

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

**ESTUDO DOS POLIMORFISMOS PON1-192 E PON2-311 E ATIVIDADE DA
ENZIMA PAROXONASE EM PACIENTES DIABÉTICOS TIPO 2**

ELISANGELA CATAPAN

Florianópolis, 2004

ELISANGELA CATAPAN

**ESTUDO DOS POLIMORFISMOS PON1-192 E PON2-311 E ATIVIDADE DA
ENZIMA PAROXONASE EM PACIENTES DIABÉTICOS TIPO 2**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Farmácia como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz da Silva

Co-Orientador: Prof. Dr. Mario Hiroyuki Hirata

Florianópolis, 2004

Dedico este trabalho aos dois amores da minha vida

Paulo e Frederico

AGRADECIMENTOS

Agradecer faz sentido quando partilhamos carinho, estímulo, dificuldades, realizações.

Muitas pessoas fizeram parte desta jornada, e todas merecem **meu agradecimento**.
Porém algumas, de modo muito especial.

Pacientes, voluntários anônimos, sem os quais não poderia realizar esse estudo.

Profissionais, dos laboratórios envolvidos na pesquisa, muito obrigada. Laboratório Médico Santa Luzia, Biomédico, Laboratório de Análises Clínicas da UNISUL, Laboratório de Biologia Molecular da USP e Laboratório de Biologia Molecular da UNISUL - Palhoça.

Colegas, que direta ou indiretamente participaram em algum momento da realização deste trabalho, singularmente: Regina, Cláudio, Angelita, Rita, Bia, Saulo, Alice, Mustafá.

Professores, elo que se faz, inicialmente por um propósito, porém no processo se constitui em parceria, compreensão, construção coletiva.
Especialmente ao Professor Edson Luiz Silva, meu orientador e Professor Mario Hiroyuki Hirata, co-orientador.

Amigos, nomear todos é difícil, porém alguns imprescindíveis, Cíntia, Daniele, Jorgeana, Adriana, Marcelos, Fabrícia.

Querida amiga Maria Elisa, com quem partilhei este trabalho, dividindo buscas, descobertas, dúvidas, angústias e sucessos, meu especial agradecimento.

Familiares, Jandir, Araci, Paulo, Carmen, Elizabete, Alexandre, Vinícius, Rose - apoio, compreensão, estímulo em todos os momentos.

Paulo, amigo, companheiro, cúmplice que não só partilhou todos os momentos desta realização, mas também, as ausências, os silêncios e os momentos de tensão.

Frederico, não poderia deixar de ser, a melhor expressão de um sonho.

RESUMO

A paroxonase sérica humana (PON) é uma enzima localizada na HDL e está envolvida na detoxificação de organofosforados e possivelmente na prevenção da peroxidação lipídica da LDL, tendo, portanto, características antiaterogênicas. A dislipidemia é um dos principais fatores de risco para a doença arterial coronariana (DAC) que é a mais importante complicação do diabetes mellitus atingindo em torno de 50 % dos pacientes. Alguns estudos sugerem uma associação dos polimorfismos genéticos da enzima PON com o desenvolvimento de DAC e outras complicações em pacientes diabéticos tipo 2. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito dos polimorfismos PON1-192 e PON2-311 na atividade enzimática, no controle glicêmico e no perfil lipídico em 61 pacientes diabéticos tipo 2 e 82 indivíduos controle. O sangue foi coletado, após 12h de jejum, para a determinação da glicemia, insulina e hemoglobina glicada (HbA_{1c}), colesterol total, lipoproteínas e triglicerídeos e das atividades arilesterase e paroxonase da enzima PON. O DNA foi extraído dos leucócitos do sangue periférico pelo método de extração salina. A análise dos polimorfismos foi realizada por PCR-RFLP. Não houve diferença significativa na distribuição dos genótipos e na frequência alélica dos polimorfismos PON1-192 (QQ, RQ, RR) e PON2-311 (SS, SC, CC) entre os pacientes diabéticos e os indivíduos do grupo controle. Os valores da atividade paroxonase e arilesterase foram semelhantes para os dois grupos de participantes. O polimorfismo PON1-192 influenciou a atividade paroxonase em ambos os grupos, sendo menor nos portadores do genótipo QQ, intermediária no genótipo RQ e maior no genótipo RR ($p < 0,05$). A atividade paroxonase e arilesterase foi menor nos indivíduos do grupo controle portadores do genótipo PON2-311 SS. Os genótipos dos polimorfismos PON1-192 e PON2-311 não afetaram os parâmetros do controle glicêmico e do perfil lipídico nos pacientes diabéticos tipo 2, apesar dos pacientes portadores dos alelos PON1-192 R e PON2-311 C demonstrarem tendência para maiores níveis de glicose, insulina e triglicerídeos. Considerando os resultados do presente trabalho, podemos sugerir que os pacientes diabéticos tipo 2 apresentaram distribuição gênica e frequência alélica dos polimorfismos PON1-192 e PON2-311 semelhante aos indivíduos não diabéticos. A atividade da enzima paroxonase também não foi diferente nos dois grupos de estudo. A existência de associação dos genótipos PON1-192 RR e PON2-311 CC com concentrações maiores de glicose, insulina e triglicerídeos não foi estatisticamente significativa para sugerirmos a utilização desse parâmetro como indicador precoce de complicações em pacientes com diabetes mellitus tipo 2.

ABSTRACT

A STUDY OF THE PON1-192 AND PON2-311 POLYMORPHISMS AND PARAOXONASE ENZYME ACTIVITY IN TYPE 2 DIABETIC PATIENTS

The human serum paraoxonase (PON) is an enzyme located in the HDL and is involved in the detoxification of organophosphates and possibly in the prevention of lipid peroxidation of LDL, having, therefore, antiatherogenic characteristics. Dyslipidemia is one of the main risk factors for coronary artery disease (CAD), which is the most important complication of diabetes mellitus, affecting around 50 % of the patients. Some studies suggest an association between the genetic polymorphisms of the PON enzyme and the development of CAD and other complications in type 2 diabetic patients. This study's goal was to evaluate the effect of the PON1-192 and PON2-311 polymorphisms in the enzymatic activity, in the glycaemic control and in the lipid profile in 61 type 2 diabetic patients and 82 control individuals. The blood was collected, after a 12h fasting, to determine glucose level, insulin and glycosylated hemoglobin (HbA_{1c}), total cholesterol, lipoproteins and triglycerides and the arylesterase and paraoxonase activities of the PON enzyme. The DNA was extracted from peripheral blood leukocytes using the saline extraction method. The analysis of the polymorphisms was made by PCR-RFLP. There was no significant difference in the genotype distribution or in the allelic frequency of the PON1-192s (QQ, RQ, RR) and PON2-311 (SS, SC, CC) polymorphisms between diabetic patients and control group individuals. The values of the paraoxonase and arylesterase activities were similar in the two groups. The PON1-192 polymorphism affected the paraoxonase activity in both groups, being smaller amongst QQ genotype individuals, intermediate for RQ genotype and greater for RR genotype individuals ($p < 0,05$). The smallest paraoxonase and arylesterase activities were found amongst control group individuals having PON2-311 SS genotype. The genotypes for PON1-192 and PON2-311 polymorphisms did not affect glycaemic control and lipid profile parameters in type 2 diabetic patients, although patients with the PON1-192 R and PON2-311 C alleles showed a tendency for higher levels of glucose, insulin and triglycerides. Considering the results of the present work, we can suggest that type 2 diabetic patients presented genetic distribution and allelic frequencies of the PON1-192 and PON2-311 polymorphisms similar to the non-diabetic patients. The paraoxonase enzyme activity was not different between the two studied groups. The existence of an association between the PON1-192 RR and PON2-311 CC genotypes and higher levels of glucose, insulin and triglycerides was not statistically significant to suggest the utilization of this parameter as an early indicator of complications in type 2 diabetes mellitus patients.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Atividades paroxonase e arilesterase da PON no soro de todos os participantes do estudo.....	34
Figura 2 Atividade arilesterase da PON no soro e nas partículas de HDL de todos os participantes do estudo	34
Figura 3 Atividade arilesterase na HDL e concentração de HDL colesterol de todos os participantes do estudo	35
Figura 4 Atividades paroxonase e arilesterase da enzima paroxonase no soro de indivíduos do grupo controle e de pacientes diabéticos	36
Figura 5 Produtos de restrição enzimática com <i>Mbo I</i> da região polimórfica do gene PON1-192	38
Figura 6 Produtos de restrição enzimática com <i>Dde I</i> da região polimórfica do gene PON2-311	39
Figura 7 Efeito do polimorfismo PON1-192 na glicemia de jejum dos grupos controle.....	42
Figura 8 Influência dos genótipos do polimorfismo PON1-192 sobre a atividade paroxonase em indivíduos do grupo controle e pacientes diabéticos	44
Figura 9 Influência dos genótipos do polimorfismo PON1-192 sobre a atividade arilesterase em indivíduos do grupo controle e pacientes diabéticos	45
Figura 10 Influência dos genótipos do polimorfismo PON2-311 sobre a atividade paroxonase em indivíduos do grupo controle e pacientes diabéticos	48
Figura 11 Atividade arilesterase da PON de acordo com o polimorfismo PON2-311.	49

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 Seqüência de iniciadores dos polimorfismos estudados	28
Tabela 1 Dados biodemográficos e características clínicas dos pacientes diabéticos e indivíduos do grupo controle.....	31
Tabela 2 Concentrações séricas de glicose, insulina e hemoglobina glicada (HbA1c) nos participantes dos grupos controle e diabético.....	32
Tabela 3 Concentrações séricas de lipídeos e lipoproteínas dos pacientes do grupo diabético e indivíduos do grupo controle.....	33
Tabela 4 Atividades paroxonase e arilesterase da PON no soro dos indivíduos do grupo controle e pacientes diabéticos.	37
Tabela 5 Distribuição dos genótipos e freqüência relativa de alelos para o polimorfismo PON1-192 nos indivíduos dos grupos controle e diabético.	39
Tabela 6 Distribuição dos genótipos e freqüência relativa de alelos para o polimorfismo PON2-311 nos indivíduos dos grupos controle e diabéticos.....	40
Tabela 7 Concentrações plasmáticas de glicose e insulina de acordo com os genótipos do polimorfismo PON1-192 nos indivíduos do grupo controle e pacientes diabéticos.	41
Tabela 8 Concentrações de Hemoglobina Glicada (%) de acordo com os genótipos dos polimorfismos PON1-192 e PON2-311 nos pacientes diabéticos.....	41
Tabela 9 Concentrações séricas de lipídeos de acordo com os genótipos do polimorfismo PON1-192 nos indivíduos do grupo controle e pacientes diabéticos	43
Tabela 10 Concentrações plasmáticas de glicose e insulina de acordo com os genótipos do polimorfismo PON2-311 nos indivíduos do grupo controle e pacientes diabéticos.	45
Tabela 11 Concentrações séricas de lipídeos de acordo com os genótipos do polimorfismo da PON2-311 nos indivíduos do grupo controle e pacientes diabéticos	47

LISTA DE ABREVIATURAS

AGE's	Produtos Finais de Glicosilação
Apo A-I	Apolipoproteína A-I
Apo B-100	Apolipoproteína B-100
CT	Colesterol Total
DAC	Doença Arterial Coronariana
DCCT	Diabetes Control and Complication Trial
DM	Diabetes Mellitus
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
GOD/PAP	Glicose Oxidase-Peroxidase
Glu	Glutamina
Gli	Glicina
HAS	Hipertensão Arterial Sistólica
HbA _{1c}	Hemoglobiana Glicosilada
HDL	Lipoproteína da Alta Densidade
HDL-C	Colesterol da HDL
IAM	Infarto Agudo do Miocárdio
IDL	Lipoproteína de Densidade Intermediária
IMC	Índice de Massa Corporal
kb	kilobases
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
LDL-C	Colesterol da LDL
LPL	Lipase Lipoprotéica
NIH	<i>National Institute of Health</i>
pb	pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase

PON	Paroxonase
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TG	Triglicerídeos
RFLP	Polimorfismo de Tamanho de Fragmentos de Restrição
U	Unidade de enzima
VLDL	Lipoproteína de Muito Baixa Densidade
VLDL-C	Colesterol da VLDL

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Patogênese da Aterosclerose	13
1.2 Diabetes Mellitus Tipo 2 e Dislipidemias	15
1.3 Enzima Paroxonase.....	16
2 JUSTIFICATIVA	21
3 OBJETIVOS.....	22
3.1 Objetivo geral	22
3.2 Objetivos específicos.....	22
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1 Reagentes.....	23
4.2 Casuística.....	23
4.2.1 Grupo Diabético	23
4.2.2 Grupo Controle	23
4.2.3 Critérios de exclusão	24
4.2.4 Amostras biológicas	24
4.3 Métodos	24
4.3.1 Determinações bioquímicas.....	24
4.3.2 Atividade Enzimática da Paroxonase (PON).....	25
4.3.3 Técnicas Moleculares	26
4.3.4 Controle de Qualidade das análises bioquímicas e moleculares	30

4.3.5 Análise estatística	30
5 RESULTADOS	31
5.1 Características biodemográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes diabéticos e indivíduos do grupo controle.....	31
5.2 Determinação das Atividades Enzimáticas da Paroxonase (PON): Atividade arilesterase e atividade paroxonase	33
5.3 Avaliação dos Polimorfismos PON1-192 e PON2-311 do gene da Paroxonase e Distribuição dos Genótipos e da Freqüência Alélica.....	37
5.3.1 Análise dos fragmentos de restrição do polimorfismo PON1-192.....	37
5.3.2 Distribuição dos genótipos e freqüência alélica do polimorfismo PON1-192.....	38
5.3.3 Análise dos fragmentos de restrição do polimorfismo PON2-311.....	39
5.3.4 Distribuição dos genótipos e freqüência alélica do polimorfismo PON2-311	39
5.4 Avaliação da Influência do Polimorfismo PON1-192 no Perfil Glicêmico, no Perfil Lipídico e na Atividade Enzimática	40
5.4.1 Associação entre o polimorfismo PON1-192 e o perfil glicêmico dos indivíduos do grupo controle e pacientes diabéticos.....	40
5.4.2 Associação entre o polimorfismo PON1-192 e o perfil lipídico dos indivíduos do grupo controle e pacientes diabéticos	42
5.4.3 Influência do polimorfismo PON1-192 nas atividades paroxonase e arilesterase da PON nos indivíduos do grupo controle e pacientes diabéticos	44
5.5 Avaliação da Influência do Polimorfismo PON2-311 no Perfil Glicêmico, no Perfil Lipídico e na Atividade Enzimática da PON.....	45
5.5.1 Efeito do polimorfismo PON2-311 no perfil glicêmico dos indivíduos do grupo controle e pacientes diabéticos	45

5.5.2 Efeito do polimorfismo PON2-311 no perfil lipídico nos indivíduos do grupo controle e pacientes diabéticos	46
5.5.3 Efeito do polimorfismo PON2-311 na atividade enzimática sérica da PON nos indivíduos do grupo controle e pacientes diabéticos	48
6 DISCUSSÃO	50
7 CONCLUSÕES	63
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	74
ANEXO B - Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos	76
ANEXO C – Questionário – Avaliação Clínica	78

1 INTRODUÇÃO

De acordo com dados do Ministério da Saúde no Brasil, em 1998, mais de 250 mil pessoas morreram devido às doenças cardiovasculares, correspondendo a 32 % de todas as causas de morte em nosso país (SIM-Brasil, 2000). Segundo o relatório da OMS, o mais abrangente já realizado sobre doenças cardiovasculares, esses males matarão mais de 24 milhões de pessoas por ano até 2030 (SMITH e cols., 2004). A doença arterial coronariana (DAC) é detectada em mais de 50 % dos pacientes diabéticos e é considerada a mais importante complicação do diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Estima-se que 77 % das hospitalizações por complicações crônicas do diabetes, nos Estados Unidos da América, são atribuídas às doenças cardiovasculares. (MOORADIAN, 2003; DONANGELO e OLIVEIRA, 2004). O diabetes mellitus é um importante e crescente problema de saúde pública para todos os países, independente do seu grau de desenvolvimento. O número de pacientes diabéticos está aumentando de forma exponencial, adquirindo características epidêmicas em alguns países, favorecido pelo aumento na expectativa de vida da população, obesidade e sedentarismo. A prevalência da aterosclerose coronária em diabéticos adultos é maior do que na população não diabética, triplicando o risco de morte de causa coronária (PORTO, 1998; ARONSON e cols, 2001; DONANGELO e OLIVEIRA, 2004). As principais causas relacionadas à fisiopatologia da aterosclerose no diabetes são: dislipidemia, resistência insulínica, disfunção endotelial, microangiopatia diabética, glicação não enzimática, estresse oxidativo, alterações hemorreológicas e da hemostasia e associações com outros fatores de risco (BOZZA e cols., 2004).

