal circumference, age and the interaction *PON1 Q192R* polymorphism*smoking showed that they explained 14.2% of the variance in HDL cholesterol ($F=9.78$, $df=8/475$, $p<0.001$). Age was positively related to HDL cholesterol levels. Smokers presented significantly decreased levels of serum HDL cholesterol (46.26 ± 1.44 mg/dL) when compared to non-smokers (48.83 ± 0.69 mg/dL). The significant interaction shows that smoking is associated to decreased HDL cholesterol in particular in persons with the *PON1 192RR* phenotype (non smokers: 50.82 ± 1.57 mg/dL; smokers: 42.97 ± 2.99 mg/dL) while no or smaller effects are detected in those with a *PON1 192QQ* (non smokers: 50.01 ± 0.97 mg/dL; smokers: 46.74 ± 2.31 mg/dL) or *PON1 192QR* (non-smokers: 45.66 ± 0.92 mg/dL; smokers: 49.06 ± 2.08 mg/dL in smokers) phenotype.

Even though *PON1* activity and smoking were related to LDL cholesterol levels, only 3.3% of the variance in this particle is explained by these variables combined ($F=1.97$, $df=8/457$, $p=0.049$). *PON1* activity was inversely associated with LDL cholesterol, while smoking was associated with increased LDL cholesterol (non-smokers: 128.67 ± 1.84 mg/dL; smokers: 137.71 ± 3.96 mg/dL).

Regarding triglyceride levels, 16.2% in the variance of this variable ($F=11.47$, $df=8/475$, $p<0.001$) was explained by the regression on abdominal circumference and *PON1 Q192R* polymorphism*smoking interaction. The significant interaction pattern shows that smoking was associated with increased levels of triglycerides in *PON1 192RR* individuals (non-smokers: 137.25 ± 19.79 mg/dL; smokers: 282.05 ± 37.70 mg/dL) while no or smaller effects were detected in *PON1 192QQ* (non-smokers: 140.20 ± 12.20 mg/dL; smokers: 168.45 ± 29.11 mg/dL) or *PON1 192QR* (non-smokers: 168.66 ± 11.63 mg/dL; smokers:

129.68±26.25 mg/dL).

3.3 *PON1 status and Castelli 1 and Castelli 2 indexes*

Table 2 shows the results of univariate ANCOVAs with the Castelli 1 or 2 indexes as dependent variable and abdominal circumference, age, PON1 activity, *PON1 Q192R* polymorphisms, smoking and interactions *PON1 Q192R* polymorphisms*smoking as explanatory variables. Both indexes were significantly influenced by abdominal circumference, age, smoking and the interaction *PON1 Q192R* polymorphisms*smoking. The regression on these variables explained 18.1% of the variance in Castelli 1 index ($F=13.09$, $df=8/475$, $p<0.001$) and 11.6% in the Castelli 2 index ($F=8.11$, $df=8/457$, $p<0.001$). Age was negatively associated, while abdominal circumference and smoking were positively associated with both indexes. The interaction term shows that smoking is related to increased Castelli 1 index in particular in *PON1 192RR* individuals (non-smokers: 4.29; smokers: 5.56) and had less effects in those with a *PON1 192QQ* (non-smokers: 4.30, smokers: 4.93) or a *PON1 192QR* phenotype (non smokers: 4.79; smokers: 4.57). Similar results were observed for Castelli 2 index which were in non-smokers 2.67 ± 0.12 (*PON1 192RR*), 2.68 ± 0.08 (*PON1 192QQ*) and 2.98 ± 0.07 (*PON1 192QR*), whereas in smokers, 3.48 ± 0.24 (*PON1 192RR*), 3.12 ± 0.18 (*PON1 192QQ*) and 2.85 ± 0.16 (*PON1 192QR*).

The effects of other variables were also investigated but only use of antihypertensive drugs was significantly associated with Castelli 1 index ($F=5.26$, $df=1/469$, $p=0.02$). The use of these drugs was associated with increased Castelli 1 index (non-users: 4.60 ± 0.10 ; users: 5.05 ± 0.16). The following variables did not significantly contribute to the variance in the Castelli 1 index: glucose ($F=1.94$, $df=1/474$, $p=0.16$), body weight ($F=3.24$, $df=1/457$, $p=0.07$), diabetes ($F=0.00$, $df=1/469$, $p=0.95$), use of hypoglycemic ($F=0.02$, $df=1/471$, $p=0.90$), self-declared arterial hypertension ($F=0.58$, $df=1/469$, $p=0.45$), TRAP ($F=0.92$, $df=1/474$, $p=0.34$) and LOOH ($F=0.91$, $df=1/460$, $p=0.34$).

3.4 *PON1 status and oxidative stress parameters*

TRAP was significantly influenced only by abdominal circumference (Table 2) and these variables were positively related ($F=5.53$, $df=1/483$, $p=0.02$). Due to the lack of normal distribution of the LOOH data even after transformation procedures, this variable could not be analyzed through ANCOVA.

Table 2 - Results of ANCOVAs, with HDL, LDL, total cholesterol, tryglicerides, Castelli 1 and 2 indexes and TRAP as dependent variables and abdominal circumference, age, PON1 activity, *PON1 Q192R* polymorphisms, smoking and interactions smoking by *PON1 Q192R* polymorphisms as explanatory variables.

Explanatory variables	HDL	LDL	Total cholesterol	Tryglicerides	Castelli 1	Castelli 2	TRAP
Abdominal circumference (cm) ^a							
F	55.17	3.81	6.49	74.32	72.68	39.86	6.48
p value	<0.001	0.052	0.01	<0.001	<0.001	<0.001	0.01
Age (years) ^a							
F	9.49	0.16	0.06	0.55	8.48	9.11	3.63
p value	0.002	0.69	0.80	0.46	0.004	0.003	0.06
PON1 activity (U/mL) ^a							
F	0.29	4.07	1.66	0.14	0.16	1.17	0.12
p value	0.59	0.04	0.20	0.70	0.69	0.28	0.73
PON1 Q192R polymorphism ^b							
F	0.66	1.05	1.37	1.12	0.68	0.67	0.32
p value	0.52	0.35	0.26	0.33	0.51	0.51	0.72
Smoking (yes/no) ^a							
F	4.26	4.27	2.57	2.23	9.11	6.44	2.67
p value	0.04	0.04	0.11	0.14	0.003	0.01	0.10
Polymorphism*smoking ^b							
F	3.09	2.48	2.98	6.12	7.60	5.81	0.12
p value	0.04	0.09	0.05	0.002	0.001	0.003	0.89

^a 1 degree of freedom; ^b 2 degrees of freedom. *PON1 Q192R* polymorphism, smoking and polymorphism*smoking were entered as factors whereas the other variables were entered as co-variates.

Discussion

The present study investigated a possible relationship between *PON1 Q192R* polymorphism and/or PON1 activity on some laboratory markers in a population from the South Brazil. The results revealed interactions between *PON1 Q192R* polymorphism and smoking: smoking is related to increased Castelli indexes, LDL cholesterol and triglycerides and decreased HDL cholesterol especially in *PON1 192R* individuals.