1.1 Patogênese da Aterosclerose

A aterosclerose tem etiologia multifatorial, decorrente de um processo inflamatório crônico da parede arterial, com depósitos de colesterol, restos celulares, plaquetas, fibrina e cálcio que levam à formação de placas enrijecidas e redução da elasticidade e da luz do vaso. Afeta principalmente artérias de médio e grande calibre (PORTO, 1998). As lesões da aterosclerose ocorrem na camada mais interna da artéria, a íntima, e limitam-se basicamente a esta região do vaso. As lesões são, em geral, excêntricas, e quando se tornam grandes o bastante, conseguem obstruir a artéria e o suprimento vascular para o tecido ou órgão, resultando em isquemia e necrose. As conseqüências são, freqüentemente, seqüelas clínicas características de infarto do miocárdio, infarto cerebral, gangrena dos membros ou morte

súbita (BENNETT, 1997). A cardiopatia isquêmica é uma das formas mais importantes da doença aterosclerótica nos países industrializados, não somente por ser a causa mais comum de morte, como também por incapacitar temporária ou definitivamente um grande número de indivíduos em idade produtiva (PORTO, 1998).

A aterogênese envolve diferentes células, citocinas e fatores de crescimento resultando em lesão endotelial e acúmulo de produtos celulares no espaço subendotelial que, posteriormente, levarão ao comprometimento da camada média (DRAGANOV, 2000). São várias as teorias que tentam explicar o desenvolvimento da aterosclerose, entretanto todas elas concordam que a lesão endotelial é o ponto de partida na etiopatogenia deste processo. Inicialmente, a lesão é mínima e sutil, não havendo importantes mudanças estruturais, mas favorece o surgimento de uma resposta inflamatória que resulta em aumento da permeabilidade endotelial aos monócitos, lipídeos e plaquetas circulantes (ROSS, 1993). As lipoproteínas de baixa densidade (LDL) são depositadas no endotélio na razão direta de sua concentração plasmática, sofrem reações de oxidação por espécies reativas de oxigênio e/ou de nitrogênio, ou ainda, de lipoperóxidos locais, após o que adquirem propriedades pró-inflamatórias e citotóxicas (SOZMEN e cols., 2001) e passam a estimular a síntese de proteínas quimiotáticas para monócitos, os quais, penetrando no endotélio lesado, transformam-se em macrófagos. No espaço sub-endotelial, os macrófagos captam a LDL oxidada através de receptores celulares (“*scavenger receptors*”) que não sofrem hiporegulação pelo conteúdo de colesterol intracelular. E assim, ao acumularem lipídeos os macrófagos se transformam em células espumosas (“*foam cells*”) e ao se agruparem, constituem a estria gordurosa, primeira fase da formação da lesão aterosclerótica (KAPLAN, 1999; GIUGLIANO, 2000; ROSS, 1993).

À medida que aumenta o acúmulo de colesterol pelos macrófagos e células espumosas, verifica-se também a sua deposição nas células musculares lisas e tecido conjuntivo, formando a placa gordurosa ou ateroma. Os macrófagos secretam fatores quimiotáticos e na presença de fatores mitogênicos como o fator de crescimento derivado de plaquetas, fator estimulante de granulócito-monócito, fator de crescimento fibroblástico, fator de crescimento semelhante à insulina (“*insulin-like*”) e a interleucina-1, as células musculares lisas multiplicam-se rapidamente, modificando a lesão, que passa a ser proliferativa e de aspecto fibroso, formando o fibroateroma. A placa aterosclerótica madura passa a conter dois componentes principais, um ateromatoso (rico em lipídeos) e outro esclerótico (rico em colágeno). Este último é relativamente benigno e, quando predominante, em função do

colágeno dar sustentação à lesão e protegê-la de fissuras ou rupturas, confere-lhe uma condição “estável”. Já o componente ateromatoso, quando é o principal constituinte da placa, torna-se mais vulnerável e “instável”, e a placa está sujeita a complicações (SOZMEN e cols., 2001).

1.2 Diabetes Mellitus Tipo 2 e Dislipidemias

O diabetes mellitus pode ser considerado um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia resultante do defeito na secreção da insulina, na sua ação ou ambos e caracteriza-se por importantes alterações no metabolismo dos carboidratos, lipídeos e proteínas (OLIVEIRA, 2004). O aumento da mortalidade em pacientes diabéticos por doenças cardiovasculares está relacionado ao estado diabético *per se* e à combinação de vários fatores de risco cardiovasculares, como obesidade, hipertensão arterial e dislipidemia, entre outros. A dislipidemia é um dos principais fatores de risco para a doença cardiovascular em pacientes diabéticos, cuja influência é maior do que nos demais indivíduos. A dislipidemia em diabéticos, quando comparada à de não-diabéticos, é mais grave em mulheres do que em homens, sugerindo que o risco de DAC é relativamente maior em mulheres do que em homens diabéticos (HAFFNER, 1998; HU e cols., 2001). As alterações mais frequentes na população diabética são hipertrigliceridemia, baixo nível de colesterol das lipoproteínas de alta densidade (HDL-C) e alterações qualitativas nas lipoproteínas, tais como a formação de partículas de LDL pequenas e densas. A LDL densa é mais frequente na circulação quanto mais elevados forem os níveis de triglicerídeos, sendo mais aterogênicas do que as LDL maiores e menos densas (SANTOS, 2001; DONANGELO e OLIVEIRA, 2004; GARIN e cols., 1997). A estratificação dos fatores de risco de doença arterial coronariana em pacientes com DM2 mostra que o colesterol da LDL (LDL-C) e das lipoproteínas de alta densidade (HDL-C) são os melhores preditores de DAC. Entretanto, a prevalência de elevada concentração de LDL-C em diabéticos não é diferente dos níveis encontrados na população não diabética. Em contraste, a incidência de hipertrigliceridemia e baixos níveis de HDL-C em diabéticos é, aproximadamente, duas vezes maior do que no grupo de não diabéticos (MOORADIAN, 2003).

Nos pacientes com diabetes tipo 2, o metabolismo dos lipídeos provenientes da dieta encontra-se comprometido pela coexistência de obesidade e hiperlipidemia associado à resistência insulínica (GINSBERG e TUCK, 2001). A anormalidade lipídica mais frequente

nos diabéticos é a hipertrigliceridemia, causada pelo acúmulo de lipoproteínas ricas em triglicerídeos (quilomícrons e lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL), bem como de lipoproteína de densidade intermediária (IDL) (DONANGELO e OLIVEIRA 2004). A superprodução de VLDL, com aumento da secreção de triglicerídeos e apolipoproteína B-100, parece ser a etiologia comum do aumento dos níveis plasmáticos de VLDL em pacientes diabéticos tipo 2. O aumento na produção e secreção de VLDL é, provavelmente, resultado direto da resistência insulínica e do fluxo aumentado de ácidos graxos livres característico do diabetes tipo 2 (GINSBERG e TUCK, 2001). Tanto o aumento na produção hepática de VLDL como a redução na metabolização da VLDL por diminuição na atividade da enzima lipase lipoprotéica contribuem para a hipertrigliceridemia (BOZZA e cols., 2004). Nos pacientes com diabetes tipo 2, a regulação plasmática dos níveis de LDL, bem como de VLDL, é complexa. O aumento do catabolismo da fração LDL é comum em não diabéticos com hipertrigliceridemia significativa, ainda que a base para isto esteja incerta. Níveis plasmáticos elevados de triglicerídeos podem, provavelmente, aumentar o catabolismo da LDL em pacientes com diabetes tipo 2. Isto também pode ser uma consequência da glicação da LDL. Esses múltiplos efeitos potenciais no metabolismo da LDL tornam difícil prever que nível de LDL estará presente em qualquer indivíduo com diabetes tipo 2 (GINSBERG e TUCK, 2001).

Baixos níveis de HDL-C e apolipoproteína A (apo A) em pacientes com DM2 podem estar presentes na ausência de hipertrigliceridemia. No entanto, o mecanismo para esse fenômeno não está esclarecido. Nessa patologia, as partículas de HDL sofrem mudanças na composição, com maior concentração de triglicerídeos e um aumento na relação colesterol/proteína resultante da depleção de apo A. Essas mudanças podem interferir no transporte reverso do colesterol pela HDL. Tanto as alterações qualitativas, como as quantitativas, correlacionam-se com a baixa atividade da lipase lipoprotéica (GINSBERG e TUCK, 2001).

1.3 Enzima Paroxonase

O efeito protetor da HDL no desenvolvimento da aterosclerose, ou a relação inversa entre os níveis plasmáticos de HDL e as doenças cardiovasculares têm sido atribuídos ao papel da HDL no transporte reverso do colesterol (GORDON e cols., 1989). No entanto, experimentos *in vitro*, bem como estudos genéticos populacionais e familiares e investigações

usando animais transgênicos, têm revelado que os níveis plasmáticos de HDL-C não refletem, necessariamente, a eficácia e a anti-aterogenicidade do transporte reverso do colesterol (MERTENS e HOLVOET, 2001). O potencial da HDL em impedir diretamente alguns dos processos fundamentais da aterogênese tem merecido, assim, grande atenção, particularmente o seu potencial antioxidante (MACKNESS e DURRINGTON, 1995). A habilidade antioxidante da HDL contra a modificação oxidativa da LDL em vários sistemas *in vitro* é conhecida há longo tempo. Esse efeito antioxidante parece ser devido à influência de algumas proteínas presentes nas partículas de HDL, principalmente a enzima paroxonase (PON), além da apolipoproteína A-I e da PAF (fator de ativação plaquetária) acetil-hidrolase (KWITEROVICH, 1998; AVIRAM, 1999a e 1999b; KAPLAN e AVIRAM 1999; SORENSON e cols., 1999; NAVAB e cols., 2000; HONG e cols., 2001; KOCH e cols., 2001; MACKNESS e cols., 2001; SOZMEN e cols., 2001).

A paroxonase (EC.3.1.8.1 arildialquilfosfatase) é uma glicoproteína com 354 aminoácidos e peso molecular de aproximadamente 45 KDa. Ela é uma esterase dependente de cálcio, cujo mecanismo de ação não está completamente elucidado (VAN LENTEN e cols., 2001; DRAGANOV e LA DU, 2004). A PON encontra-se distribuída em vários tecidos, como fígado, rins, intestino e soro, onde se encontra associada à HDL, mais especificamente ligada às apo-AI e apo-J da HDL (MACKNESS, 1989a; MACKNESS, 1989b; MACKNESS e DURRINGTON, 1995; TOMÁS e cols., 2004). Originalmente, demonstrou-se que a enzima é responsável pela hidrólise do “paroxon” (de onde origina o seu nome), um produto do catabolismo do inseticida “paration”. A PON também é capaz de hidrolisar outros substratos, como acetato de fenila (atividade arilesterase), ácidos carboxílicos aromáticos, organofosfatos, peróxido de hidrogênio e peróxidos lipídicos (WATSON e cols., 1995; MACKNESS e cols., 1996; AVIRAM e cols., 1998; NAVAB e cols., 1997; AVIRAM e cols., 2000). No entanto, o substrato fisiológico para a PON permanece ainda desconhecido. Acredita-se, porém, que os fosfolípídeos oxidados presentes na LDL modificada oxidativamente sejam os prováveis substratos fisiológicos da PON (WATSON e cols., 1995). Além disso, foi demonstrado que a PON é capaz de hidrolisar peróxidos lipídicos presentes em lesões ateroscleróticas humanas (AVIRAM e cols., 2000).

Muitos estudos têm sugerido que os polimorfismos do gene da enzima antioxidante PON sejam fator de risco para a DAC (MACKNESS e cols., 1991; RUIZ e cols., 1995, SERRATO e cols., 1995; MACKNESS e cols., 1996; AVIRAM, 1999 b.; DURRINGTON e cols., 2001), além de favorecer o surgimento de complicações vasculares em diabéticos,

complicações do metabolismo da glicose e redução da sensibilidade à insulina (LEVIEV e cols., 2001; DEAKIN e cols., 2002). Polimorfismos genéticos são variações na sequência de nucleotídeos. De forma simplificada, os alelos específicos em um ou mais *loci* representam o genótipo para aqueles genes, sendo o fenótipo o efeito da ação do gene. A PON1 humana possui vários polimorfismos genéticos já identificados. Os mais estudados são o polimorfismo na posição 55 (Met/Leu), onde ocorre uma substituição do aminoácido metionina (M) por leucina (L) e o polimorfismo na posição 192 (Arg/Glu) com uma substituição da arginina (R) por glutamina (Q). O gene PON1 é parte de uma família multigênica que inclui também os genes PON2 e PON3, os quais exibem alto grau de homologia com o PON1 (LEUS e cols., 2001). Todos os três genes da PON estão próximos uns dos outros no braço longo do cromossomo 7, região q21.3-22.1. Para o gene PON2 já foram descritos polimorfismos nas posições 148 (Ala/Gli) onde ocorre a troca da alanina por glicina e 311 (Cis/Ser) substituição de cisteína por serina. Mais recentemente, dois outros polimorfismos da PON1 foram identificados, um na posição 102 (Leu/Val) e outro na posição 160 (Arg/Gli) (DRAGANOV e LA DU, 2004). Os polimorfismos afetam a atividade catalítica das aloenzimas da PON1, sendo que a alteração na cinética de hidrólise é dependente do tipo de substrato. De forma geral, o alelo 55M apresenta baixa atividade usando o paroxon como substrato e alta atividade na hidrólise de peróxidos lipídicos na LDL (MACKNESS e cols., 1998). O paroxon é hidrolisado mais eficientemente pela PON1-192 R (ADKINS e cols., 1993; HUMBERT e cols., 1993; DAVIES e cols., 1996; LI e cols., 2000; DRAGANOV e LA DU, 2004). Porém, em relação à hidrólise dos peróxidos lipídicos, o polimorfismo PON-192R é menos efetivo (AVIRAM e cols., 1998; MACKNESS e cols., 1998). Assim, o alelo PON-192R tem sido considerado um fator de risco independente e está positivamente associado com a DAC, conforme demonstrado por alguns estudos clínicos (SANGHERA e cols., 1997; ZAMA e cols., 1997, AUBÓ e cols., 2000). No entanto, outros autores não conseguiram demonstrar essa associação (ANTIKAINEN e cols., 1996; PFOHL e cols., 1999). Já a atividade catalítica da PON com o acetato de fenila como substrato não é influenciada pela variação genética (MACKNESS e cols., 1996; NAVAB e cols., 1997; LA DU, 1996).

A atividade sérica da PON1 está diminuída em indivíduos que tiveram infarto do miocárdio e em pacientes com diabetes mellitus tipo 1 e tipo 2 (MACKNESS e cols., 1991; ABBOTT e cols., 1995; JAMES e cols., 2000a; MACKNESS, 2000). Em pacientes diabéticos tipo 2 com DAC a diminuição da atividade da PON1 pode chegar a 40 % daquela observada em pacientes não diabéticos com DAC (HEDRICK e cols., 2000). Além disso, pacientes

diabéticos com complicações microvasculares, como neuropatia e nefropatia, apresentam PON1 com atividade inferior a dos diabéticos sem complicações (MACKNESS e cols., 2000). A atividade catalítica da PON pode estar relacionada, também, à concentração da enzima. Boemi e cols. (2001) demonstraram que as concentrações séricas da PON estão reduzidas em pacientes diabéticos tipo 1 e, inclusive, afetam a sua capacidade antioxidante, predispondo esses pacientes a maior lipoperoxidação e, conseqüentemente, ao risco aumentado de doença vascular. No entanto, a associação da atividade da PON com a DAC permanece ainda uma questão em aberto (McELVEEN e cols., 1986; SECCHIERO e cols., 1989; AYUB e cols., 1999).

Os polimorfismos da PON têm sido associados com a DAC em pacientes diabéticos, principalmente o PON1-192 (RUIZ e cols., 1995; ODAWARA e cols., 1997; PFOHL e cols., 1999). Mais recentemente, Hu e cols. (2003) demonstraram que o polimorfismo PON1-192 RR está associado ao espessamento da artéria carótida em pacientes diabéticos tipo 2. A frequência elevada do alelo R da PON1-192 tem sido reportada em pacientes diabéticos com doença macrovascular (HU e cols., 2003), doença cerebrovascular (KOCH e cols., 2001) e DAC (OSEI-HYIAMAN e cols., 2001). Complicações diabéticas, como retinopatia e oclusão da veia central da retina, também podem estar associadas com o alelo PON1-55L (KAO e cols., 1998) e PON1-192R (MURATA e cols., 1998), respectivamente. A variação no polimorfismo PON2 não está associada à presença do diabetes tipo 2 e, dessa forma, não pode ser interpretada como um agente causal. Entretanto, o PON2 pode ser um gene modificador de um considerável complexo de fenótipos relatados no DM2 (HEGELE e cols., 1997). Pinizzotto e cols. (2001) observaram que o polimorfismo PON2 311 está associado com a nefropatia diabética, independente de outros fatores de risco. Entretanto, os autores sugerem que o polimorfismo PON2 311 não está associado com a DAC (PINIZZOTTO e cols., 2001), apesar desse polimorfismo ter sido relacionado à DAC em pacientes não diabéticos (SANGHERA e cols., 1998; LEUS, e cols., 2001).

A associação do polimorfismo da PON com a concentração dos lipídeos e das lipoproteínas plasmáticas em pacientes diabéticos tem se mostrado inconsistente (ABBOT e cols., 1995; ODAWARA e cols., 1997; MACKNESS e cols., 2000; AGACHAN e cols., 2004).