PON1 polymorphisms distribution has been studied for decades and great attention has been devoted to the *PON1 Q192R* variants. Population-based studies and meta-analysis have shown *PON1 192R* allele to be more common in African population, whereas *PON1 192Q* isoform to be more frequent in Caucasians [6]. Maciel *et al.* [32] developed an ancestry study in individuals from a city located in the same state (Paraná) from where our subjects were sampled and reported that self-declared white population carried up to 17% of Afro-ancestry whereas the self-declared black population carried about 50% of European ancestry. These results demonstrate the high interbreeding of our population and the high influence of European colonization. Supporting the high influence of European colonization in the south of Brazil, the present study as well a study published in 2002 [33] describe a higher frequency of *PON1 192QQ* and *PON1 192QR* than *PON1 192RR*.

Taking into account the factors and covariates evaluated in the present study, PON1 activity was inversely associated with LDL cholesterol. PON1 has been described to present antioxidant and anti-inflammatory activities, which are supposed to be mediated by the reducing capacity of sulfhydryl groups present in this enzyme [34]. Different mechanisms have been proposed to explain how increased plasmatic antioxidant activity could reduce LDL cholesterol and they include: increased activity of cholesterol-7 α -hydroxylase and, consequently, increased elimination of cholesterol by the formation of bile acids; decreased expression of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase, the key enzyme for cholesterol biosynthesis; and increased expression for LDL receptors [35-39]. Regarding HDL cholesterol, a positive relationship with activity was expected since the majority of PON1 proteins are bound to HDL particles. It is difficult to compare results from different studies that evaluated activity due to the different substrates used for this determination. Roest *et al.* [40] have evaluated activity using PA and they also described a weak association between PON1 activity and HDL cholesterol. These authors offered two possible

explanations for this lack of/weak association: 1) PON1 may be associated only with specific subspecies of HDL; 2) the low saturation rate of HDL with PON1 (there is a sevenfold excess of HDL particles to bind only one PON1 molecule) which would explain the limited impact of fluctuations in HDL on PON1 concentration in blood.

In the present study, *PON1 Q192R* polymorphism was not significantly related to lipid profile but a significant interaction between this polymorphism and smoking was observed. The association of smoking with HDL cholesterol, triglycerides and Castelli indexes were more deleterious in *PON1 192R* individuals. Even though there are conflicting results in the literature, which may be explained by differences in study design, worse lipid profile has been described in *PON1 192R* individuals [11,41,42] and *PON1 192R* smokers [25]. The *PON1 192R* allozyme is suggested to present lower hydrolytic activity towards lipid peroxides than *PON1 192Q* isoform [6] and smoking is known to induce oxidative stress and to decrease PON1 activity [39,43,44]. Increased oxidative stress (induced by smoking) associated to decreased hydrolysis of lipid peroxides (induced by decreased catalytic activity of *PON1 192R* allozyme and smoke-induced decrease in PON1 activity) are expected to result in decreased levels of HDL cholesterol and, consequently, increased Castelli 1 and 2 indexes, due to a decreased protection of this particle against oxidative damage. Moreover, a decrease in the synthesis of HDL cholesterol may also occur. The enzyme lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) can be inactivated by lipid hydroperoxides [45], which may be increased in *PON1_{192R/R}* smokers.

Our results reinforce the concept that PON1 *status* determination is a better approach to investigate PON1 influence on lipid profile once activity was negatively related to LDL cholesterol whereas HDL cholesterol was related to an interaction between *PON1 Q192R* polymorphism and smoking. Having both data sets in multivariate models is certainly a step forward for meaningful interpretation of the results. Moreover, our data also reinforce the great impact that abdominal circumference has on lipid profile and, as such, it should always be taken into account when evaluating the influence of possible risk factors on lipid parameters or cardiovascular diseases.

Regarding the oxidative stress markers evaluated (TRAP and LOOH), no significant influence of PON1 status was observed. Even though the antioxidant activity of PON1 has been described [34] and a positive relationship was expected, it is important to take into account that PON1 is only one out of a myriad of physiological antioxidants that

synergistically modulate oxidative stress. Moreover, even though the markers chosen have been used by different laboratories, they may not have been sufficiently sensitive to detect alterations in oxidative balance in this population. Actually, not even smoking influenced TRAP levels. This variable was only influenced by abdominal circumference and it was a positive relation, i.e., the greater the abdominal circumference, the higher the TRAP levels. Considering the high availability of lipids to be oxidized in individuals with great abdominal circumference, one might expect decreased TRAP levels as observed in previous studies [46,47]. However, it is noteworthy that about 60% of the TRAP value is influenced by uric acid, a marker that is positively related with abdominal circumference [48]. In this way, even though uric acid has not been determined in the present study, the positive relation between TRAP values and abdominal circumference is not surprising.

Study limitations and strengths

Considering the factors that have been described to influence PON1 activity (for a review, please refer to Costa *et al.* [49]) limitations of our study include lack of information on nutrition (which may be influenced by a myriad of factors, such as addictive behaviors, social and marital status) and nutritional supplements consumed, alcohol consumption and some specific drugs, such as hormonal contraceptives. Strengths of our study are that we adjusted our results for many potential confounders, including age, sex, abdominal circumference, smoking habit, use of antihypertensive and antidiabetic drugs. Most importantly, we included a determination of PON1 *status* which includes a functional measure of PON1 activity for each subject within each *PON1 Q192RR* phenotypic group (*PON1 192QQ*, *PON1 192QR* and *PON1 192RR*). The data in Figure 1 show a large variability of PON1 activity in each functional genotype: 46.9 to 377.3 for *PON1 192QQ* individuals, 45.3 to 348.6 for *PON1 192QR* individuals and 81.29 to 269.8 for *PON1 192RR* individuals (the range represents the variability of arylesterase activity in U/mL). These values represent important differences in the individual's rates of detoxication of endogenous toxic metabolites as well as xenobiotics including metabolites of the insecticides diazinon and chlorpyrifos oxon. These data also point out the lack of information generated from genotyping alone, which provides no information on PON1 activity level for each individual in a study.

Conclusion

PON1 Q192R polymorphism was not significantly related to lipid profile but a significant interaction between this polymorphism and smoking was observed. The association between smoking and HDL cholesterol and triglycerides levels as well as Castelli indexes were more deleterious in *PON1 192RR* individuals.

Acknowledgment of grant support: This work was supported by SETI/Fundação Araucária (PPSUS 200/210). A. Souza-Nogueira received a Master fellowship from Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Estefânia G. Moreira is the recipient of a senior research fellowship from SETI/Fundação Araucária.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett* 1991; 286:152–154.
2. 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; 101:1581–1590.
3. Watson AD, Berliner JA, Hama SY, et al. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest* 1995; 96:2882-2891.
4. Shih DM, Gu L, Xia YR, et al. Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature* 1998; 394:284-287.
5. Li WF, Costa LG, Richter RJ, et al. Catalytic efficiency determines the in vivo efficacy of PON1 for detoxifying organophosphates. *Pharmacogenetics* 1000; 10:767-780.
6. Mackness B, Davies GK, Turkie W, et al. Paraoxonase status in coronary heart disease: are activity and concentration more important than genotype? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:1451-1457.

7. Costa LG, Cole TB, Furlong CE. Paraoxonase (PON1): from toxicology to cardiovascular Medicine. *Acta Biomed Suppl* 2005; 2:50-57.
8. Bhattacharyya T, Nicholls SJ, Topol EJ, et al. Relationship of paraoxonase 1 (PON1) gene polymorphisms and functional activity with systemic oxidative stress and cardiovascular risk. *JAMA* 2008; 299:1265-1276.
9. Fujihara J, Yasuda T, Kawai Y, et al. First survey of the three gene polymorphisms (PON1 Q192R, eNOS E298D and eNOS C-786T) potentially associated with coronary artery spasm in African populations and comparison with worldwide data. *Cell Biochem Funct* 2011; 29:156-163.
10. Li WF, Sun SW, Cheng TJ, Chang KH, Chen CJ, Wang SL. Risk of carotid atherosclerosis is associated with low serum paraoxonase (PON1) activity among arsenic exposed residents in Southwestern Taiwan. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009; 236:246-253.
11. Mohamed RH, Mohamed RH, Karam RA, El-Aziz TAA. The relationship between paraoxonase1-192 polymorphism and activity with coronary artery disease. *Clin Biochem* 2010; 43:553-558.
12. Voetsch B, Benke KS, Damasceno BP, Siqueira LH, Loscalzo J. Paraoxonase 192 Gln→Arg polymorphism: an independent risk factor for nonfatal arterial ischemic stroke among young adults. *Stroke* 2002; 33:1459-1464.
13. Regieli JJ, Wouter-Jukema J, Doevendans PA, et al. Paraoxonase variants relate to 10-year risk in coronary artery disease impact of a high-density lipoprotein-bound antioxidant in secondary prevention. *J Am Coll Cardiol* 2009; 54:1238-1245.
14. Robertson KS, Hawe E, Miller GJ, Talmud PJ, Humphries SE. Human paraoxonase gene cluster polymorphisms as predictors of coronary heart disease risk in the prospective Northwick Park Heart Study II. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1639:203-212.
15. Rupérez AI, López-Guarnido O, Gil F, et al. Paraoxonase 1 activities and genetic variation in childhood obesity. *Br J Nutr* 2013; 21:1-9.
16. Granér M, James RW, Kahri J, Nieminen MS, Syväne M, Taskinen MR. Association of paraoxonase-1 activity and concentration with angiographic severity and extent of coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47:2429-2435.
17. Tang WH, Hartiala J, Fan Y, et al. Clinical and genetic association of serum paraoxonase and arylesterase activities with cardiovascular risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 32:2803-2812.

18. Yildiz A, Gura M, Yilmaz R, et al. Association of paraoxonase activity and coronary blood flow. *Atherosclerosis* 2008; 197:257–263.
19. Li WF, Costa LG, Furlong CE. Serum paraoxonase status: a major factor in determining resistance to organophosphates. *J Toxicol Environ Health* 1993; 40:337-346.
20. Jarvik GP, Rozek LS, Brophy VH, et al. Paraoxonase (PON1) phenotype is a better predictor of vascular disease than is PON1(192) or PON1(55) genotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:2441-2447.
21. Richter RJ, Furlong CE. Determination of paraoxonase (PON1) status requires more than genotyping. *Pharmacogenetics* 1999; 9:745-753.
22. Richter RJ, Jarvik GP, Furlong CE. Determination of paraoxonase 1 status without the use of toxic organophosphate substrates. *Circ Cardiovasc Genet* 2008; 1:147-152.
23. Furlong C, Holland N, Richter R, Bradman A, Ho A, Eskenazi B. PON1 status of farmworker mothers and children as a predictor of organophosphate sensitivity. *Pharmacogenet Genomics* 2006; 16:183-190.
24. Ingelsson E, Schaefer EJ, Contois JH, et al. Clinical utility of different lipid measures for prediction of coronary heart disease in men and women. *JAMA* 2007; 298:776–785.
25. Mouhamed DH, Ezzaher A, Mechri A, et al. Effect of cigarette smoking on paraoxonase 1 activity according to PON1 L55M and PON1 Q192R gene polymorphisms. *Environ Health Prev Med* 2012; 17:316-321.
26. Aviram M, Billecke S, Sorenson R, et al. Paraoxonase active site require for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraoxonase activities: selective action of human paraoxonase allozymes Q and R. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18:1617-1624.
27. de Souza RZT, Boroletto MSS, Loch MR, et al. Prevalence of cardiovascular risk factors in people aged 40 years or more from the city of Cambé, PR, Brazil (2011): a population-based study. *Epidemiol Serv Saúde* 2013; 22(3):435-444.
28. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18:499–502.
29. Castelli WP, Abbott RD, McNamara PM. Summary estimates of cholesterol used to predict coronary heart disease. *Circulation* 1983; 67:730–734.

30. Repetto M, Reides C, Carretero MLG, Costa M, Greimberg G, Llesuy S. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. *Clin Chim Acta* 1996; 255:107-117.
31. Jiang ZY, Hunt JV, Wolff SP. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Anal Biochem* 1992; 202:384-389.
32. Maciel ME, Oliveira FK, Propst GB, da Graça Bicalho M, Cavalli IJ, Ribeiro EM. Population analysis of xenobiotic metabolizing genes in South Brazilian Euro and Afro-descendants. *Genet Mol Biol* 2009; 32:723-728.
33. Allebrandt KV, Souza RL, Chautard-Freire-Maia EA. Variability of the paraoxonase gene (PON1) in Euro- and Afro-Brazilians. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002; 180:151-156.
34. Aviram M. Does paraoxonase play a role in susceptibility to cardiovascular disease? *Mol Med Today* 1999; 5:381-386.
35. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev* 1998; 56:317-333.
36. Cheng Z, Zhou H, Luther M, Yin JJ, Yu LL. Effects of wheat antioxidants on oxygen diffusion-concentration products in liposomes and mRNA levels of HMG-CoA reductase and cholesterol 7 α -hydroxylase in primary rat hepatocytes. *J Agric Food Chem* 2008; 56:5033-5042.
37. de Souza MO, Silva LS, Magalhães CLB, et al. The hypocholesterolemic activity of açai (*Euterpe oleracea Mart.*) is mediated by the enhanced expression of the ATP-binding cassette, subfamily G transporters 5 and 8 and low-density lipoprotein receptor genes in the rat. *Nutr Res* 2012; 32:976-984.
38. Oliveira-López MJ, Molina JJ, Mir MV, Rey EF, Martín F, de La Serrana HL. Extra virgin olive oil (EVOO) consumption and antioxidant status in healthy institutionalized elderly humans. *Arch Gerontol Geriatr* 2013; 57:234-242.
39. Park D, Huang T, Frishman WH. Phytoestrogens as cardioprotective agents. *Cardiol Rev* 2005; 13:13-17.
40. Roest M, Van Himbergen TM, Barendrecht AB, Peeters PH, Van der Schouw YT, Voorbij HA. Genetic and environmental determinants of the PON-1 phenotype. *Eur J Clin Invest* 2007; 37:187-196.