A hiperglicemia é considerada uma das principais causas das complicações nos pacientes diabéticos. Assim, é de grande importância o conhecimento de variáveis que atuam

no controle da glicemia, como por exemplo, o polimorfismo da paroxonase. Mackness e cols. (2000), estudando o efeito de três polimorfismos da paroxonase, PON1-192, PON1-55 e PON2-310, em pacientes diabéticos observaram que existe uma associação entre o controle glicêmico e o polimorfismo da PON. Os pacientes com retinopatia portadores dos genótipos 192 RR, 55 MM e 310 CC apresentaram o pior controle glicêmico, mas pacientes sem complicações não foram afetados por esses genótipos (MACKNESS e cols., 2000). Além disso, Hegele e cols. (1997) também sugerem que o polimorfismo do gene G148 da PON2 está relacionado com o aumento da glicemia de jejum de pacientes com diabetes mellitus tipo 2. A hiperglicemia *per se*, sem alteração gênica, pode afetar a atividade da PON, a exemplo do que ocorre com outros fatores externos, como a injeção de LDL e fosfolipídeos oxidados que diminuem a atividade da PON em camundongos, aparentemente, por redução da síntese hepática da enzima (NAVAB e cols., 1997); o tabagismo, onde a menor atividade está relacionada à redução da concentração sérica (JAMES e cols., 2000b) e a ingestão de gordura oxidada (SUTHERLAND e cols., 1999).

2 JUSTIFICATIVA

A DAC é a mais importante manifestação clínica da aterosclerose e ainda é a principal causa de morte nas sociedades desenvolvidas. Os pacientes diabéticos apresentam risco elevado para o desenvolvimento da aterosclerose. Dos inúmeros fatores de risco, e suas modulações gênicas, envolvidos no processo aterosclerótico, especial ênfase tem sido dada ao estudo do polimorfismo da enzima paroxonase (PON) e sua atividade. A PON está associada às partículas de HDL e são responsáveis pelo efeito antioxidante conferido à HDL. Assim, o potencial protetor da HDL para a DAC pode não estar restrito apenas ao transporte reverso do colesterol, mas também à sua atividade antioxidante. A atividade da PON apresenta uma grande variação inter-individual devido ao controle genético. A base molecular para essa variação é o polimorfismo na região codificadora do gene resultando na substituição de aminoácidos com a conseqüente produção de aloenzimas. Os polimorfismos afetam a atividade hidrolítica da PON, modulam o controle glicêmico e estão envolvidos com a DAC em pacientes diabéticos. No entanto, existem poucos estudos abordando a associação entre os polimorfismos da PON, a atividade enzimática e alguns parâmetros bioquímicos considerados de risco em pacientes diabéticos sem DAC, particularmente na população brasileira. Hipotetizamos que, se os fatores genéticos podem agravar fenótipos clínicos em pacientes com diabetes mellitus, e desta forma contribuir para a expressão das complicações dessa patologia, a determinação dos genótipos e suas possíveis associações podem ter papel importante no prognóstico das complicações de pacientes com diabetes mellitus tipo 2.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Objetivo principal desse estudo foi avaliar a distribuição gênica e a frequência alélica dos polimorfismos PON1-192 e PON2-311 da enzima paroxonase e o efeito desses polimorfismos na atividade enzimática, no controle glicêmico e no perfil lipídico de pacientes diabéticos tipo 2 da grande Florianópolis e região sul de Santa Catarina.

3.2 Objetivos específicos

- a) Verificar a distribuição dos genótipos e a frequência relativa de alelos dos polimorfismos dos genes da enzima paroxonase PON1-192 e PON2-311 em indivíduos do grupo controle e pacientes diabéticos tipo 2;
- b) Determinar a atividade enzimática da enzima paroxonase no soro dos pacientes diabéticos tipo 2 e indivíduos do grupo controle;
- c) Avaliar o perfil glicêmico dos participantes do estudo, através das determinações da glicemia de jejum, insulina e hemoglobina glicada, e a sua associação com os polimorfismos PON1-192 e PON2-311;
- d) Verificar o efeito dos polimorfismos PON1-192 e PON2-311 na atividade da enzima paroxonase no soro dos indivíduos do grupo controle e pacientes diabéticos tipo 2;
- e) Determinar a concentração dos lipídeos e lipoproteínas séricas e o efeito dos polimorfismos nesse perfil lipídico.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes

Os reagentes para as determinações laboratoriais do perfil lipídico e glicose foram gentilmente doados pelo laboratório Roche-Brasil (São Paulo, SP). Triton X-100, cloreto de sódio, cloreto de potássio, etanol absoluto, isopropanol, metanol, clorofórmio, fenol, ácido acético glacial, azul de bromofenol foram da MERCK S.A. (Rio de Janeiro, RJ). Hidróxido de sódio, sulfato de dodecil sódico (SDS), ácido bórico, EDTA, Tris (hidroximetil) aminometano ultrapuro, agarose ultrapura, enzimas de restrição MboI e Nla III (Sinapse-Fermentas, EUA), Dde I (BioLabs Inc, New England, EUA). Os marcadores de tamanho molecular de DNA e os diferentes iniciadores (oligonucleotídeos específicos) foram adquiridos da Gibco BRL, Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD, E.U.A.); Taq DNA polimerase, solução de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), e brometo de etídeo da Amershan Pharmacia Biotech, Inc. (Uppsala, Suécia). O papel térmico de alto contraste foi obtido da Apha Innotech Corporation (EUA). O paroxon (dietil p-nitrofenil fosfato), o acetato de fenila e o cloreto de magnésio foram obtidos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

4.2 Casuística

4.2.1 Grupo Diabético

O grupo diabético foi constituído por sessenta e um pacientes caucasianos, sem vínculo familiar, de ambos os sexos, com diagnóstico clínico e laboratorial de diabetes mellitus tipo 2 de acordo com os critérios do Consenso Brasileiro sobre Diabetes (glicemia de jejum ≥ 126 mg/dL em duas ocasiões), realizado previamente. Os pacientes são oriundos de Postos de Saúde da Grande Florianópolis (Córrego Grande e Picadas do Sul), Tubarão (Deon, UNISUL) e Turvo, e participam do Programa HIPERDIA do Ministério da Saúde.

4.2.2 Grupo Controle

O grupo controle foi constituído por oitenta e dois indivíduos caucasianos, normoglicêmicos (glicemia de jejum < 110 mg/dL, segundo o Consenso Brasileiro sobre Diabetes), de ambos os sexos e sem histórico familiar de diabetes ou doença arterial

coronariana. Os participantes foram voluntários selecionados pelo corpo clínico dos Postos de Saúde citados.

4.2.3 Critérios de exclusão:

Segundo os registros clínico-laboratoriais existentes nos postos de saúde, os indivíduos ou pacientes que apresentaram doença arterial coronariana, doenças da glândula tireóide, doenças renais, doença hepática, neoplasias, doenças inflamatórias ou estavam em uso de medicamentos hipolipemiantes ou hormonais foram excluídos do estudo.

Todos os participantes foram voluntários e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (anexo A). O presente protocolo de estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (anexo B).

Os resultados do questionário aplicado aos participantes, bem como os resultados laboratoriais (parâmetros bioquímicos) encontram-se registrados em formulário padrão conforme exemplo no anexo C.

4.2.4 Amostras biológicas

As amostras de sangue (15 mL) dos indivíduos e pacientes foram coletadas de veia periférica, após jejum de 10-12h no período da manhã, em tubos com ou sem anticoagulantes (EDTA a 1 mg/mL e fluoreto de sódio) por meio de sistema a vácuo (Vacutainer®). O sangue foi centrifugado a 2500 rpm (1050 x g) por 10min em centrífuga CELM modelo LS 35 (Celm Ind, São Paulo, Brasil) para a obtenção do plasma e do soro. O sangue colhido com EDTA foi utilizado para a extração do DNA das células sanguíneas e para a determinação da hemoglobina glicada HbA_{1c} (HPLC - Variant-II Bio Rad). O plasma obtido do sangue colhido com fluoreto de sódio foi utilizado para a determinação da glicose, enquanto que os parâmetros do perfil lipídico e a atividade da enzima paroxonase foram realizados no soro.

4.3 Métodos

4.3.1 Determinações bioquímicas

As concentrações séricas de colesterol total (CT) e de colesterol da HDL (HDL-C) foram determinadas pelo método enzimático-colorimétrico CHOD/PAP (Roche, São Paulo,

SP). O HDL-C foi determinado pelo método homogêneo. (Roche, São Paulo, SP). A concentração de colesterol da LDL (LDL-C) foi obtida através da equação de Friedewald: $LDL-C = \text{Colesterol Total} - (\text{HDL-C} + \text{TG}/5)$, quando o conteúdo de triglicerídeos apresentava-se inferior a 400 mg/dL, e a concentração de colesterol da VLDL (VLDL-C) foi obtida pela divisão da concentração sérica de triglicerídeos por cinco (FRIEDEWALD e cols., 1972). A concentração sérica de triglicerídeos (TG) foi determinada pelo método enzimático colorimétrico GPO/PAP (Roche, São Paulo, SP). A concentração de glicose foi determinada pelo método glicose-oxidase/peroxidase (Roche, São Paulo, SP). Todas as determinações foram realizadas no analisador automático COBAS MIRA PLUS (Hoffmann-La Roche, Basileia, Suíça) no Laboratório de Análises Clínicas da Unisul.

A quantificação da hemoglobina glicada HbA1c foi realizada no Laboratório Médico Santa Luzia (Florianópolis, SC) através do método de troca iônica por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC; Variant II – BIO-RAD, EUA), considerado método padrão pelo National Glycohemoglobin Standardization Program e pelo Grupo Interdisciplinar de Padronização da Hemoglobina Glicada (SBPC-2003), com valores de referência de 4 a 6 %. A insulina foi determinada por imunoensaio de eletroquimioluminescência (ECLIA) (Elecsys 1010 – Roche, São Paulo, SP), com valores de referência de 3 a 17 $\mu\text{U/mL}$.

4.3.2 Atividade Enzimática da Paroxonase (PON)

4.3.2.1 Atividade arilesterase no soro total e na partícula de HDL isolada

A atividade arilesterase da enzima paroxonase foi determinada no Laboratório de Pesquisa em Lipídeos, Lipoperoxidação e Antioxidantes (Prof. Dr. Edson L. da Silva) de acordo com o método descrito por Gan e cols. (1991). A reação foi iniciada pela adição de 20 μL de soro ou HDL (ambos diluídos 20 vezes) em 2 mL de tampão Tris HCl 20 mmol/L, pH 8,0, contendo CaCl_2 1 mmol/L e acetato de fenila 1 mmol/L. A cinética da reação de formação do fenol foi monitorada com leituras da absorbância a cada minuto, durante 3min, em comprimento de onda de 270 nm, a 25 °C (Espectrofotômetro Spectrum 2000 UV/VIS, EUA). Para corrigir a hidrólise espontânea do acetato de fenila foi incluído um branco da reação. Para o cálculo da atividade foi considerado o coeficiente de absorvidade molar de $1,31 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. O resultado foi expresso em U/mL, sendo que uma unidade da arilesterase corresponde a 1 μmol de acetato de fenila hidrolisado por minuto, por mL de soro (GAN e cols., 1991).

A HDL utilizada nas reações foi isolada por precipitação seletiva das lipoproteínas contendo apolipoproteína B (BURSTEIN e cols., 1970), utilizando-se a mistura de ácido fosfotúngstico e íons magnésio (1,5 mM e 54 mM, respectivamente). A mistura de soro e solução precipitante (1:1, v/v) foi agitada por 30s em agitador tipo vórtex e centrifugada a 3500 rpm durante 15min. A HDL presente no sobrenadante límpido foi dialisada em tampão PBS pH 7,4 por 12h, a 4 °C (membrana com porosidade de 12000-14000 Da, Spectrum - Gardena - EUA).

4.3.2.2 Análise da atividade paroxonase da enzima paroxonase no soro total

A atividade paroxonase foi avaliada no Laboratório de Pesquisa em Lipídeos, Lipoperoxidação e Antioxidantes (Prof. Dr. Edson L. da Silva) conforme metodologia descrita anteriormente (ABBOTT e cols.,1995). O soro foi incubado com 5 µmol/L de eserine (v/v) por 10min à temperatura ambiente. A velocidade de formação do p-nitrofenol foi monitorada através das leituras da absorbância em 405 nm, a 37 °C, durante 3min (Cobas Mira Plus, Roche). A reação foi iniciada pela adição de 12,5 µL de soro em 250 µL tampão Tris HCl 20 mmol/L, pH 8,0, contendo CaCl₂ 1 mmol/L e paroxon 5,5 mmol/L. A atividade foi calculada utilizando-se o coeficiente de absorvidade molar de 18,05 x 10³ M⁻¹.cm⁻¹. A atividade da paroxonase, expressa em U/L, é definida como a formação de 1 µmol de p-nitrofenol por minuto, por litro de soro.

4.3.3 Técnicas Moleculares

4.3.3.1 Extração do DNA genômico

O DNA genômico foi extraído a partir dos leucócitos sanguíneos pelo método de precipitação salina modificado por Salazar e cols. (1998). As amostras de sangue (1000 µL) foram submetidas à lise celular com 900 µL de tampão Tris-1 (Tris-HCl a 10 mM pH 8,0, KCl a 10 mM, MgCl₂ a 10 mM, EDTA a 2 mM pH 8,0) contendo Triton X-100 a 2,5 %. Após centrifugação, os núcleos celulares foram lisados com 220 µL do tampão Tris-2 (Tris-HCl a 10 mM pH 8,0, KCl a 10 mM, MgCl₂ a 10 mM, EDTA a 2 mM pH 8,0, NaCl a 400 mM) contendo SDS a 1 %. As proteínas foram removidas por precipitação salina com 100 µL de NaCl 5M. O DNA presente no sobrenadante foi isolado e purificado por precipitação etanólica e, finalmente, ressuspendido em 100 µL do tampão TE (Tris-HCl a 10 mM e EDTA

a 1 mM, pH 8,0) e mantido a -20°C . Os ensaios foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular do Prof. Dr. Carlos Frederico Tourinho dos Santos da Unisul – Palhoça, SC.

4.3.3.2 Avaliação eletroforética e quantificação do DNA genômico

A integridade das amostras do DNA extraído foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE (Tris-HCl a 90 mM, ácido bórico a 90 mM e EDTA a 2 mM) em cuba eletroforética (Gibco BRL, Life Technologies Inc. Gaithersburg, MD, EUA) (SAMBROOK e cols., 1989). O gel foi imerso em tampão TBE, e as amostras contendo 5 μL do DNA e 2 μL do tampão de amostra (azul de bromofenol a 0,25%, xilenocianol FF a 0,25% e glicerol a 30%) foram aplicadas. Aplicaram-se também 5 μL do marcador de tamanho molecular de DNA de 1 kb diluído no tampão de amostra 1:6 (v/v). A separação eletroforética foi realizada a 100 V, por 45min, utilizando fonte modelo EPS 200 (Pharmacia LKB, Uppsala, Suécia). Após a eletroforese, as bandas de DNA foram visualizadas em transiluminador modelo Macrovue (Pharmacia LKB, Uppsala, Suécia), sob luz UV, após coloração do gel com brometo de etídeo (0,5 mg/L). Os resultados foram documentados com o sistema fotográfico Polaroid modelo DS 34 (Cambridge, EUA). Esse e todos os demais ensaios relativos às técnicas de biologia molecular foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular da FCF-USP, sob orientação do Prof. Dr. Mário Hiroyuki Hirata.

A quantificação e análise do grau de pureza (relação A_{260}/A_{280} = Absorbância em 260 e 280 nm, respectivamente) dos extratos de DNA foram realizadas em espectrofotômetro Beckman DU 640 (Fullerton, CA, EUA), após diluição das amostras (1:50 v/v) em tampão TE, pH 8,0 (SAMBROOK e cols., 1989).

4.3.3.3 Análise dos polimorfismos dos genes da paroxonase PON1-192 e PON2- 311

A genotipagem dos polimorfismos da PON1-192 (R/Q) e PON2-311 (S/C) foi realizada pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase seguida pela análise do polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (PCR-RFLP). Os iniciadores utilizados na reação de PCR foram selecionados com base em dados previamente publicados e nas informações do Banco de Dados do “*National Institute of Health*” (National Institute of Health, 2003) e produzidos pela Life Technologies do Brasil (SP, Brasil). A homologia das seqüências dos iniciadores para cada região polimórfica foi estudada empregando-se o programa BLAST. As seqüências dos iniciadores específicos de cada polimorfismo e os

tamanhos de fragmentos amplificados são apresentados no Quadro 1.