41. Gluba A, Pietrucha T, Banach M, Piotrowski G, Rysz J. The role of polymorphisms within paraoxonases (192 Gln/Arg in PON1 and 311Ser/Cys in PON2) in the modulation of cardiovascular risk: a pilot study. *Angiology* 2010; 61:157-165.
42. Hassan MA, Al-Attas OS, Hussain T, et al. The Q192R polymorphism of the paraoxonase 1 gene is a risk factor for coronary artery disease in Saudi subjects. *Mol Cell Biochem* 2013; 380:121-128.
43. Ferré N, Camps J, Fernández-Ballart J, et al. Regulation of serum paraoxonase activity by genetic, nutritional, and lifestyle factors in the general population. *Clin Chem* 2003; 49:1491-1497.
44. Jarvik GP, Tsai NT, McKinstry LA, et al. Vitamin C and E intake is associated with increased paraoxonase activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22:1329-1333.
45. Bielicki JK, Forte TM. Evidence that lipid hydroperoxides inhibit plasma lecithin: cholesterol acyltransferase activity. *J Lipid Res* 1999; 40:948-954.
46. Chrysohoou C, Panagiotakos DB, Pitsavos C, et al. The implication of obesity on total antioxidant capacity in apparently healthy men and women: the ATTICA study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2007; 17:590-597.
47. Hermsdorff HH, Puchau B, Volp AC, et al. Dietary total antioxidant capacity is inversely related to central adiposity as well as to metabolic and oxidative stress markers in healthy young adults. *Nutr Metab (Lond)* 2011; 8:9-66.
48. Simão ANC, Dichi JB, Barbosa DS, et al. Influence of uric acid and γ -glutamyltransferase on total antioxidant capacity and oxidative stress in patients with metabolic syndrome. *Nutritional* 2008; 24:675-681.
49. Costa LG, Giordano G, Furlong CE. Pharmacological and dietary modulators of paraoxonase 1 (PON1) activity and expression: The hunt goes on. *Biochem Pharmacol* 2011; 81:337-344.

5 CONCLUSÃO

Estudos populacionais trazem a vantagem de garantirem a validação externa dos resultados. Entretanto, estudos genéticos com populações amostrais menores se valem dos cálculos do Equilíbrio de Hardy-Weinberg para garantirem que a distribuição polimórfica está corretamente alocada entre todos os genótipos, equilíbrio este que foi encontrado na distribuição encontrada neste trabalho. Com esta distribuição encontrada, outras conclusões podem ser obtidas, como a herança genética encontrada em nossa população, com baixa frequência do polimorfismo *PON1 192RR*, mais comum em negros e asiáticos, e uma alta frequência de heterozigotos, o que indica a alta miscigenação de nossa população.

Embora a relação entre o polimorfismo *PON1 Q192R* e a atividade total da enzima não tenha sido descrita, nós encontramos essa relação estatística, na qual os indivíduos *PON1 192RR* apresentaram níveis de atividade mais baixos que os *PON1 192QQ*, e esta diferença de atividade se mostrou importante na modulação dos níveis de LDL colesterol. Outro dado encontrado foi a estreita relação entre o polimorfismo e o tabagismo, com níveis mais baixos de HDL colesterol e mais altos de triglicerídeos e nos índices de Castelli 1 e 2 nos indivíduos *PON1 192RR*, ainda que, isoladamente, este SNP não tenha apresentado relação estatística com o perfil lipídico.

Níveis de atividade sérica da PON1 já foram descritos como variando de 10 a 50 vezes, isso ocorre devido a fatores externos, ou ambientais, como alimentação, prática de exercícios físicos e o consumo de algumas substâncias, e também decorrente de fatores genéticos. Nas amostras analisadas, em todos os genótipos para o polimorfismo *PON1 Q192R*, a diferença na atividade plasmática da PON1 foi de, aproximadamente, oito vezes.

Tanto os níveis de antioxidantes, avaliados pela metodologia do TRAP, quanto os hidroperóxidos lipídicos (LOOH), avaliados pela metodologia de xilenol *Orange* (FOX), não se mostraram influenciados pelo PON1 status.

REFERÊNCIAS

AFONSO, M. S.; SANT'ANA, L. S.; MANCINI-FILHO, J. Interação entre antioxidantes naturais e espécies reativas do oxigênio nas doenças cardiovasculares: perspectivas para a contribuição do alecrim (*Rosmarinus officinalis L.*). **Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**. v. 35, n. 1, p. 129-148, 2010.

AGRAWAL, S. et al. Paraoxonase 1 gene polymorphism contribute to coronary artery disease risk among North Indians. **Indian Journal of Medical Science**. v.68, n. 8, p. 335-355, 2009.

ALBRIDGE, W. N. Serum esterases 1: two types of esterases (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, proprionate and butyrate, and a method for their determination. **The Biochemical Journal**. v. 53, n. 1, p. 110-117, 1953.

ALLEBRANDT, K. V.; SOUZA, R. L.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A. Variability of the paraoxonase gene (PON1) in Euro- and Afro-Brazilians. **Toxicology and Applied Pharmacology**. Seattle, v. 180, p. 151-156, 2002.

ANTOGNELLI, C. et al. CYP17, GSTP1, PON1 and GLO1 gene polymorphisms as risk factors for breast cancer: an Italian case-control study. **BCM Cancer**. v. 9, p. 115-128, 2009

AVIRAM, M. et al. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. **Journal of Clinical Investigation** v. 101, n. 8, p. 1581-1590, 1998.

AVIRAM, M.; VAYA, J. Paraoxonase 1 activities, regulation, and interactions with atherosclerotic lesion. **Current Opinion of Lipidology**. v. 24, p. 339-344, 2013.

AZIZI, F. et al. Association of lipids, lipoproteins, apolipoproteins and paraoxonase enzyme activity with premature coronary artery disease. **Pathophysiology and Natural History**. v. 13, n. 1, p. 9-16, 2002.

BELIN, A. C. et al. Association of a protective paraoxonase 1 (PON1) polymorphism in Parkinson's disease. **Neuroscience Letters**. v. 522, n. 1, p. 30-35, 2012.

BHATTACHARYYA, T. et al. Relationship of paraoxonase 1 (PON1) gene polymorphisms and functional activity with systemic oxidative stress and cardiovascular risk. **Journal of the American Medical Association**. v. 299, p. 1265-1276, 2008.

BLATTER, M. C. et al. Identification of a distinct human high-density lipoprotein subspecies defined by a lipoprotein-associated protein, K-45. Identity of K-45 with paraoxonase. **European Journal of Biochemistry**. v. 211, p. 871-879, 1993.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 196/96, de 10 de outubro de 1996. Aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, seção 1, p. 21082, 16 out. 1996. Disponível em < http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/cns/1996/res0196_10_10_1996.html>. Acesso em: 24 jun. 2010.

BROPHY, V. H.; JARVIK, G. P.; FURLONG, C. E. PON1 polymorphisms. In: Costa, L.G.; Furlong, C.E. **Paraoxonase (PON1) in health and disease: basic and clinical aspects**. Boston: Kluwer Academic Publishing. p. 53-77, 2002.

CAGIRCI, G. et al. Association between paraoxonase activity and late saphenous vein graft occlusion in patients with coronary artery bypass grafting. **Kardiologia Polska**. v. 67, n. 10, p. 1063-1068, 2009.

CASTELLI, W. P.; ABBOTT, R. D.; McNAMARA, P. M. Summary estimates of cholesterol used to predict coronary heart disease. **Circulation**. v. 67, p. 730-734, 1983.

CHEN, J. et al. Haplotype-phenotype relationships of paraoxonase-1. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**. v. 14, p. 731-734, 2005.

COLE, T. B. et al. Expression of human paraoxonase (PON1) during development. **Pharmacogenetics**. v. 13, p. 357-364, 2003.

COSTA, L. G. et al. Functional genomics of the paraoxonase (PON1) polymorphisms: effects on pesticide sensitivity, cardiovascular disease, and drug metabolism. **Annual Review of Medicine**. v. 54, p. 371-392, 2003a.

COSTA, L. G. et al. Measurement of paraoxonase (PON1) status as a potential biomarker of susceptibility to organophosphate toxicity. **Clinical Chimica Acta**. v. 352, p. 37-47, 2005a.

COSTA, L. G. et al. Modulation of paraoxonase 1 (PON1) activity. **Biochemical Pharmacology**. v. 69, p. 541-540, 2005b.

COSTA, L. G. et al. Paraoxonase (PON1) as a biomarker of susceptibility for organophosphate toxicity. **Health Sciences**. v. 8, n. 1, p. 1-12, 2003b.

COSTA, L. G. et al. Paraoxonase-2 (PON2) in brain and its potential role in neuroprotection. **Neurotoxicology**. v. 39, 2013.

COSTA, L. G.; COLE, T. B.; FURLONG, C. E. Polymorphisms of paraoxonase (PON1) and their significance in clinical toxicology of organophosphates. **Journal of Toxicology**. v. 41, n. 1, p. 37-45, 2003.

COSTA, L. G.; GIORDANO, G.; FURLONG, C. E. Pharmacological and dietary modulators of paraoxonase 1 (PON1) activity and expression: the hunt goes on. **Biochemical Pharmacology**. v. 81, p. 337-344, 2011.

DATASUS [*homepage*]. Mortalidade - Paraná. Óbitos por residência segundo capítulo da CID-10. Disponível em: <
<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defctohtm.exe?sim/cnv/obt10PR.def>> Acesso em: 23 out. 2013

de SOUZA, R. Z. T. et al. Prevalence of cardiovascular risk factors in people aged 40 years or more from the city of Cambé, PR, Brazil (2011): a population-based study. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**. v. 22, n. 3, p. 435-444.

FERRÉ, N. et al. Regulation of serum paraoxonase activity by genetic, nutritional, and lifestyle factors in the general population. **Clinical Chemistry** v. 49, n. 9, p. 1491-1497, 2003.

FUJIHARA, J. et al. First survey of the three gene polymorphism (PON1 Q192R, eNOS E298D and eNOS C-786T) potentially associated with coronary artery spasm in African populations and comparison with worldwide data. **Cell Biochemistry and Function**. v. 29, p. 156-163, 2011.

FURLONG, C. E. et al. PON1 status of farmworker mothers and children as a predictor of organophosphate sensitivity. **Pharmacogenetics and Genomics**. v. 16, p. 186-190, 2006.

GAIDUKOV, L. et al. The 192R/Q polymorphs of serum paraoxonase PON1 differ in HDL binding, lipolactonase stimulation, and cholesterol efflux. **Journal of Lipid Research**. v. 47, p. 2492-2502, 2006.

GARDEMANN, A. et al. The paraoxonase Leu-Met54 and Gln-Arg191 gene polymorphisms are not associated with the risk of coronary heart disease. **Atherosclerosis**. v. 152, p. 421-31, 2000.

GHORBANIHAGHJO, A. et al. Effect of nandrolone decanolate on paraoxonase activity in hemodialysis patients. **Clinical Biochemistry**. v. 38, p. 1076-1080, 2005.

GNASSO, A. et al. The Arg allele in position 192 of PON1 is associated with carotid atherosclerosis in subjects with elevated HDLs. **Atherosclerosis**. v. 164, p. 289-295, 2002.

HASSAN, M. A. et al. The Q192R polymorphism of the paraoxonase 1 gene is a risk factor for coronary artery disease in Saudi subjects. **Molecular and Cellular Biochemistry**. v. 380, p. 121-128, 2012.

HIMBERGEN, T. M. et al. Paraoxonase (PON1) and the risk for coronary heart disease and myocardial infarction in a general population of Dutch women. **Atherosclerosis**. v. 199, p. 408-414, 2008.

HOFMANN, J. N. et al. Biomarkers of sensitivity and exposure in Washington State pesticide handlers. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. v. 660, p. 19-27, 2010.

HOFMANN, J. N. et al. Serum cholinesterase inhibition in relation to paraoxonase-1(PON1) status among organophosphate-exposure agricultural handlers. **Environmental Health Perspectives**. v. 117, p. 1402-1408, 2009.

HORTER, M. J. et al. Associations of HDL phospholipids and paraoxonase activity with coronary heart disease in postmenopausal women. **Scandinavian Physiological Society**. v. 176, p. 123-130, 2002.

JARVIK, G. P. et al. Paraoxonase (PON1) phenotype is a better predictor of vascular disease than is PON1 192 or PON1 55 genotype. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**. v. 20, p. 2441-2447, 2000.

JIANG, Z. Y.; HUNT, J. V.; WOLFF, S. P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Analytical Biochemistry**. v. 202, p. 384-389, 1992.

KLIMKOWICZ-MROWIEC, A. et al. Paraoxonase gene polymorphism and the risk for Alzheimer's disease in the polish population. **Dementia Geriatric and Cognitive Disorders**. v. 31, n. 6, p. 417-423, 2011.

KOREN-GLUZER, M. et al. The antioxidant HDL-associated paraoxonase-1 (PON1) attenuates diabetes development and stimulates β -cell insulin release. **Atherosclerosis**. v. 219, p. 510-518, 2011.

LI, H. L.; LIU, D. P.; LIANG, C. C. Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress, and disease. **Journal of Molecular Medicine**. v. 81, n. 12, p. 766-779, 2003.

LI, W. F. et al. Risk of carotid atherosclerosis is associated with low serum paraoxonase (PON1) activity among arsenic exposed residents in Southwestern Taiwan. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 236, p. 246-253, 2009.

MACKNESS, M. I. et al. Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolaemia and insulin-dependent diabetes mellitus. **Atherosclerosis**. v. 86, p. 193-199, 1991.

MASELLI, L. M. F. **Estudos dos polimorfismos das paraoxonases 1 e 2 em pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana e avaliação do potencial de peroxidação lipídica**. 2007. 263 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de Medicina de São Paulo, São Paulo, 2007.

MAZUR, A. An enzyme in animal tissues capable of hydrolyzing the phosphorus-fluorine bound of alkyl fluorophosphates. **Journal of Biological Chemistry**. v. 164, p. 271-289, 1946.

MAZUR, A.; BODANSKY, O. The mechanism of in vitro and in vivo inhibition of cholinesterase activity by diisopropyl fluorophosphate. **Journal of Biological Chemistry**. v. 163, p. 261-276, 1946.