Quadro 1 – Seqüência de iniciadores dos polimorfismos estudados

Gene	Seqüência de iniciadores		Fragmento
PON1-192	Sense	5'-CCATTATAGCTAGCACGAAGGC-3'	331 pb
	Antisense	5'-GCCATCGGGTGAAATGTTGA-3'	
PON2-311	Sense	5'-GTTAAGTTATCGCACTTTGATGC-3'	294 pb
	Antisense	5'-CCTTAATCAGTGTGTCATTGTGG-3'	

A amplificação dos genes PON1-192 e PON2-311 foi realizada utilizando-se o seguinte protocolo: 1 µL (~100 ng) da solução de DNA genômico, 5 µL de tampão da reação de PCR (Tris-HCl 10 mM, pH 9,0; KCl 50 mM; MgCl₂ 2,5 mM e (NH₄)₂SO₄ 20 mM), 50 µM de cada deoxinucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 100 pM de cada iniciador, 1 U da enzima Taq polimerase e água deionizada esterilizada para volume final de 50 µL. Os tubos foram homogeneizados e colocados no termociclador PTC-200 (MJ Research, Watertown, MA, EUA), com condições de temperatura diferentes para cada sistema, como descrito a seguir. Todos os dois sistemas tiveram trinta e cinco ciclos. Para o polimorfismo PON1-192 seguiu-se o seguinte protocolo: desnaturação inicial (hot start): 98 °C por 3min; amplificação: 94 °C por 1min (desnaturação), 55 °C por 2min (hibridação) e 72 °C por 1min (extensão); extensão final: 72 °C por 10min. Ao final a reação foi interrompida por esfriamento a 4 °C. Para o polimorfismo PON2-311: desnaturação inicial (hot start): 98 °C por 3min; amplificação: 94 °C por 1min (desnaturação), 52 °C por 1min (hibridação) e 72 °C por 1min (extensão); extensão final: 72 °C por 10min. Ao final, a reação foi interrompida por esfriamento a 4 °C.

Os produtos de PCR foram avaliados em gel de agarose 2,0 % em tampão TBE, utilizando-se uma cuba eletroforética horizontal da Gibco BRL (Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD, EUA). Foram aplicados 7 µL do produto de PCR diluído em 1µL de tampão de amostra (azul de bromofenol 0,25 %, xilenocianol FF 0,25 % e glicerol 30 %) e 5 µL do marcador do tamanho molecular de DNA de 100 pares de bases (bp) diluído também no tampão de amostra em 1:6 (v/v). A separação eletroforética foi realizada a 100 V por 45min, utilizando-se fonte de energia da Pharmacia LKB modelo EPS200 (Uppsala, Suécia).

Em seguida, o gel foi corado com brometo de etídeo (0,5 mg/L) por 10min e as bandas eletroforéticas foram visualizadas sob luz UV em trans-iluminador Pharmacia LKB Macrouve (Uppsala, Suécia). O gel foi fotografado empregando o sistema de captura de imagens Multimagen Light Cabinet (Alpha Innotech Co., EUA) e o tamanho das bandas dos produtos de PCR foi analisado em relação ao do marcador de DNA empregando-se o programa de análise de imagens Chemilmager 4400 v 5.5 (Alpha Innotech Co, EUA). Os produtos de PCR foram armazenados a -20°C até a análise por RFLP.

4.3.3.4 Reação de restrição dos produtos de PCR

Para a análise dos polimorfismos genéticos da paroxonase, os produtos de PCR específicos foram digeridos com as enzimas de restrição *MboI* e *DdeI*. A enzima *MboI* foi utilizada na pesquisa do polimorfismo PON1-192, com o seguinte protocolo: 1 μL de tampão de reação, 8,9 μL de produto de PCR e 1 U da enzima para volume final 10 μL . A enzima *DdeI* foi utilizada na pesquisa do polimorfismo PON2-311: 1 μL de tampão, 2,5 U da enzima e 8,25 μL do produto de PCR, para volume final de 10 μL . Ambos os sistemas foram incubados a 37°C , por 2h, para posterior análise dos fragmentos de restrição.

4.3.3.5 Análise dos fragmentos de restrição

Os produtos de digestão enzimática dos polimorfismos PON1-192 e PON2-311 foram identificados em gel de agarose 1 %. Foram aplicados 10 μL do produto de restrição contendo 3 μL do tampão de amostra. Foram aplicados também 3 μL de marcador de tamanho molecular de DNA de 50 ou 100 pb diluído em tampão de amostra 1:6 (v/v). A separação eletroforética foi realizada a 100 V durante 45min. O gel de agarose foi corado com brometo de etídeo e documentado, conforme previamente descrito. Após a separação eletroforética, observou-se a presença dos fragmentos de diferentes tamanhos, de acordo com cada polimorfismo: i) Para o polimorfismo PON1-192, o genótipo RR foi caracterizado pela presença dos fragmentos 181, 122 e 28 pb; homozigotos QQ: 181 e 150 pb e heterozigotos RQ: 181, 150, 122 e 28 pb; ii) Para o polimorfismo PON2-311, a presença dos fragmentos 129, 98, 67 pb indica o genótipo CC; a presença de fragmentos de 196 e 98 pb indica o genótipo SS e de fragmentos de 196, 129, 98 e 67 pb caracteriza o genótipo CS.

4.3.4 Controle de Qualidade das análises bioquímicas e moleculares

As determinações de colesterol total, triglicerídeos, HDL-Colesterol e glicose foram realizadas em paralelo com soros controle com valores baixo e alto (Precinorm e Precipath, respectivamente, Roche - SP).

As amplificações realizadas pela técnica de PCR foram monitoradas utilizando-se o controle de reagentes (tubo no qual são adicionados todos os reagentes para a amplificação, exceto a amostra de DNA) em cada conjunto de reações. Esse controle visa detectar possíveis contaminações dos reagentes de PCR por ácidos nucleicos ou produtos de PCR. Também foram repetidas de forma aleatória 10 % de todas as reações de amplificação.

As reações de restrição enzimática foram monitoradas utilizando-se controle positivo, que consiste na análise de uma amostra de genótipo homozigótico para a presença do sítio de restrição em estudo, evitando-se interpretações errôneas dos genótipos por digestão parcial dos produtos de PCR com a enzima de restrição (ICCMB, 1999). Além disso, outra forma de controlar a qualidade da identificação dos genótipos foi a interpretação por dois analistas separadamente.

4.3.5 Análise estatística

Os resultados são apresentados com média \pm desvio padrão (DP). A distribuição das frequências gênica e dos alelos foi avaliada pelo teste de qui-quadrado χ^2 (BEIGUELMAN, 1995). As diferenças inter e intragrupos foram determinadas utilizando-se os testes de análise de variância (ANOVA) e teste complementar de Dunn. Os valores que não apresentaram distribuição normal foram submetidos à transformação logarítmica. Persistindo a distribuição não gaussiana, as diferenças foram avaliadas pelos testes de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis. Para a análise de correlação foi utilizado o teste de Spearman. O nível de significância considerado foi de 95 % ($p < 0,05$). Todas as análises foram realizadas com o auxílio do programa Sigma Stat para Windows, versão 2.0 da Jandel Scientific (Sigma Co., EUA).

5 RESULTADOS

5.1 Características biodemográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes diabéticos e indivíduos do grupo controle.

A população estudada foi composta de oitenta e dois indivíduos normoglicêmicos (grupo controle) e sessenta e um pacientes diabéticos (grupo diabético). Não houve diferença significativa na distribuição de participantes do sexo masculino ou feminino entre os dois grupos ($p > 0,05$; Tabela 1). No entanto, em ambos os grupos o percentual de mulheres foi aproximadamente duas vezes superior ao percentual de homens ($p < 0,05$). Os pacientes diabéticos apresentaram idade e índice de massa corporal (IMC) superiores aos participantes do grupo controle ($p < 0,05$). Além disso, os valores de IMC indicaram a presença de maior percentual de pacientes obesos ($IMC > 30 \text{ kg/m}^2$) no grupo diabético (44,2 vs 14,6 %; $p < 0,05$). Ao contrário, no grupo diabético o percentual de pacientes com hipertensão arterial (PA $> 135/80 \text{ mmHg}$ segundo IV Diretrizes Brasileira de Hipertensão Arterial) (MION e cols, 2004) e fumantes foi significativamente menor quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$; Tabela 1).

Tabela 1 - Dados biodemográficos e características clínicas dos pacientes diabéticos e indivíduos do grupo controle.

	Grupos	
	Controle (n = 82)	Diabético (n = 61)
Gênero		
Feminino	53 (64,6 %) **	42 (68,8 %) **
Masculino	29 (35,4 %)	19 (31,2 %)
Idade (anos)	57,2 ± 13,3	61,7 ± 10,0 *
IMC (kg/m²)	26,45 ± 3,92	29,38 ± 5,50 *
IMC (> 30 kg/m²)	12 (14,6 %)	27 (44,2 %) *
Hipertensos	39 (47,6 %)	18 (29,5 %) *
Fumantes	09 (11,0 %)	03 (4,9 %) *
Ex-fumantes	16 (19,5 %)	20 (32,8 %) *

Os valores estão expressos como média ± desvio-padrão. IMC, Índice de Massa Corporal; * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle; ** $p < 0,05$ comparado ao sexo masculino (teste t de Student e teste χ^2).

Os resultados dos ensaios laboratoriais relacionados ao controle glicêmico dos participantes de ambos os grupos estão mostrados na Tabela 2. Os pacientes diabéticos apresentaram valores de glicemia em jejum e insulina superiores aos dos indivíduos do grupo controle ($p < 0,01$). Os níveis de hemoglobina glicada (HbA_{1c}) nos pacientes diabéticos foram de $7,8 \pm 2,1 \%$, aproximadamente 1 ponto percentual acima do limite superior de 7% , conforme sugerido pelos estudos clínicos e randomizados “Diabetes Control and Complication Trial” (DCCT) e “United Kingdom Prospective Diabetes Study” (UKPDS).

Tabela 2 - Concentrações séricas de glicose, insulina e hemoglobina glicada (HbA_{1c}) nos participantes dos grupos controle e diabético.

	Grupos		p
	Controle	Diabético	
Glicose (mg/dL)**	91,7 ± 10,4 (n = 82)	157,4 ± 60,8 (n = 61)	0,001
Insulina (μU/mL) *	6,6 ± 11,6 (n = 50)	14,6 ± 18,1 (n = 61)	0,001
HbA_{1c} (%)	N.D.	7,8 ± 2,1	-

Os valores estão expressos como média ± desvio-padrão. n = número de participantes. N.D. = não determinado. * Teste de Mann-Whitney. ** Teste *t* de Student. A variável glicose sofreu transformação logarítmica.

Os resultados das determinações laboratoriais do perfil lipídico dos participantes estão apresentados na Tabela 3. As concentrações de colesterol total e de colesterol da lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) não apresentaram diferenças significativas entre os dois grupos estudados. Entretanto, concentrações elevadas de triglicerídeos e VLDL-C foram observadas nos pacientes diabéticos em relação aos participantes do grupo controle ($p < 0,05$). As concentrações de colesterol da lipoproteína de alta densidade (HDL-C) dos pacientes diabéticos foram significativamente inferiores aos do grupo controle ($p < 0,01$).

Tabela 3 - Concentrações séricas de lipídeos e lipoproteínas dos pacientes do grupo diabético e indivíduos do grupo controle.

Parâmetros (mg/dL)	Grupos		
	Controle (n = 82)	Diabético (n = 61)	p
Colesterol total *	202,91 ± 25,84	212,21 ± 38,19	0,299
Triglicerídeos **	156,66 ± 94,08	203,05 ± 99,91	0,001
HDL-C **	51,73 ± 12,56	46,43 ± 13,25	0,005
LDL-C *	119,85 ± 23,80	125,15 ± 35,22	0,888
VLDL-C **	31,33 ± 18,82	40,61 ± 19,98	0,001

Os valores estão expressos como média ± desvio-padrão. n = número de participantes; HDL-C, colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-C, colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-C, colesterol da lipoproteína de densidade muito baixa. * Teste de Mann-Whitney. ** Teste *t* de Student (os valores dessas variáveis sofreram transformação logarítmica).

5.2 Determinação das Atividades Enzimáticas da Paroxonase (PON): Atividade arilesterase e atividade paroxonase

Considerando que o substrato fisiológico para a PON não é conhecido, a atividade da enzima foi determinada nas amostras de soro e de HDL dos participantes, utilizando-se dois diferentes substratos: acetato de fenila (atividade arilesterase) e paroxon (atividade paroxonase). A atividade arilesterase apresentou correlação positiva com a atividade paroxonase no soro ($r = 0,391$; $p < 0,05$; Figura 1). Além disso, a análise de correlação mostrou que existe correlação positiva também entre a atividade arilesterase sérica e a atividade arilesterase nas partículas de HDL isoladas por precipitação das lipoproteínas contendo apolipoproteína B ($r = 0,519$; $p < 0,05$; Figura 2).

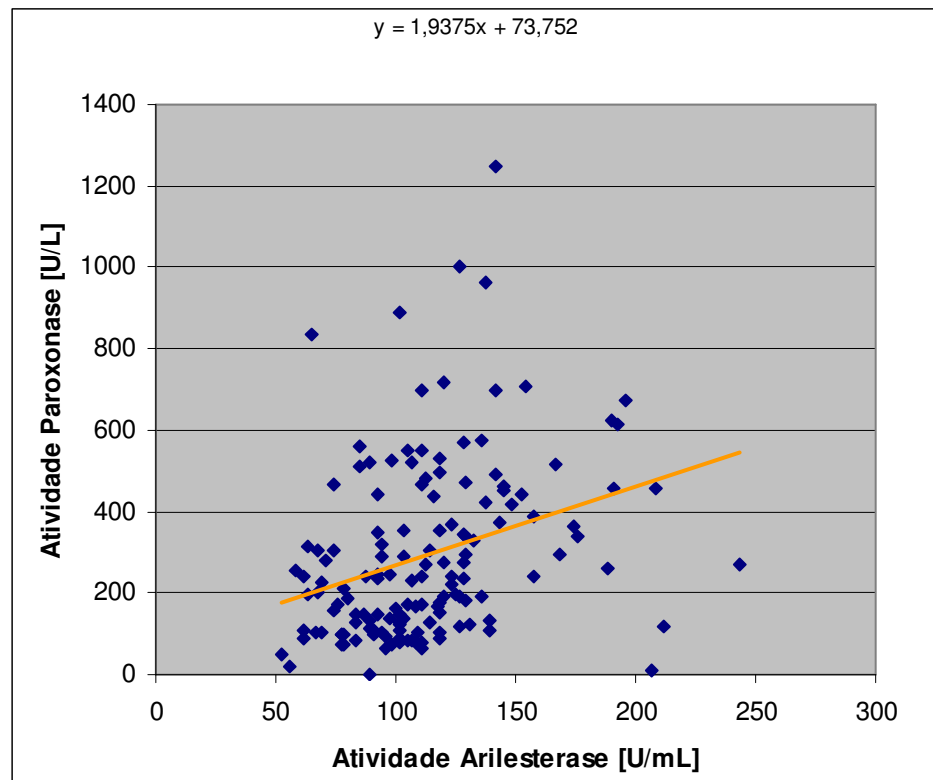


Figura 1 - Atividades paroxonase e arilesterase da PON no soro de todos os participantes do estudo (n = 143). Correlação de Spearman, $r = 0,391$ $p < 0,05$.

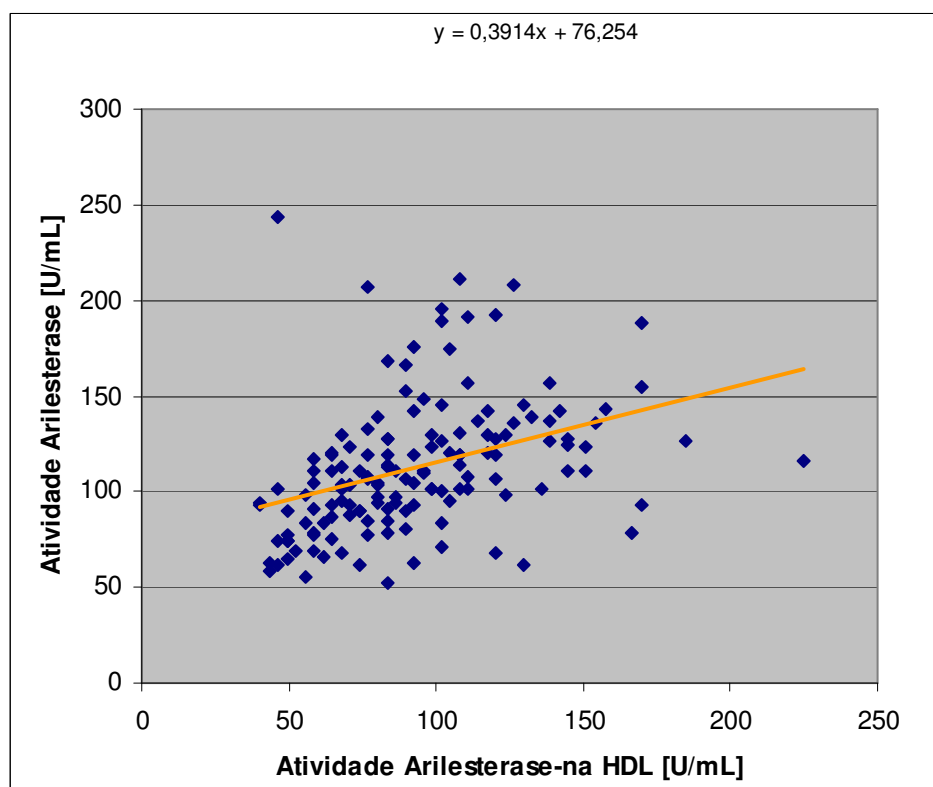


Figura 2 - Atividade arilesterase da PON no soro e nas partículas de HDL de todos os participantes do estudo (n = 143). Correlação de Spearman, $r = 0,519$; $p < 0,05$.

No entanto, não houve associação entre a atividade arilesterase da PON nas partículas de HDL e a concentração de HDL-C, tanto nos indivíduos do grupo controle como nos pacientes diabéticos. A Figura 3 mostra os resultados de ambos os grupos combinados.

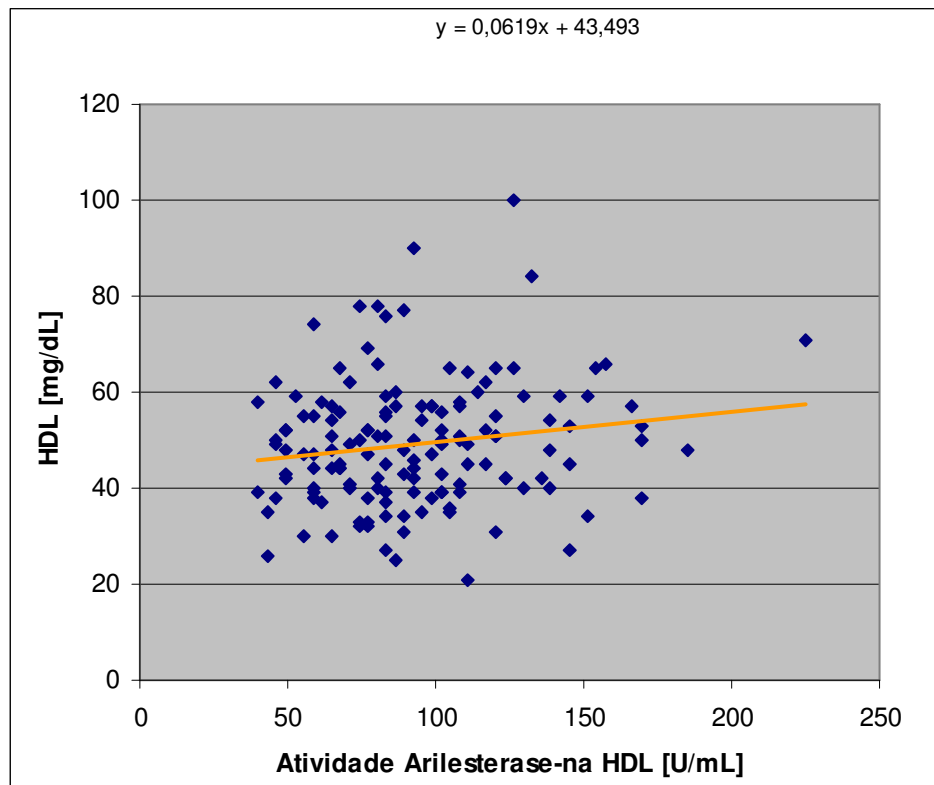


Figura 3 - Atividade arilesterase na HDL e concentração de HDL colesterol de todos os participantes do estudo (n = 143). Correlação de Spearman, $r = 0,144$; $p > 0,05$.

Os resultados dos ensaios demonstraram que as atividades arilesterase e paroxonase no soro dos pacientes diabéticos não foram estatisticamente diferentes das atividades séricas nos indivíduos do grupo controle (Figura 4).

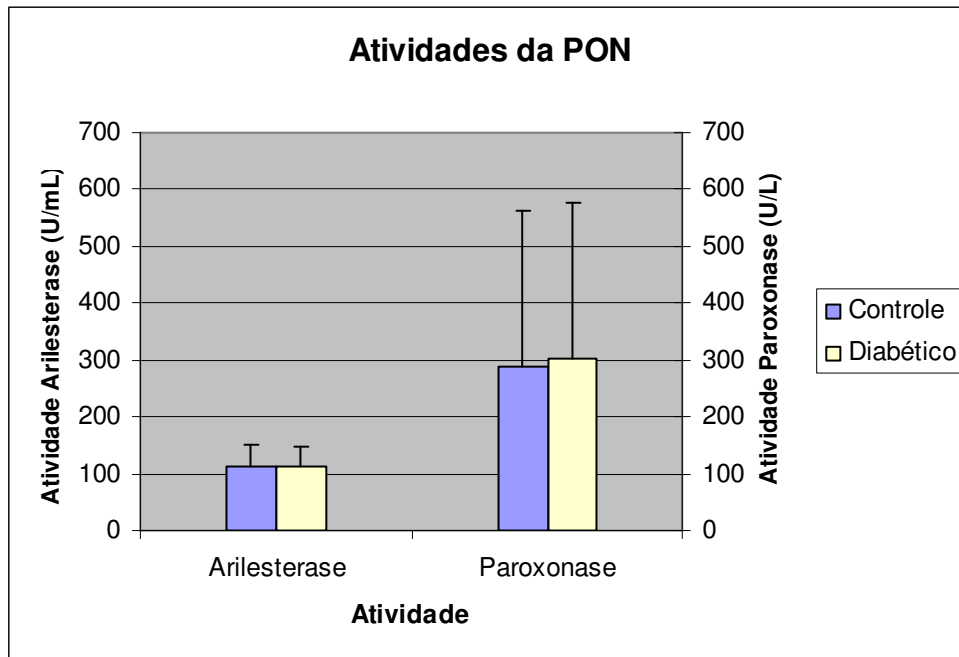


Figura 4 - Atividades paroxonase e arilesterase da enzima paroxonase no soro de indivíduos do grupo controle e de pacientes diabéticos. Os resultados estão expressos como média \pm desvio-padrão. Grupo controle, $n = 82$; grupo diabético, $n = 61$; U = unidade de enzima: quantidade de enzima que hidrolisa 1 μmol de acetato de fenila por minuto, por mililitro de soro (atividade arilesterase) ou 1 μmol de paroxon por minuto, por litro de soro (atividade paroxonase). Não houve diferença significativa entre os grupos (Testes t de Student e Mann-Whitney).

Considerando a influência do hábito de fumar na atividade da paroxonase, os participantes de ambos os grupos de estudo foram estratificados em fumantes, ex-fumantes e não fumantes e a atividade da PON foi avaliada. O percentual de não fumantes foi semelhante nos dois grupos (controle: 70 % vs diabético: 62 %; $p > 0,05$). No entanto, o percentual de fumantes e ex-fumantes no grupo diabético foi de 5 % e 33 %, respectivamente, contra 11 % e 19 %, respectivamente, no grupo controle ($p < 0,05$). Os resultados da atividade paroxonase não foram diferentes entre fumantes, ex-fumantes e não fumantes do grupo controle em comparação com o grupo diabético (Tabela 4). Também não houve diferença intra-grupo, embora os fumantes de ambos os grupos apresentassem tendência a menores atividades ($p = 0,07$). Quando os valores dos dois grupos foram combinados foi possível detectar a diferença estatística na menor atividade dos fumantes ($p < 0,05$). O tabagismo afetou a atividade arilesterase da PON nos indivíduos do grupo controle. A atividade sérica arilesterase, nos indivíduos não fumantes do grupo controle, foi maior em comparação com os indivíduos ex-fumantes e fumantes ($p < 0,05$). No entanto, a atividade arilesterase no soro dos indivíduos do

grupo controle não foi diferente daquela dos pacientes diabéticos, independente do hábito de fumar.

Tabela 4 - Atividades paroxonase e arilesterase da PON no soro dos indivíduos do grupo controle e pacientes diabéticos.

	Fumantes	Ex-fumantes	Não fumantes
<i>Paroxonase (U/L)</i>			
Controle	226,9 ± 162,7 (n = 9)	220,1 ± 152,6 (n = 16)	315,4 ± 210,3 (n = 57)
Diabético	180,9 ± 69,2 (n = 3)	215,9 ± 129,1 (n = 20)	359,5 ± 283,1 (n = 37)
Todos	203,9 ± 143,4 (n = 12)	218,0 ± 137,5 (n = 35)	332,6 ± 240,8 * (n = 94)
<i>Arilesterase (U/mL)</i>			
Controle	103,5 ± 23,7 (n = 9)	99,5 ± 29,3 (n = 16)	119,5 ± 37,3 * (n = 57)
Diabético	119,2 ± 8,5 (n = 3)	110,7 ± 41,0 (n = 20)	111,1 ± 34,2 (n = 38)

Os resultados estão expressos como média ± desvio-padrão. n = número de participantes. *p < 0,05 comparado aos indivíduos ex-fumantes e fumantes (Mann-Whitney).

5.3 Avaliação dos Polimorfismos PON1-192 e PON2-311 do gene da Paroxonase e Distribuição dos Genótipos e da Freqüência Alélica

5.3.1 Análise dos fragmentos de restrição do polimorfismo PON1-192

A identificação dos genótipos do polimorfismo PON1-192 foi realizada pela análise dos fragmentos de restrição após digestão com a enzima *Mbo I*, (Figura 5). O genótipo RR foi caracterizado pela presença de fragmentos com 28, 122, e 181 pb. O genótipo heterozigoto RQ foi identificado pela presença de fragmentos com 28, 122, 150 e 181 pb e o genótipo homozigoto QQ pelos fragmentos com 150 e 181 pb.

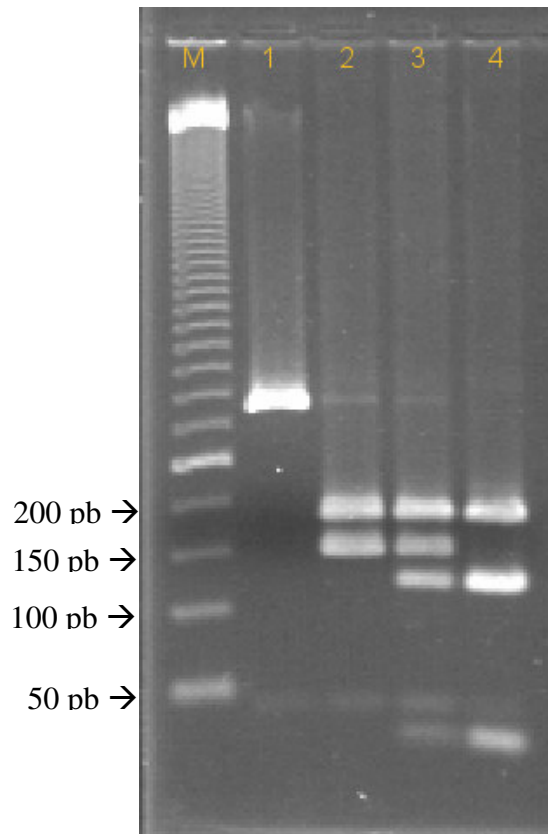


Figura 5 - Produtos de restrição enzimática com *Mbo I* da região polimórfica do gene PON1-192, detectados em gel de agarose a 1%. Coluna M, marcador de tamanho molecular de DNA de 50 bp; coluna 1, produto de PCR; coluna 2, genótipo QQ; coluna 3, genótipo RQ e coluna 4, genótipo RR.

5.3.2 Distribuição dos genótipos e frequência alélica do polimorfismo PON1-192

A distribuição dos genótipos e a frequência relativa dos alelos do polimorfismo PON1-192 da enzima paroxonase, avaliada pelo teste do qui-quadrado (χ^2), mostraram que o genótipo QQ foi o mais comum nos indivíduos dos grupos controle e diabético (50,0 e 47,5 %, respectivamente), seguido pelo RQ (39,0 e 44,3, respectivamente) e pelo de menor frequência RR (11,0 e 8,2 %, respectivamente). Assim, o alelo Q foi o mais frequente (70,0 %) em ambos os grupos. Não houve diferença significativa na distribuição de genótipos e frequência de alelos entre os pacientes diabéticos e indivíduos controle ($p > 0,05$, teste χ^2), (Tabela 5).

Tabela 5 - Distribuição dos genótipos e frequência relativa de alelos para o polimorfismo PON1-192 nos indivíduos dos grupos controle e diabético.

Grupos	Genótipos (%)			Frequência Alélica	
	QQ	RQ	RR	Q	R
Controle n = 82	50,0	39,0	11,0	0,70	0,30
Diabético n = 61	47,5	44,3	8,2	0,70	0,30

Não houve diferença significativa. Distribuição de genótipos: $\chi^2 = 0,552$ (2 gl, $p = 0,759$). Frequência alélica: $\chi^2 = 0,001$ (1 gl, $p = 0,977$).

5.3.3 Análise dos fragmentos de restrição do polimorfismo PON2-311

Para a pesquisa do polimorfismo PON2-311 foi utilizada a digestão com a enzima *Dde I* e os produtos de restrição enzimática estão mostrados na Figura 6.

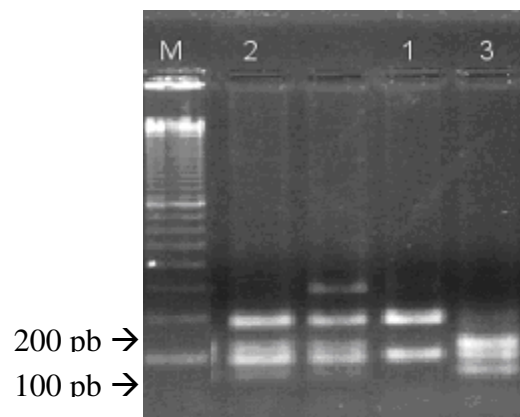


Figura 6 - Produtos de restrição enzimática com *Dde I* da região polimórfica do gene PON2-311. Coluna M, marcador de tamanho molecular de DNA de 100 bp; coluna 1, genótipo SS; coluna 2, genótipo CS e coluna 3, genótipo CC.

Na presença do sítio de restrição para *Dde I*, a presença dos fragmentos 67, 98 e 129 pb indica genótipo CC. A presença de fragmentos de 98 e 196 pb indica genótipo SS, e os fragmentos de 67, 98, 129 e 196 pb caracterizam o genótipo SC.

5.3.4 Distribuição dos genótipos e frequência alélica do polimorfismo PON2-311

A distribuição dos genótipos e a frequência relativa dos alelos do polimorfismo PON2-311 nos indivíduos do grupo controle e nos pacientes diabéticos estão apresentados na Tabela 6. A frequência dos genótipos CC, SC e SS nos indivíduos do grupo controle foi de aproximadamente 6, 24 e 70 %, respectivamente, e aproximadamente 3, 39 e 57 % nos

pacientes diabéticos, respectivamente. A frequência relativa dos alelos C e S foi de aproximadamente 20 % para o alelo C e 80 % para o alelo S, para ambos os grupos ($p > 0,05$, teste χ^2).

Tabela 6 - Distribuição dos genótipos e frequência relativa de alelos para o polimorfismo PON2-311 nos indivíduos dos grupos controle e diabéticos.

Grupos	Genótipos (%)			Frequência alélica	
	CC	SC	SS	C	S
Controle n = 82	6,1	24,4	69,5	0,18	0,82
Diabético n = 61	3,3	39,3	57,4	0,23	0,77

Não houve diferença significativa. Distribuição de genótipos: $\chi^2 = 3,911$ (2 gl, $p = 0,142$). Frequência alélica: $\chi^2 = 0,939$ (1 gl, $p = 0,333$).

5.4 Avaliação da Influência do Polimorfismo PON1-192 no Perfil Glicêmico, no Perfil Lipídico e na Atividade Enzimática

5.4.1 Associação entre o polimorfismo PON1-192 e o perfil glicêmico dos indivíduos do grupo controle e pacientes diabéticos

O efeito do polimorfismo PON1-192 nos níveis de glicose e insulina está mostrado na Tabela 7. A concentração de glicose e de insulina nos pacientes diabéticos foi superior àquela dos indivíduos do grupo controle ($p < 0,05$), independente do genótipo. No entanto, a concentração de glicose nos pacientes diabéticos portadores do genótipo RR foi aproximadamente 2,3 vezes superior aos controles RR. Nos pacientes diabéticos com genótipo RR, os níveis de insulina foram aproximadamente 2,5 vezes superiores aos valores observados nos pacientes portadores dos genótipos QQ e RQ, e aproximadamente seis vezes maiores em relação aos indivíduos RR do grupo controle (Tabela 7). Entretanto, essas diferenças não foram estatisticamente significativas devido ao pequeno número de pacientes e à grande dispersão dos resultados.

Tabela 7 - Concentrações plasmáticas de glicose e insulina de acordo com os genótipos do polimorfismo PON1-192 nos indivíduos do grupo controle e pacientes diabéticos.

	Controle (n = 82)			Diabético (n = 61)		
	QQ (n=41)	RQ (n=32)	RR (n=09)	QQ (n=29)	RQ (n=27)	RR (n=05)
Glicose (mg/dL)	93,5 ± 10,5	90,8 ± 10,2	86,7 ± 9,3	150,5 ± 57,2 *	159,9 ± 60,4 *	198,0 ± 77,2 *

	Controle (n = 50)			Diabético (n = 61)		
	QQ (n=24)	RQ (n=19)	RR (n=07)	QQ (n=29)	RQ (n=27)	RR (n=05)
Insulina (µU/mL)	7,9 ± 16,0	5,5 ± 5,4	5,0 ± 3,2	12,4 ± 10,9 *	13,6 ± 13,2 *	31,8 ± 48,1

Os valores estão expressos como média ± desvio-padrão. n = número de participantes.
*p < 0,05 comparado ao respectivo genótipo do grupo controle.