MOHAMED, R. H. et al. The relationship between paraoxonase1-192 polymorphism and activity with coronary artery disease. **Clinical Biochemistry**. v. 43, p. 553-558, 2010.

MOUHAMED, D. H. et al. Effect of cigarette smoking on paraoxonase 1 activity according to PON1 L55M and PON1 Q192R gene polymorphisms. **Environmental Health and Preventive Medicine**. v. 17, p. 316-321, 2012.

MYERS, J. D. et al. Como o Genoma Humano Foi Sequenciado. In: _____. **DNA Recombinante: genes e genomas**, 3. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 273-307, 2009.

NATIONAL ACADEMIES KECK FUTURE INITIATIVE. Biomarkers. 2011. In: **NATIONAL RESEARCH COUNCIL**. 2011. Disponível em: <<http://www.nationalacademies.org/nrc/>>. Acesso em: 20 maio 2011.

NAVAB, M. et al. Mildly oxidized LDL induces an increased apolipoprotein J/Paraoxonase ratio. **Journal of Clinical Investigation**. v. 99, n. 8, p. 2005-2019, 1997.

NUS, M. et al. Arylesterase activity and antioxidant status depend on PON1-Q192R and PON1-L55M polymorphism in subjects with increased risk of cardiovascular disease consuming walnut-enriched meat. **Nutrition and Disease**. v. 137, p. 1783-1788, 2007.

NUSSBAUM, R. L.; McINNES, R. R.; WILLARD, H. F. Variação Genética em Indivíduos e Populações: mutação e polimorfismo. In: _____. **Thompson & Thompson Genética Médica**, 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 181-214, 2008.

OLIVEIRA, S. A. et al. PON1 M/L55 mutation protects high-risk patients against coronary disease. **International Journal of Cardiology**. v. 94, p. 73-77, 2004.

OMBRES, D. et al. The Gln-Arg 192 polymorphism of human paraoxonase gene is not associated with coronary artery disease in Italian patients. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**. v. 18, p. 1611-1616, 1998.

OSAKI, F. et al. Roles of Sp1 and protein kinase C in regulation of human serum paraoxonase 1 (PON1) gene transcription in HepG2 cells. **Atherosclerosis**. v. 176, p. 279-287, 2004.

RAINWATER, D.L. et al. Determinants of variations in human serum paraoxonase activity. **Heredity**. v. 102, n. 2, p. 147-154, 2009.

REGIELI, J. J. et al. Paraoxonase variants relate to 10-year risk in coronary artery disease: impact of a high-density lipoprotein-bound antioxidant in secondary prevention. **Journal of the American College of Cardiology**. v. 54, n. 14, 2009.

REPETTO, M. et al. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. **Clinical Chimica Acta**. v. 255, p. 107-117, 1996.

RICHTER R. J. et al. Paraoxonase 1 status as a risk factor for disease or exposure. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. v. 660, p. 29-35, 2010.

RICHTER, R. J.; FURLONG, C. E. Determination of paraoxonase (PON1) status requires more than genotyping. **Pharmacogenetics**. v. 9, p. 745-753, 1999.

RICHTER, R. J.; JARVIK, G. P.; FURLONG, C. E. Determination of paraoxonase 1 status without the use of toxic organophosphate substrates. **Journal of the American Heart Association**. v. 1, p. 147-152, 2008.

RIOS, D. L. S. et al. Paraoxonase 1 gene polymorphism in angiographically assessed coronary artery disease: evidence for gender interaction among Brazilians. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**. v. 45, n. 7, p. 874-878, 2007.

ROBERTSON, K. S. et al. Human paraoxonase gene cluster polymorphisms as predictors of coronary heart disease risk in the prospective Northwick Park Heart Study II. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1639, p. 203-212, 2003.

ROEST, M. et al. Genetic and environmental determinants of the PON-1 phenotype. **European Journal of Clinical Investigation**. v. 37, p. 187-196, 2007.

RUPÉREZ, A. I. et al. Paraonase 1 activities and genetic variation in childhood obesity. **British Journal of Nutrition**. v. 110, n. 9, p. 1639-47, 2013.

SENTI, M. et al. Antioxidant paraonase 1 activity in the metabolic syndrome. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. v. 88, n. 11, p. 5422-5426, 2003.

SHIH, D. M. et al. A role for FXR and human FGF-19 in the repression of paraonase-1 gene expression by bile acids. **Journal of Lipid Research**. v. 47, p. 384-392, 2006.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**. v. 82, n. 2, p. 291-295, 1997.

SORENSEN, R. C. et al. Reconsideration of the catalytic center and mechanism of mammalian paraonase/arylesterase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 92, n. 16, p. 7187-7191, 1995.

TANG, W. H. W. et al. Clinical and genetic association of serum paraonase and arylesterase activities with cardiovascular risk. **Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**. v. 32, n. 11, p. 2803-2812, 2012.

VALDMANIS, P. N. et al. Association of paraonase gene cluster polymorphisms with ALS in France, Quebec, and Sweden. **Neurology**. v. 71, p. 514-520, 2008.

VOETSH, B. et al. Paraonase 192 Gln→Arg polymorphism: an independent risk factor for nonfatal arterial ischemic stroke among young adults. **Stroke**. v. 33, p. 1459-1464, 2002.

WHEELER J, G. et al. Four paraonase gene polymorphisms 11,212 of coronary heart disease and 12,786 controls: meta-analysis of 43 studies. **Lancet**. v. 363, p. 689-695, 2004.

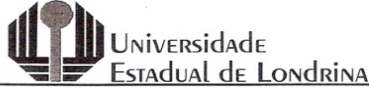
YILDIZ, A. et al. Association of paraonase activity and coronary blood flow. **Atherosclerosis**. v. 197, p. 257-263, 2007.

ZHANG, G. et al. Association between paraonase gene and stroke in the Han Chinese population. **BCM Medical Genetics**. v. 14, p. 16-25, 2013.

ANEXOS

ANEXO A

Termo de aprovação de pesquisa



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS
Universidade Estadual de Londrina
Registro CONEP 268

Parecer de Emenda CEP/UEL:	236/2010
CAAE:	0192.0.268.000-10
Processo:	3355/2012
Folha de Rosto:	368859
Pesquisador(a):	Monica Maria Bastos Paoliello
Unidade/Órgão:	CCS – Departamento de Saúde Coletiva

Prezado(a) Senhor(a):

O “Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina” (Registro CONEP 268) – de acordo com as orientações da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares, avaliou o projeto:

“DOENÇAS CARDIOVASCULARES NO ESTADO DO PARANÁ: MORTALIDADE, PERFIL DE RISCO, TERAPIA MEDICAMENTOSA E COMPLICAÇÕES.”

Emenda: realização adicional de determinantes: 1) parâmetros bioquímicos relacionados ao estresse oxidativo; 2) determinações de metais essenciais e não essenciais ao organismo; 3) determinação da enzima Paraoxonase 1 (PON1)

Situação da Emenda: **Aprovado**

Informamos que deverá ser comunicada, por escrito, qualquer modificação que ocorra no desenvolvimento da pesquisa, bem como deverá apresentar ao CEP/UEL relatório final da pesquisa.