A consistente, ainda que não significativa, tendência de níveis maiores de glicose no genótipo RR, seguido do genótipo RQ, e menores valores no genótipo QQ nos pacientes diabéticos, e a tendência inversa nos indivíduos do grupo controle, ou seja, QQ > QR > RR, pode ser melhor visualizada na Figura 7.

A concentração de hemoglobina glicada nos pacientes diabéticos não foi influenciada pelos genótipos do polimorfismo PON1-192 (Tabela 8).

Tabela 8 - Concentrações de Hemoglobina Glicada (%) de acordo com os genótipos dos polimorfismos PON1-192 e PON2-311 nos pacientes diabéticos.

PON1-192			PON2-311		
QQ (n = 28)	QR (n = 28)	RR (n = 5)	CC (n = 2)	CS (n = 24)	SS (n = 35)
7,79 ± 2,08	7,98 ± 2,21	6,86 ± 1,57	7,40 ± 1,70	8,04 ± 2,49	7,66 ± 1,85

Os valores estão expressos como média ± desvio-padrão. Não houve diferença significativa entre os genótipos (ANOVA).

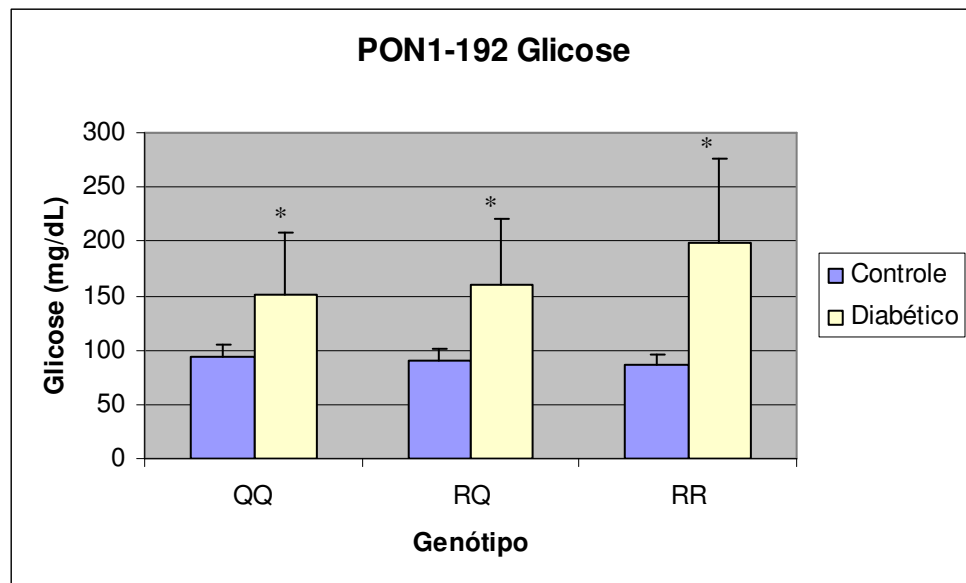


Figura 7 - Efeito do polimorfismo PON1-192 na glicemia de jejum dos grupos controle (n = 82) e diabético (n = 61). Os valores estão expressos como média \pm desvio-padrão. * p < 0,05 quando comparado ao respectivo controle. Controle: QQ, n = 41; RQ, n = 32; RR, n = 09. Diabético QQ, n = 29; RQ, n = 27; RR, n = 05.

5.4.2 Associação entre o polimorfismo PON1-192 e o perfil lipídico dos indivíduos do grupo controle e pacientes diabéticos

A influência dos genótipos do polimorfismo PON 1-192 nas concentrações séricas de lipídeos nos pacientes diabéticos e indivíduos do grupo controle está apresentada na Tabela 9. Apesar de os valores de triglicerídeos estarem aproximadamente 1,8 vezes maiores nos pacientes diabéticos RR em relação aos indivíduos RR do grupo controle, não foram encontradas diferenças significativas nas concentrações de triglicerídeos e dos demais lipídeos entre os genótipos, tanto no grupo dos diabéticos como no grupo controle.

Tabela 9 - Concentrações séricas de lipídeos de acordo com os genótipos do polimorfismo PON1-192 nos indivíduos do grupo controle e pacientes diabéticos

	Controle (n = 82)			Diabético (n = 61)		
	QQ (n = 41)	RQ (n = 32)	RR (n = 09)	QQ (n = 29)	RQ (n = 27)	RR (n = 05)
CT	207,9 ± 20,9	197,5 ± 22,7	199,4 ± 12,4	211,9 ± 39,9	210,4 ± 37,6	223,4 ± 36,5
TG	162,4 ± 100,0	151,2 ± 92,0	150,1 ± 75,9	218,1 ± 118,3	179,5 ± 62,4	273,0 ± 111,5
HDL-C	51,5 ± 12,4	52,3 ± 13,7	50,6 ± 9,1	41,8 ± 11,0	50,9 ± 14,4	45,0 ± 8,2
LDL-C	123,9 ± 18,5	114,8 ± 30,4	118,7 ± 15,4	126,8 ± 34,0	123,5 ± 36,2	123,8 ± 43,6

Os valores estão expressos como média ± desvio-padrão (mg/dL). Abreviaturas: CT, colesterol total; TG, triglicérides; HDL-C, HDL-colesterol; LDL-C, LDL- colesterol. Não houve diferença significativa entre os dois grupos e/ou entre os genótipos. ANOVA-Kruskal-Wallis. Os valores de TG e HDL-C sofreram transformações logarítmicas.

5.4.3 Influência do polimorfismo PON1-192 nas atividades paroxonase e arilesterase da PON nos indivíduos do grupo controle e pacientes diabéticos

A influência dos genótipos do polimorfismo PON1-192 nas atividades paroxonase e arilesterase está apresentada na Figura 8 e na Figura 9, respectivamente. O polimorfismo PON1-192 modificou a atividade paroxonase da PON no soro dos participantes dos grupos controle e diabético (Figura 8). A atividade paroxonase foi significativamente menor nos portadores do genótipo QQ, intermediária nos portadores do genótipo RQ e maior no genótipo RR ($p < 0,05$). No entanto, a atividade arilesterase sérica não foi afetada pelo polimorfismo PON1-192 em nenhum dos grupos estudados (Figura 9).

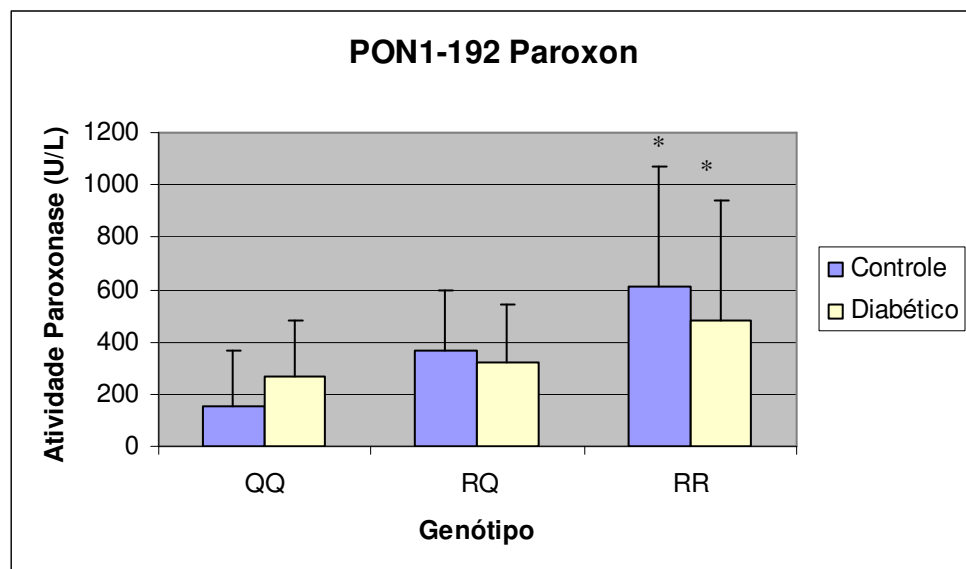


Figura 8 – Influência dos genótipos do polimorfismo PON1-192 sobre a atividade paroxonase em indivíduos do grupo controle e pacientes diabéticos. Os valores estão expressos como média \pm desvio-padrão. U = Unidade de enzima ($\mu\text{mol/L}$). * $p < 0,05$ em relação aos genótipos RQ e QQ do mesmo grupo (ANOVA e teste complementar de Dunn). Controle QQ, $n = 41$; RQ, $n = 32$; RR, $n = 09$. Diabético QQ, $n = 29$; RQ, $n = 27$; RR, $n = 05$.

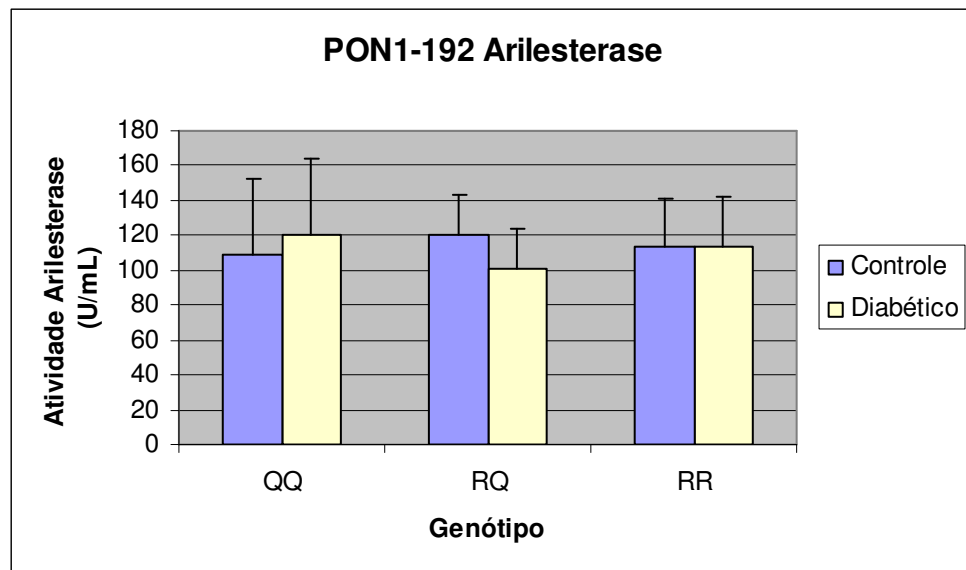


Figura 9 - Influência dos genótipos do polimorfismo PON1-192 sobre a atividade arilesterase em indivíduos do grupo controle e pacientes diabéticos. Os valores estão expressos como média \pm desvio-padrão. U = Unidade de enzima ($\mu\text{mol/ml}$). Controle QQ, n = 41; RQ, n = 39; RR, n = 09. Diabético QQ, n = 29; RQ, n = 27; RR, n = 05. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$; ANOVA).

5.5 Avaliação da Influência do Polimorfismo PON2-311 no Perfil Glicêmico, no Perfil Lipídico e na Atividade Enzimática da PON.

5.5.1 Efeito do polimorfismo PON2-311 no perfil glicêmico dos indivíduos do grupo controle e pacientes diabéticos

O polimorfismo PON2-311 não afetou a concentração de glicose e insulina nos indivíduos do grupo controle ou nos pacientes diabéticos. Os níveis de glicemia em jejum e de insulina foram superiores nos pacientes diabéticos em relação aos indivíduos do grupo controle, independente do genótipo do polimorfismo PON2-311 (Tabela 10). Além disso, a concentração de hemoglobina glicada nos pacientes diabéticos não foi influenciada pelos genótipos do polimorfismo PON2-311 (Tabela 8).

Tabela 10 - Concentrações plasmáticas de glicose e insulina de acordo com os genótipos do polimorfismo PON2-311 nos indivíduos do grupo controle e pacientes diabéticos.

	Controle (n = 82)			Diabético (n = 61)		
	CC (n=05)	SC (n=20)	SS (n=57)	CC (n=02)	SC (n=24)	SS (n=35)
Glicose (mg/dL)	99,8 ± 5,4	89,9 ± 9,3	91,6 ± 10,8	185,5 ± 88,4	166,2 ± 60,4	151,8 ± 60,3

	Controle (n = 50)			Diabético (n = 61)		
	CC (n=04)	SC (n=10)	SS (n=36)	CC (n=02)	SC (n=24)	SS (n=35)
Insulina (μU/mL)	3,6 ± 1,8	7,0 ± 6,5	6,8 ± 13,2	16,1 ± 5,2	16,4 ± 24,7	13,2 ± 11,5

Os valores estão expressos como média \pm desvio-padrão. Não houve diferenças significativas inter ou intra-grupos (ANOVA).

5.5.2 Efeito do polimorfismo PON2-311 no perfil lipídico nos indivíduos do grupo controle e pacientes diabéticos

A Tabela 11 mostra os resultados dos lipídeos e lipoproteínas séricas dos indivíduos do grupo controle e pacientes diabéticos segundo a estratificação pelos genótipos do polimorfismo PON2-311. Em geral, embora as diferenças não tenham sido significativas devido, provavelmente, ao pequeno número de indivíduos avaliados e à dispersão dos resultados, os valores de triglicérides foram superiores e os níveis de HDL-C foram inferiores nos pacientes diabéticos. No entanto, é possível observar que os pacientes diabéticos (n = 2) portadores do genótipo CC possuem níveis menos desejáveis de triglicérides e HDL-C em comparação com os indivíduos do grupo controle com genótipo CC (n = 5) (Tabela 11).

Tabela 11-Concentrações séricas de lipídeos de acordo com os genótipos do polimorfismo PON2-311 nos indivíduos do grupo controle e pacientes diabéticos

	Controle (n=82)			Diabético (n=61)		
	CC (n = 05)	SC (n = 20)	SS (n = 57)	CC (n = 02)	SC (n = 24)	SS (n = 35)
CT	204,6 ± 11,9	214,2 ± 14,8	198,8 ± 28,6	186,0 ± 0,01	215,5 ± 32,5	211,5 ± 42,5
TG	136,4 ± 39,2	191,5 ± 107,8	146,2 ± 90,3	210,0 ± 46,7	186,6 ± 80,5	218,2 ± 111,6
HDL-C	54,0 ± 7,2	50,9 ± 16,9	51,8 ± 11,3	35,5 ± 6,4	50,1 ± 13,4	43,7 ± 12,6
LDL-C	123,3 ± 8,6	191,5 ± 107,8	146,2 ± 90,3	108,5 ± 16,0	128,0 ± 26,4	124,2 ± 41,1

Os valores estão expressos como média ± desvio-padrão (mg/dL). Não houve diferença significativa intra ou inter-grupos (ANOVA-Kruskal-Wallis) As variáveis TG e HDL-C sofreram transformações logarítmicas. Abreviaturas: CT, colesterol total; TG, triglicerídeos; HDL-C, HDL-colesterol e LDL-C, LDL- colesterol.

5.5.3 Efeito do polimorfismo PON2-311 na atividade enzimática sérica da PON nos indivíduos do grupo controle e pacientes diabéticos

A ação do polimorfismo PON2-311 nas atividades paroxonase e arilesterase pode ser observada na Figura 10 e na Figura 11, respectivamente. Os indivíduos do grupo controle portadores do genótipo SS apresentaram atividade paroxonase significativamente menor que os indivíduos portadores dos demais genótipos ($p < 0,05$). No entanto, esse efeito não foi observado nos pacientes diabéticos (Figura 10).

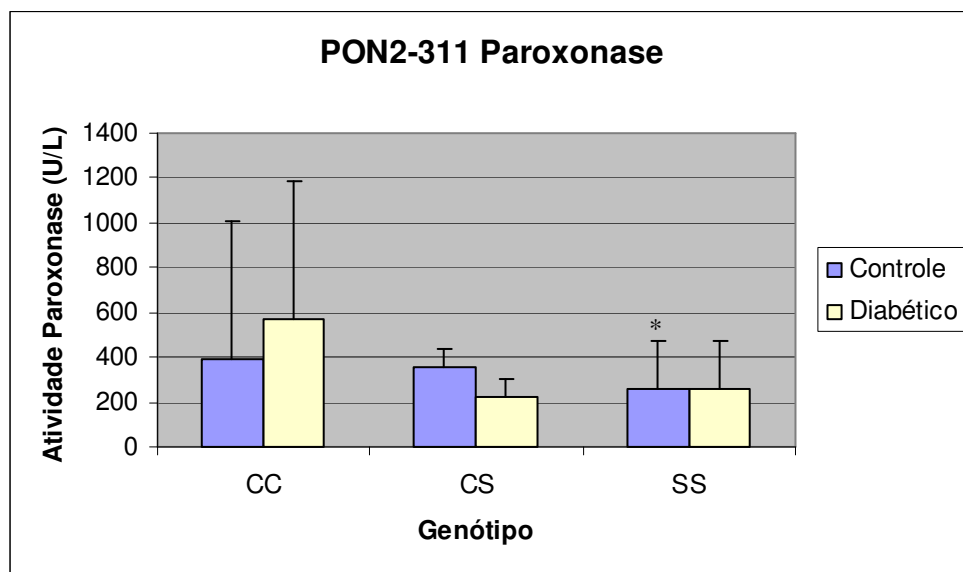


Figura 10 - Influência dos genótipos do polimorfismo PON2-311 sobre a atividade paroxonase em indivíduos do grupo controle e pacientes diabéticos. Os valores estão expressos como média \pm desvio-padrão. Grupo controle: CC, $n = 5$; SC, $n = 20$; SS, $n = 57$. Grupo diabético: CC, $n = 2$; SC, $n = 24$; SS, $n = 35$. * $p < 0,05$ comparado aos demais genótipos do respectivo grupo. U = unidade, quantidade de enzima que hidrolisa 1 μmol de paroxon por minuto, por litro de soro.

A atividade arilesterase no soro dos indivíduos do grupo controle portadores do genótipo SS foi menor em comparação com os demais genótipos ($p < 0,05$). Entretanto, nos pacientes diabéticos a atividade arilesterase não sofreu influência do polimorfismo PON2-311 (Figura 11).

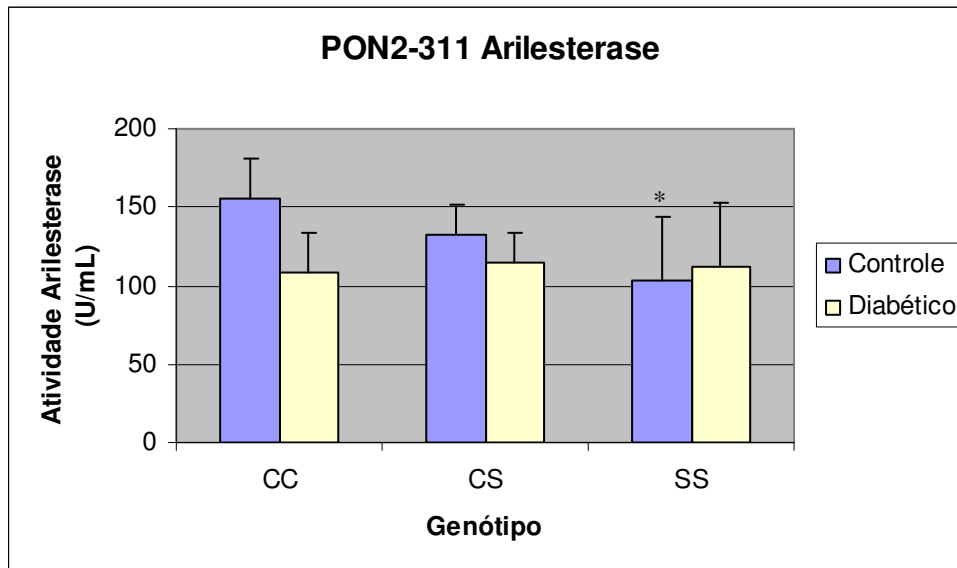


Figura 11 – Atividade arilesterase da PON de acordo com o polimorfismo PON2-311. Os valores estão expressos como média \pm desvio-padrão. Grupo controle: CC, n = 5; SC, n = 20; SS, n = 57. Grupo diabético: CC, n = 2; SC, n = 24; SS, n = 35. * p < 0,05 comparado aos demais genótipos do respectivo grupo. U = unidade, quantidade de enzima que hidrolisa 1 μ mol de acetato de fenila por minuto, por mililitro de soro.

6 DISCUSSÃO

A doença arterial coronariana (DAC) é a mais importante complicação do diabetes mellitus tipo 2 (DM2). A doença cardiovascular é diagnosticada em mais de 50% dos diabéticos e é responsável por 75 a 80 % das internações hospitalares e óbitos (DONANGELO e OLIVEIRA, 2004). Múltiplos fatores contribuem para a aterosclerose acelerada nos pacientes diabéticos. Esses fatores incluem os riscos tradicionais, como obesidade, hipertensão e dislipidemia, juntamente com modificações das lipoproteínas e outras proteínas pela glicação e oxidação, aumento da coagulação e, possivelmente, resistência insulínica (MOORADIAN, 2003). A aterosclerose pode resultar de uma condição conhecida como estresse oxidativo, o qual é caracterizado por um desequilíbrio entre a geração de radicais livres e os sistemas seqüestradores de radicais. O estresse oxidativo e a oxidação da LDL têm sido propostos como um dos mais importantes mecanismos que aceleram o processo aterosclerótico.

Ao conhecido mecanismo protetor da aterosclerose atribuído à HDL por sua participação no transporte reverso do colesterol, tem-se somado a descoberta de uma função antioxidante da HDL contra a peroxidação lipídica da LDL. Essa característica adicional da HDL pode ser decisiva, tendo em vista que exerce a sua ação prevenindo ou atenuando a formação da placa de ateroma. Neste sentido, o paradigma protetor da HDL tem se ampliado substancialmente e, parece, que não só a quantidade de HDL é importante, mas também os aspectos qualitativos antioxidantes da partícula. A presença da enzima antioxidante paroxonase (PON) nas partículas de HDL, a qual condiciona a capacidade da HDL inibir o processo oxidativo da LDL no espaço sub-endotelial, consolida essa hipótese.

Evidências experimentais sugerem que a diminuição na atividade sérica da PON pode ocorrer como parte de uma resposta inflamatória. A diminuição crônica na atividade da PON pode aumentar a susceptibilidade à aterosclerose e a diminuição aguda, devido a alguma intercorrência inflamatória aguda, poderia exacerbar a oxidação da LDL, induzindo a formação de células espumosas sobre uma lesão ateromatosa pré-existente, debilitando a capa fibrosa da placa e predispondo à ruptura e a evento isquêmico agudo devido à formação de coágulo sobre a superfície da lesão (DURRINGTON e cols., 2001). Assim, considerando-se que a capacidade antioxidante das partículas de HDL depende quase que exclusivamente da

enzima PON, parece plenamente justificado pesquisar quais fatores modulam ou permitem aumentar a sua atividade.

A atividade plasmática da paroxonase varia grandemente entre os indivíduos e a base molecular para essa variação pode ser devido aos polimorfismos da paroxonase (ADKINS e cols., 1993; AUBÓ e cols., 2000, LEUS e cols., 2001). O interesse pela paroxonase no contexto da aterosclerose surgiu após os relatos de que a atividade sérica da enzima estava diminuída em pacientes que tinham sofrido infarto do miocárdio (McELVEEN e cols., 1986). Estudos posteriores indicaram que a atividade da paroxonase também estava diminuída em pacientes com hipercolesterolemia familiar e com diabetes mellitus tipo 1 (MACKNESS e cols., 1991; ABOIT e cols., 1995). Ambas as condições apresentam uma susceptibilidade aumentada para o desenvolvimento da aterosclerose, indicando uma provável relação entre a paroxonase e a aterosclerose e, possivelmente, um envolvimento da paroxonase nas propriedades antiaterogênicas da HDL.

Apesar de algumas inconsistências, existem relatos de que os polimorfismos da paroxonase, PON1-192, PON1-55 e PON2-311, estão associados com as doenças cardiovasculares e outras complicações em pacientes com diabetes mellitus, e também estão envolvidos com a atividade da enzima (MACKNESS e cols., 1991; RUIZ e cols., 1995; RUIZ, 1997; AUBÓ e cols., 2000, MALIN e cols., 2001). Caso essas associações se confirmem em pacientes diabéticos sem doença aterosclerótica estabelecida, poderá haver uma opção adicional de ensaios laboratoriais para se prever as complicações do diabetes mellitus. Considerando a falta de informações sobre esse tema na população de pacientes diabéticos existentes em nosso meio, analisamos a distribuição genotípica e a frequência alélica dos polimorfismos PON1-192 e PON2-311 da paroxonase, bem como o efeito desses polimorfismos na atividade enzimática, no controle glicêmico e no perfil lipídico de pacientes diabéticos tipo 2 de Florianópolis e da região sul de Santa Catarina (Tubarão e Turvo).

A população de pacientes diabéticos avaliada nesse estudo apresentou índice de massa corporal superior aos indivíduos do grupo controle, bem como um percentual maior de pacientes obesos ($IMC > 30 \text{ kg/m}^2$; Tabela 1). A associação entre obesidade e diabetes mellitus tipo 2 é bem conhecida. Em geral, mais de 85 % dos pacientes diabéticos tipo 2 são obesos. Grandes estudos prospectivos demonstraram que 64 % dos casos de DM2 em homens e 74 % em mulheres poderiam, teoricamente, ser evitados se nenhum indivíduo apresentasse

IMC superior a 25 kg/m^2 . A síndrome de resistência insulínica associa-se de forma ubíqua com a obesidade e o DM2 e, provavelmente, tem um papel importante na patogenia do DM2 e da própria obesidade (CARNEIRO, 2004). O IMC em pacientes diabéticos tipo 2 não tem sido associado aos polimorfismos PON1-192 e PON2-311 (PINIZZOTTO e cols., 2001). Entretanto, o grau de obesidade interage com o polimorfismo PON2 influenciando o risco de nefropatia diabética, mas a patofisiologia ainda não é conhecida (PINIZZOTTO e cols., 2001).

Conforme esperado, os pacientes diabéticos avaliados nesse estudo apresentaram valores de glicose e de insulina superiores aos dos indivíduos do grupo controle (Tabela 2). Já é bem conhecida a influência da hiperglicemia para o desenvolvimento e amplificação do processo aterosclerótico, tornando-a assim um fator de risco. A glicose ativa vias metabólicas do poli-ol, proteína quinase C e da produção de produtos finais de glicação. Quando há deficiência insulínica, ou resistência à insulina como no DM2, a hiperglicemia se desenvolve a partir de três processos: i) aumento da gliconeogênese; ii) glicogenólise acelerada; e iii) redução na utilização periférica da glicose (ZAJDENVERG e OLIVEIRA 2004). A hiperglicemia crônica, com distúrbios no metabolismo dos carboidratos, lipídeos e proteínas, está associada com danos, disfunções e insuficiência de vários órgãos. A hiperglicemia está relacionada com o estresse oxidativo, o qual, por sua vez, está associado à modificação das lipoproteínas, à lesão do endotélio e à produção de resposta alterada de vasodilatação à isquemia (HEDRICK e cols., 2000; BECKMAN e cols., 2002; BOZZA e cols., 2004). Além disso, concentrações pouco elevadas de glicose parecem aumentar a aderência dos monócitos nas células do endotélio aórtico humano, um evento chave para a aterogênese (KOYA e KING, 1998; HEDRICH e cols., 2000). Outra consideração importante é a formação não enzimática dos produtos finais de glicação, normalmente conhecidos pela sigla AGE's, através da longa exposição de proteínas e lipídeos à glicose. Os produtos finais de glicação estão aumentados nos diabéticos e estão associados com a gravidade das complicações (VLASSARA e PALACE, 2002; ZAJDENVERG e OLIVEIRA, 2004; BOZZA, e cols., 2004). Nos diabéticos, a glicação das apolipoproteínas correlaciona-se positivamente com os indicadores de controle glicêmico, como a HbA1c. A glicação de enzimas ou apolipoproteínas envolvidas no metabolismo da HDL também pode causar anormalidades na função da HDL e contribuir para a aceleração da aterogênese em pacientes diabéticos. Mooradian (2003) mostrou que a glicação da HDL diminui várias funções-chaves da partícula, deixando-a mais pró-aterogênica. Essas funções incluem a associação da HDL com a lipase hepática e

propriedades antioxidantes mediadas, principalmente, pela paroxonase. A glicação da PON purificada causou uma redução da sua atividade em 40 % (HEDRICK e cols., 2000).

A resistência insulínica é definida como uma condição, genética ou adquirida, em que ocorre menor utilização de glicose pelos tecidos em resposta ao estímulo insulínico. Quando as células β tornam-se incapazes de aumentar a secreção de insulina a ponto de vencer a resistência tecidual e promover a captação de glicose, surge a hiperglicemia em graus variados. O tecido adiposo visceral caracteriza-se por intensa atividade lipolítica, o que resulta em produção de ácidos graxos para a circulação. A elevada concentração de ácidos graxos livres na circulação provoca uma série de conseqüências metabólicas, especialmente no fígado, pâncreas e tecidos periféricos, como, por exemplo, o aumento da gliconeogênese. Desse modo, eleva-se a glicemia, que por sua vez acarreta secreção pancreática de insulina, favorecendo a hiperinsulinemia. Tanto devido à hiperinsulinemia crônica, como pela competição dos ácidos graxos circulantes na captação muscular de substratos, a glicose é menos captada em resposta à insulina, caracterizando o estado de resistência insulínica (DONNAGELO e OLIVEIRA, 2004). O estresse oxidativo também pode contribuir para o diabetes e suas complicações, por predispor à resistência insulínica (LEVIEV e cols., 2001).

Atualmente, o controle glicêmico dos pacientes é feito com base nos resultados da HbA_{1c}. Os níveis médios de HbA_{1c} verificados nesse estudo foram de 7,8 % (Tabela 2). Esse valor de HbA_{1c} sugere que as medidas terapêuticas e/ou educacionais adotadas ainda não são efetivas a ponto de proporcionar aos pacientes um controle glicêmico que os deixe dentro dos valores recomendados de HbA_{1c} < 7 %, os quais são necessários para retardar o aparecimento das complicações do DM2, conforme sugerido pelos estudos DCCT e UKPDS. Segundo esses estudos, para cada 1 % de redução nos níveis de HbA_{1c}, os riscos de complicações microvasculares são reduzidos em 25 % e a ocorrência de infarto do miocárdio em 18 % (ZAJDENVERG e OLIVEIRA, 2004).

O perfil lipídico dos pacientes avaliados nesse estudo é clássico de pacientes com diabetes mellitus tipo 2 (Tabela 3). Conforme observado, as anormalidades lipídicas mais comuns nessa patologia são a elevação dos níveis de triglicérides e a redução do HDL-C, enquanto que o colesterol total e a LDL-C podem permanecer inalterados (KOPPRASCH e cols., 2003, DONNAGELO e OLIVEIRA, 2004). A prevalência de níveis elevados de LDL-C em diabéticos não é, normalmente, diferente dos níveis encontrados na população não

diabética (GINSBERG e TUCK, 2001; MOORADIAN, 2003). Entretanto, a concentração de LDL não deve ser negligenciada, considerando-se, principalmente, as modificações que ocorrem nas lipoproteínas dos pacientes diabéticos. As partículas de LDL dos diabéticos são mais densas e menores, se oxidam mais facilmente e, portanto, são pró aterogênicas. A LDL pequena e densa está, também, associada a outras condições aterogênicas como hipertrigliceridemia e níveis diminuídos de HDL-C, resistência insulínica e hiperinsulinemia (SANTOS, 2001). Nos diabéticos essa alteração acontece mesmo com níveis normais de triglicérides.

A relação entre hipertrigliceridemia e aterosclerose não foi suficientemente comprovada em grandes estudos populacionais. Assim, apesar de existirem controvérsias acerca da hipertrigliceridemia como fator de risco independente para a DAC em não diabéticos na ausência de redução de HDL-C ou elevação de LDL-C, os níveis de triglicérides em pacientes diabéticos estão positiva e independentemente associados com o aumento do risco para DAC (BOZZA, e cols., 2004). Tanto o aumento na produção hepática de VLDL, como a redução no metabolismo da VLDL por diminuição da atividade da lipase lipoprotéica, contribuem para a hipertrigliceridemia e resultam em baixas concentrações de HDL-C (MOORADIAN, 2003). Além disso, a composição da VLDL e IDL é anormal. As partículas são menores e mais densas, o que as torna mais aterogênicas (DONANGELO e OLIVEIRA, 2004).

A HDL também sofre mudanças na sua composição, apresentando maior concentração de triglicérides e um aumento na relação colesterol/proteína por depleção de apo A. Tanto as alterações qualitativas como as quantitativas correlacionam-se com a baixa atividade da enzima lipase lipoprotéica. A glicação não enzimática também pode interferir na ligação com o receptor da HDL, contribuindo, assim, para os baixos níveis de HDL e de apo A, que são comuns em pacientes diabéticos tipo 2 (DONANGELO e OLIVEIRA, 2004).

Vários estudos procuram demonstrar que o polimorfismo da paroxonase está associado às complicações em pacientes diabéticos, inclusive DAC, e à atividade da enzima (RUIZ e cols., 1995; ODAWARA e cols., 1997; PFOHL e cols., 1999; JAMES, e cols., 2000a, OSEI-HYIAMAND, e cols., 2001). A distribuição gênica e a frequência dos alelos dos polimorfismos da PON avaliados nesse estudo, PON1-192 e PON2-311, foram semelhantes entre os indivíduos do grupo controle e os pacientes diabéticos tipo 2 (Tabela 5 e Tabela 6).

Esses resultados estão de acordo com outros estudos (MALIN, e cols., 1998; AUBÓ e cols., 1999; PFHOL e cols., 1999; MACKNESS, e cols., 2000) e, inclusive, semelhantes à distribuição encontrada na população caucasiana brasileira (ALLEBRANT e cols., 2002). A população do presente estudo foi formada por caucasianos com grande influência de imigrantes europeus, composta principalmente por descendentes italianos e alemães. Allebrant e cols. (2002) relataram a presença de diferenças significativas entre a frequência alélica dos polimorfismos PON1-192 e PON1-55 nos afro-brasileiros, em comparação com euro-brasileiros saudáveis, demonstrando a importância dos grupos étnicos. Na raça negra brasileira o percentual de portadores do genótipo QQ foi inferior aos caucasianos (ALLEBRANDT e cols., 2002). Em relação ao polimorfismo PON2-311 no presente estudo, obtivemos um pequeno número de portadores do genótipo CC da PON2-311, tanto no grupo controle (6,0 %) como nos diabéticos (3,3 %). Resultado similar foi obtido por Leus e cols. (2001) em pacientes com hipercolesterolemia familiar.