Londrina, 28 de fevereiro de 2012.

Prof. Dra. Alexandrina Aparecida Maciel Cardelli
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos
Universidade Estadual de Londrina

ANEXO B

TRAP em Microplaca

(Adaptado de Repetto, 1996)

Reagentes

1. ABAP200mM (Sigma-Aldrich[®], EUA): Preparo no dia de uso

Pesar 216,96mg de ABAP e dissolver em 4mL H₂O destilada

Agitar no vórtex

Proteger com papel alumínio

2. Luminol(Sigma-Aldrich[®], EUA)

Pesar 3,98mg de Luminol e dissolver em 10mL H₂O destilada

Agitar em vórtex

Forma corpo de fundo

Proteger com papel alumínio

Conservar em geladeira

3. Luminol - Solução de trabalho: Preparar no dia do uso

A partir da Solução Mãe, agitar o tubo e pipetar:

400μL LUMINOL – SOLUÇÃO MÃE e diluir com 3600μL de H₂O destilada

Proteger com alumínio

Agitar em vórtex

4. TROLOX - Solução mãe (20μM) (Sigma-Aldrich[®], EUA)

Pesar 5mg e dissolver em 10mL Tampão Glicina pH=8,6

Proteger com papel alumínio

Agitar em vórtex

Conservar em geladeira

5. TROLOX - Solução de trabalho: Preparo no dia de uso

Agitar e pipetar 8μL TROLOX SOLUÇÃO MÃE e diluir com 1592μL de Tampão Glicina
pH = 8,6

Agitar em vórtex

6. Tampão glicina (Synth[®], Brasil)

Pesar 3,75g de glicina dissolver com \pm 400mL H₂O destilada em b quer de vidro

Acertar pH em 8,6 com KOH 1M

Transferir o tampão para balão volumétrico de 500mL e completar o volume

Transferir o tampão para frasco de vidro identificado e conservar em geladeira.

Procedimento

✓ Antes de iniciar as reações com soro, fazer as curvas ABAP e com TROLOX

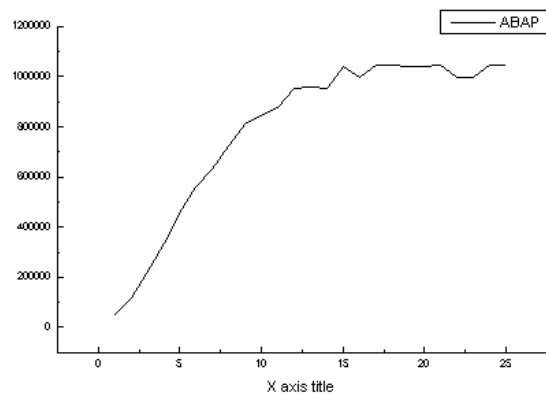
Curva ABAP

Tampão Glicina _____ 171 L

Luminol _____ 9,5 L

ABAP _____ 9,5 L

Homogeneizar bem.



Curva Trolox (em triplicata)

Tampão Glicina _____ 171  L

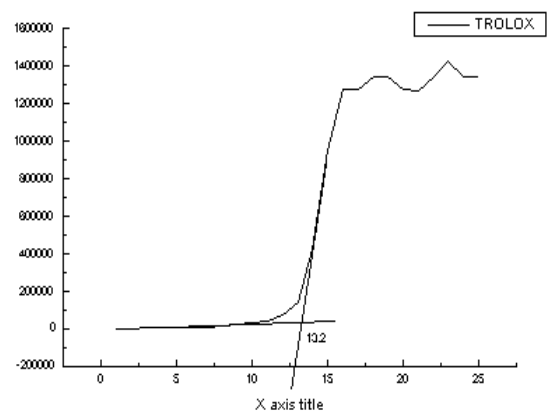
Luminol _____ 9,5  L

Trolox _____ 9,5  L

ABAP _____ 9,5  L

Tempo da curva Trolox entre 12 e 14 min

Homogeneizar bem.



Reação com Soro (fazer em triplicata)

Tampão Glicina _____ 171  L

Luminol _____ 9,5  L

Soro diluído 1 :20 com H₂O ___ 5  L

ABAP _____ 9,5  L

Homogeneizar bem.

Este experimento foi conduzido em um leitor de microplaca Victor X-3, Perkin Elmer®, (Waltham, MA, EUA) em um modo de contagem não coincidente por 25 minutos e uma faixa de resposta entre 300 a 620 nm com controle de temperatura de 30 °C. Os resultados foram expressos em contagem por minuto (c.p.m.). O cálculo do valor de TRAP foi realizado seguindo a equação:

$$TRAP = D \times \frac{\tau_{amostra}}{\tau_{Trolox}}$$

Onde D é o fator de diluição da amostra (780, para as reações em microplaca), $\tau_{amostra}$, é o tempo de indução da amostra e τ_{Trolox} , é o tempo de indução provocada pela adição de 1 μ M Trolox. Os resultados são expressos em μ M Trolox.

ANEXO C

Hidroperóxidos Lipídicos por Espectrofotometria

(Adaptado de Nourooz-Zadeh, Tajaddinisarmadi e Wolff, 1994)

Reagentes

1. H₂SO₄ 250mM (Merck[®], Germany)

Em um balão de 10mL colocar um pouco de água (em torno de 2mL). Adicionar 245μL de H₂SO₄ e completar o resto do balão com água.

2. Padrão: 1,1,3,3 tetraethoxypropane (TEP) 4mM (Sigma-Aldrich[®], EUA)

Em um balão de 50mL colocar um pouco de água (em torno de 20mL). Adicionar 48μL de TEP e completar o resto do balão com água.

3. Reagente de FOX

Em um frasco que comporte 100mL adicionar os reagentes na seguinte ordem:

- 1) 90mL metanol (Vetec[®], Brasil) puro;
- 2) 10mL de H₂SO₄ 250mM (preparado conforme item acima);
- 3) 88mg BHT (Vetec[®], Brasil);
- 4) 7,6mg de xilenol orange (Acros[®], Bélgica);
- 5) 9,8mg de sulfato de ferro amoníaco hexahidratado (Synth[®], Brasil).

O reagente deve ser armazenado em geladeira e ao abrigo da luz, podendo ser utilizado por até 2 dias.

A leitura da curva de calibração e das amostras processadas deverá ser realizada após incubação de 30 minutos à temperatura ambiente e depois centrifugação das mesmas por 10 minutos a 3000rpm. Realizar a leitura em espectrofotômetro Helios α, Thermo Spectronic[®] (Waltham, MA, EUA), em comprimento de onda de 560nm. A concentração de LOOH é expressa em mM.

Curva de calibração

REAGENTES	BRANCO	P1	P2	P3	P4	P5
Concentração (mM)	-	4,0	2,0	1,0	0,500	0,250
H ₂ O deionizada (μL)	-	-	100	100	100	100
Padrão TEP (μL)	-	-	100	100	100	100
Reagente de FOX (μL)	900	900	900	900	900	900

Procedimento - amostra

REAGENTES	BRANCO	AMOSTRA
Amostra (μL) (triplicata)	-	100
Reagente de FOX (μL)	900	900

Cálculo do fator:

$$Fator = \frac{\text{Concentração do Padrão}}{DO \text{ do Padrão}}$$

Obs.: Fator deverá ser de aproximadamente 6,0

Cálculo da concentração da amostra:

Concentração = fator x leitura da amostra

ANEXO D

Determinação do PON1 *status*

(Adaptado de Richter, Jarvink e Furlong, 2008)

Preparo da Solução de Estoque de Tampão TRIS-HCl 1M

Pesar 39,41g e diluir em 250mL de H₂O (utilizar balão volumétrico)

*Ajustar o pH para 8,0 (antes de acertar o menisco) e armazenar em geladeira

**Corrigir pH todos os dias antes de utilizá-lo

Preparo da Solução de Estoque de CaCl₂ 1M

Pesar 7,35g e diluir em 50mL de H₂O (utilizar balão volumétrico)

*Filtrar a solução em papel de filtro após o preparo e armazenar em geladeira.

Preparo do Tampão A – Preparar no dia do uso

20mM TRIS-HCl (pH=8,0) e 1mM CaCl₂

** Tampão para a *diluição das amostras* e preparo do *Substrato de CMPA* (cloro-metil-fenil-acetato)

Para 100mL de H₂O: 2mL Solução Estoque de TRIS-HCl pH8,0

100µL Solução Estoque de CaCl₂

Preparo do Tampão B – Preparar no dia do uso

20mM TRIS-HCl (pH=8,0), 1mM CaCl₂ e 2M NaCl

** Tampão para o preparo do Substrato de *PA-High Salt* (fenil-acetato em alta concentração de sal)

Para 50mL de H₂O: 1mL Solução Estoque de TRIS-HCl pH8,0

50µL Solução Estoque de CaCl₂

5,84g de NaCl

Preparo do Tampão C – Preparar no dia do uso

9,0mM TRIS-HCl (pH=8,0) e 0,9mM CaCl₂

** Tampão para o preparo do Substrato de *PA-No Salt* (fenil-acetato sem a adição de sal)

Para 50mL de H₂O: 450μL Solução Estoque de TRIS-HCl pH8,0
45μL Solução Estoque de CaCl₂

Preparo das amostras:

Antes de diluir as amostras, os tubos/criotubos de armazenamento deverão ser centrifugados a 10000 RPM, por 5 minutos e refrigerados a 10°C.

➤ **Reação 1 – Atividade CMPase**

*** Leitura avalia a formação do produto de hidrólise do CMPA (o 4-clorometil-fenol) durante 4 minutos**

PROCEDIMENTO:

Diluir a amostra 1:40 – 10μL da amostra e 390μL do Tampão A

*Utilizar tubos de vidro

As amostras, após serem diluídas, deverão ser processadas em até 30 minutos.

Preparo do Substrato de CMPA: C₈H₇O₂CH₂Cl - PM: 184,62; Conc. final: 3mM

10mL do Tampão A + 4,6μL do Reagente CMPA

*Esta solução de substrato deve ser preparada em Tubo tipo *Falcon*, ao abrigo de luz, no momento do uso e não deverá ser utilizada após 1 hora de seu preparo.

**Agitar vigorosamente por 30 segundos.

Adicionar 20μL da amostra diluída 1:40 nos poços em que ocorrerão a reação. Ao fim, adicionar 200μL da solução do Substrato de CMPA e proceder a leitura.

Parâmetros de leitura: Leitura cinética a 25°C – 16 leituras, em 280nm, com intervalo de 15 segundos entre as leituras; o tempo total da reação é de 4 minutos.

➤ **Reação 2 – Atividade AREase em alta concentração de sal**

*** Leitura avalia a formação do produto de hidrólise do fenil-acetato (fenol) durante 4 minutos**

PROCEDIMENTO:

Diluir a amostra 1:40 – 10μL da amostra e 390μL do Tampão A

*Utilizar tubos de vidro

As amostras, após serem diluídas, deverão ser processadas em até 30 minutos.

Preparo do Substrato de PA-High Salt: $C_8H_7O_2$ - PM: 136,15; Conc. final: 5,52mM

10mL do Tampão B + 10 μ L do Reagente PA (fenil-acetato)

*Esta solução de substrato deve ser preparada em Tubo tipo *Falcon*, ao abrigo de luz, no momento do uso e não deverá ser utilizada após 2 horas de seu preparo.

**Agitar vigorosamente por 30 segundos.

Adicionar 20 μ L da amostra diluída 1:40 nos poços em que ocorrerão a reação. Ao fim, adicionar 200 μ L da solução do Substrato de PA-High Salt e proceder a leitura.

*Adicionar o substrato com cuidado, para não fazer bolhas.

Parâmetros de leitura: Leitura cinética a 25°C – 16 leituras, em 270nm, com intervalo de 15 segundos entre as leituras; o tempo total da reação é de 4 minutos.

➤ **Reação 3 – Atividade AREase sem adição de sal**

* **Leitura avalia a formação do produto de hidrólise do fenil-acetato (fenol) durante 4 minutos**

PROCEDIMENTO:

Diluir a amostra 1:80 – 5 μ L da amostra e 395 μ L do Tampão A

*Utilizar tubos de vidro

As amostras, após serem diluídas, deverão ser processadas em até 30 minutos.

Preparo do Substrato de PA-No Salt: $C_8H_7O_2$ - PM: 136,15; Conc. final: 3,26mM

10mL do Tampão B + 5 μ L do Reagente PA (fenil-acetato)

*Esta solução de substrato deve ser preparada em Tubo tipo *Falcon*, ao abrigo de luz, no momento do uso e não deverá ser utilizada após 2 horas de seu preparo.

**Agitar vigorosamente por 30 segundos.

Adicionar 20 μ L da amostra diluída 1:80 nos poços em que ocorrerão a reação. Ao fim, adicionar 200 μ L da solução do Substrato de PA-No Salt e proceder a leitura.

Parâmetros de leitura: Leitura cinética a 25°C – 16 leituras, em 270nm, com intervalo de 15 segundos entre as leituras; o tempo total da reação é de 4 minutos.

ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os resultados das 16 leituras em todas as reações deverão ser corrigidos da mesma forma;

* A primeira etapa é a correção por *baseline correction*, que deverá ser feita para realizar a comparação da atividade da cinética enzimática;

* As amostras cujas replicatas variarem mais de 10% ou que apresentarem um valor de r^2 inferior a 0,99 deverão ser reprocessadas;

* Somente a primeira porção linear da curva deverá ser utilizada na análise final;

* A análise deverá ser feita em mDO, e o valor das médias das leituras deverá ser utilizado na fórmula de cálculo de atividade (expresso em U/mL).

FÓRMULA

$$Atv = \frac{mDO \times Vol.total\ da\ reação\ (mL) \times Fator\ de\ diluição}{\epsilon \times Volume\ de\ amostra\ (\mu L)}$$

Onde:

ϵ → Coeficiente de extinção molar

Para o produto de hidrólise do CMPA (4-clorometil-fenol) = 1,30mMol/Lcm⁻¹

Para o produto de hidrólise do fenil-acetato (fenol) = 1,31mMol/Lcm⁻¹