Como mencionado anteriormente, o alelo R do polimorfismo PON1-192 tem sido associado à DAC em pacientes diabéticos tipo 2 (RUIZ e cols., 1995; SERRATO e cols., 1995, ODAWARA e cols., 1997; MACKNESS, e cols., 2001). Em relação aos polimorfismos do gene PON2, novamente a presença do diabetes mellitus é importante em determinar se os polimorfismos estão associados ao risco para o desenvolvimento da DAC (HEGELE e cols., 1997). No entanto, as etnias parecem exercer uma função ainda maior. Por exemplo, dentro da população caucasiana, o genótipo Q do polimorfismo PON1-192 predomina, enquanto que nos orientais e negros o genótipo R é mais comum (MACKNESS e MACKNESS, 2004), apesar da incidência de DAC nessas raças (pelo menos nos seus países de origem) ser menor que nos caucasianos. O polimorfismo PON2-311 parece estar associado com o risco aumentado para a DAC em sul asiáticos (indianos) e chineses, mas não em malaios e caucasianos (SANGHERA, e cols., 1998). Recentemente, Wheeler e cols. (2004) publicaram uma meta-análise dos estudos genéticos epidemiológicos existentes até essa data. Eles investigaram os polimorfismos 55, 108 e 192 da PON1 e o polimorfismo 311 da PON2 e as suas associações com a DAC em 12.786 indivíduos controles e 11.212 pacientes com DAC. Não houve associação significativa com a DAC para nenhum dos polimorfismos avaliados. Os autores concluíram que estudos maiores e avaliações mais rigorosas são necessários para investigar os polimorfismos genéticos da PON e a DAC. No entanto, os resultados da meta-análise não consideraram as diferentes etnias e, assim, é possível que os polimorfismos da PON possam ainda representar um fator de risco para a DAC em grupos étnicos particulares.

Segundo Aubó e cols. (2000), é perfeitamente concebível que o polimorfismo PON1-192 produza apenas efeito no risco para DAC em grupos particulares de pacientes na presença adicional de fatores que têm prevalência diferente entre as populações. Dessa maneira, o possível efeito deletério do polimorfismo PON1-192 pode ser mais expressivo quando uma variante genética e condição oxidativa particular coexistirem. Entre os fatores que podem ser associados, a dislipidemia e o diabetes mellitus aparecem como grandes candidatos. Entretanto, a associação dos polimorfismos da PON1-192 e PON2-311 com o diabetes mellitus em pacientes sem DAC parece realmente não existir, conforme demonstrado no presente estudo e também por Kopprasch e cols., (2003).

Um dos principais objetivos do presente estudo foi a verificação da atividade da enzima paroxonase (PON) na população de pacientes diabéticos tipo 2. Os resultados demonstraram a existência de uma correlação positiva entre os dois substratos utilizados, paroxon e acetato de fenila, bem como entre a atividade da PON no soro e na HDL (Figura 1 e Figura 2). No entanto, a atividade arilesterase da PON na HDL não se correlacionou com a concentração de HDL-C (Figura 3). Esses resultados estão de acordo com outros relatos recentemente publicados (AYUB e cols., 1999; KOPPRASCH e cols., 2003; TOMÁS e cols., 2004) e confirmam a suposição de que somente a determinação da concentração de HDL pode não representar todo o potencial protetor das partículas de HDL, pelo menos em relação à atividade da PON. Baixos níveis séricos de PON ocorrem quando a concentração de HDL está profundamente diminuída, como na doença de Tangier. Porém, quando os níveis de HDL estão moderadamente diminuídos, como por exemplo, no diabetes mellitus e na hipercolesterolemia familiar, a atividade da PON independe das mudanças na concentração de HDL (AYUB e cols., 1999).

No presente estudo não foram encontradas diferenças significativas para a atividade da PON, utilizando-se dois diferentes substratos, entre o grupo de pacientes diabéticos e o de indivíduos controles (Figura 4). Apesar de vários trabalhos demonstrarem uma diminuição da atividade da PON em pacientes diabéticos tipo 1 e tipo 2 (ABBOT, e cols., 1995; MACKNESS, e cols., 1998; SAKAI e cols., 1998; BOEMI e cols., 2001; HEDRICK e cols., 2000; INOUE e cols., 2000; MACKNESS e cols., 2000; TOMÁS e cols., 2002), resultados discordantes foram relatados por outros autores (RAHMANI e cols., 2002; SANGUINETTI e cols., 2001; KOPPRASCH e cols., 2003; AGACHAN e cols., 2004). A atividade da PON encontra-se mais intensamente diminuída em pacientes diabéticos com neuropatia (ABBOT e

cols., 1995; MACKNESS e cols., 2000), nefropatia (IKEDA e cols., 1998) e retinopatia (IKEDA e cols., 1998; MACKNESS e cols., 2000). Assim, Kopprasch e cols. (2003) concluíram que a atividade diminuída da PON deve ser um evento tardio e dependente das complicações, pois esses autores não observaram diferenças na atividade da enzima ao compararem indivíduos normoglicêmicos com intolerantes à glicose e com pacientes diabéticos recém diagnosticados. Corroborando com essa justificativa podemos considerar as hipóteses de Inoue e cols. (2000) para explicar os possíveis mecanismos que diminuem a atividade da enzima paroxonase em pacientes diabéticos: i) a presença de inibidores da atividade da PON no sangue de diabéticos, como as proteínas glicadas; ii) a glicação da própria paroxonase, como acontece com outras proteínas; e iii) a modificação da composição ou conformação da HDL que pode prejudicar a interação da PON com o substrato.

Os pacientes diabéticos avaliados no presente estudo não apresentaram as complicações clássicas. Oito pacientes tiveram diagnóstico recente de diabetes e, aproximadamente, 50 % apresentavam controle glicêmico aceitável ($HbA1c < 7\%$), justificando, assim, a ausência de diminuição da atividade da PON. No entanto, considerando-se a idade dos pacientes ($61,7 \pm 10,0$ anos) é possível sugerir que muitos deles já apresentavam a doença há cerca de 5-10 anos, idade semelhante àquela dos pacientes de outros estudos que também não encontraram diminuição na atividade da PON (SANGUINETTI e cols., 2001; RAHMANI e cols., 2002; AGACHAN e cols., 2004). Assim, outras justificativas para a discordância entre os resultados dos diferentes estudos, além do tempo da patologia, devem ser buscadas.

Em geral, a utilização da determinação da atividade sérica da PON como marcador de DAC, em pacientes com ou sem diabetes, tem produzido diferentes e controversos resultados. Os níveis séricos da enzima paroxonase diferem significativamente entre os indivíduos, sendo que as variações podem ocorrer devido a doenças, dieta, idade, gravidez, menopausa, medicamentos, estilo de vida e fatores ambientais e genéticos (JAMES e cols., 2000b; KLEEMOLA e cols., 2002; FERRÈ e cols., 2002; DRAGANOV e cols., 2004; LI e cols., 2003; BOEMI e cols., 2004; SERES e cols., 2004; TOMÁS e cols., 2004). A expressão de alguns fatores está sob controle genético e, por essa razão, não é surpreendente que as associações tenham sido variáveis em diferentes comunidades avaliadas nos vários estudos (RAHMANI e cols., 2001).

Dentre os vários fatores ambientais de relevância para a atividade enzimática da PON encontra-se o tabagismo. A atividade paroxonase da PON nos participantes fumantes e ex-fumantes de ambos os grupos foi menor em comparação aos não fumantes ($p < 0,05$; Tabela 4). No entanto, individualmente, os pacientes diabéticos fumantes ou ex-fumantes não apresentaram valores da atividade da PON diferentes dos indivíduos do grupo controle, não demonstrando, portanto, a existência de fatores acumulativos nos pacientes diabéticos. Existem trabalhos relacionando o hábito de fumar com diminuição da atividade enzimática da PON, que pode ser devido ao aumento do dano oxidativo presente nos fumantes (JAMES e cols., 2000b; BOEMI e cols., 2004). Segundo Boemi e cols. (2004), a combinação de fumo e diabetes pode ser particularmente deletéria para a atividade sérica da PON1, com conseqüente risco potencial para doença arterial coronariana. O ato de fumar pode levar ao aumento da peroxidação lipídica, promovendo elevação nos níveis de LDL oxidada. O fumo pode aumentar o estresse oxidativo não somente por produzir radicais livres, mas também por debilitar os mecanismos de defesa antioxidante. James e cols. (2000b) também demonstraram que extratos de cigarro inibiram *in vitro* a atividade enzimática da PON.

Apesar da ausência de diferenças na distribuição gênica e na frequência alélica dos polimorfismos PON1-192 e PON2-311 nos pacientes diabéticos tipo 2 aqui avaliados, bem como diferença na atividade enzimática da PON, pesquisamos a influência desses polimorfismos nos parâmetros do controle glicêmico, do perfil lipídico e na atividade da paroxonase. Nenhum dos polimorfismos influenciou a concentração de glicose plasmática nem de insulina ou os níveis de hemoglobina glicada (Tabela 7 e Tabela 8). No entanto, os pacientes diabéticos portadores dos genótipos PON1-192 RR e portadores do alelo C do polimorfismo PON2-311 apresentaram uma tendência, porém não significativa, de maiores níveis de glicose e de insulina. Considerando que a hiperglicemia é uma das principais causas de complicações nos pacientes diabéticos, inclusive DAC, é de grande importância o conhecimento de variáveis que atuam no controle da glicemia e, nesse sentido, o polimorfismo da PON pode exercer um papel importante no controle glicêmico. Mackness e cols. (2000), estudando os efeitos dos polimorfismos PON1-192, PON1-55 e PON2-311 em pacientes diabéticos, observaram que existe uma correlação entre o controle glicêmico e os polimorfismos e que os pacientes portadores dos genótipos 192 RR, 55 MM e 311 CC apresentaram o pior controle glicêmico, porém, somente naqueles pacientes com retinopatia. Em nosso estudo, todavia, torna-se difícil demonstrar a influência dos genótipos RR e CC no

controle glicêmico em termos estatísticos, devido ao pequeno número de pacientes portadores desses genótipos.

Os genótipos dos polimorfismos PON1-192 e PON2-311 não afetaram significativamente o perfil lipídico dos indivíduos do grupo controle ou dos pacientes diabéticos (Tabela 9 e Tabela 11), concordando com outros relatos na literatura (PFHOL, 1999; MACKNESS e cols., 2001; BONAFE e cols., 2002; AGACHAN e cols., 2004). No entanto, os pacientes diabéticos portadores do alelo PON1-192 RR e PON2-311 CC tiveram valores de triglicerídeos mais elevados, portanto, menos desejáveis. Hu e cols. (2003) também encontraram resultados semelhantes. Esses autores demonstraram que pacientes com diabetes mellitus tipo 2 portadores do alelo R apresentaram níveis elevados de triglicerídeos, colesterol total e LDL-C e baixa concentração de HDL-C, tendo portanto um perfil lipídico desfavorável, que pode contribuir para o desenvolvimento da aterosclerose. Ambos os polimorfismos, PON1-192 e PON2-311, têm sido associados com diferentes níveis de lipídeos e de lipoproteínas plasmáticas, porém de forma inconsistente (LEUS cols., 2001; FANELLA e cols., 2000; MALIN, e cols., 2001; WATZINGER e cols., 2002; MACKNESS e cols., 2001; BONAFE e cols., 2002). Os resultados contraditórios podem ser parcialmente explicados pelas diferentes etnias estudadas, as quais possuem diferenças intrínsecas nos polimorfismos da paroxonase. Assim, estudos adicionais são necessários para avaliar a real interferência ou associação dos polimorfismos da PON nos níveis dos lipídeos plasmáticos, através da comparação dos resultados obtidos em estudos realizados com diversas etnias geneticamente isoladas.

Como discutido anteriormente, a atividade da PON é, em parte, determinada geneticamente. Verificamos, assim, se os polimorfismos PON1-192 e PON2-311 afetariam a atividade da paroxonase nos pacientes diabéticos tipo 2. Os pacientes portadores dos genótipos homozigóticos PON1-192 RR e PON2-311 CC apresentaram maior atividade da paroxonase utilizando-se paroxon como substrato (Figura 8 e Figura 10). No entanto, os indivíduos do grupo controle também apresentaram esse perfil de atividade em relação aos genótipos da PON, demonstrando, assim, que o efeito do polimorfismo não está associado à patologia. A atividade arilesterase, com acetato de fenila como substrato, também foi semelhante entre controles e diabéticos portadores dos diferentes genótipos (Figura 9 e Figura 11). Esses resultados estão de acordo com outros estudos, onde ficou demonstrado que na população em geral a atividade da PON, nos diferentes polimorfismos, é dependente do

substrato, com os alelos 192 R e 311 C estando associados às maiores atividades com paroxon, enquanto que a atividade catalítica da PON com acetato de fenila como substrato, não é influenciada pela variação genética (MACKNESS e cols., 1996; NAVAB e cols., 1997; LA DU, 1996; MACKNESS e cols., 2000; MACKNESS e cols., 2001). Além disso, enquanto estávamos finalizando esse estudo, Agachan e cols. (2004) relataram que os diferentes genótipos afetaram a atividade da PON igualmente em pacientes com diabetes mellitus tipo 2 e em indivíduos não diabéticos. Resultados semelhantes foram descritos por Kopprasch e cols. (2003), ao avaliarem pacientes diabéticos recém diagnosticados. Da mesma maneira, Inoue e cols. (2000) já sinalizavam que os polimorfismos não estavam envolvidos com a baixa atividade da PON em pacientes diabéticos.

É interessante notar que justamente o alelo R do polimorfismo PON-192, o qual está associado à alta atividade paroxonase da PON, é o menos efetivo para a hidrólise de peróxidos lipídicos, que são os prováveis substratos fisiológicos para a PON justificando, assim, o papel anti-aterosclerótico da PON (AVIRAM e cols., 1998; MACKNESS e cols., 1998). Além disso, o alelo R também está positivamente associado à DAC em pacientes diabéticos tipo 2 (RUIZ e cols., 1995) e ao espessamento das camadas íntima e média da artéria carótida de pacientes diabéticos tipo 2, representando, assim, maior fator de risco para a doença macrovascular nessa patologia (HU e cols., 2003). Em um estudo de estrutura e atividade, Durrington e cols. (2001) mostraram que o aminoácido cistina, na posição 283, é essencial para a proteção da LDL contra a oxidação, mas não para a hidrólise de compostos organofosforados, sugerindo que a PON possui dois sítios ativos: um sítio para a atividade antioxidante, dependente da Cys283, e outro sítio responsável pela hidrólise de organofosforados, dependente de cálcio. Assim, alterações na capacidade de hidrolisar substratos como paroxon, acetato de fenila, diazoxon e outros organofosfatos não necessariamente refletem em alteração na capacidade antioxidante. Dessa maneira, à luz dos novos conhecimentos, é questionável o valor dos resultados da associação da atividade paroxonase ou arilesterase da PON com os genótipos da enzima. Os polimorfismos da PON deveriam ser estudados através de sua associação com a atividade antioxidante da enzima paroxonase. No entanto, não existem metodologias simples e rotineiras para o isolamento das partículas de HDL, ou purificação da PON, e a subsequente realização do ensaio laboratorial contra peróxidos lipídicos. As metodologias correntes são extremamente laboriosas e caras, dificultando sobremaneira a sua aplicação em grandes estudos populacionais ou na rotina laboratorial.

Avaliamos a atividade antioxidante da HDL, partindo do pressuposto que a HDL isolada por precipitação seletiva das VLDL e LDL manteve a sua atividade arilesterase intacta (Figura 2). A HDL foi dialisada contra tampão fosfato para remover os agentes precipitantes, cloreto de magnésio e ácido fosfotúngstico, bem como os antioxidantes hidrossolúveis que poderiam interferir no ensaio. Em seguida, a HDL foi incubada com lipossomos (fosfatidilcolina de ovo), e a reação de lipoperoxidação foi iniciada com íons cobre ou com o azo-composto gerador de radicais livres AAPH (hidrocloro de 2,2-azobis-2-amidinopropano). A atividade antioxidante foi monitorada através da determinação dos hidroperóxidos lipídicos (reação colorimétrica) e das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, formados na ausência e na presença de HDL. Não houve diferença entre a habilidade antioxidante da HDL dos pacientes diabéticos em comparação com a HDL dos indivíduos do grupo controle, bem como entre os diferentes genótipos dos polimorfismos PON1-192 e PON2-311 (inibição da peroxidação, grupo controle: $46,08 \pm 21,40 \%$ vs grupo diabético: $51,61 \pm 23,27 \%$). Entretanto, esses resultados devem ser avaliados com cautela, pois a HDL assim isolada contém outras proteínas plasmáticas, principalmente albumina, a qual também possui atividade antioxidante e podem interferir nos ensaios (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Assim, outras formas simples de isolamento da HDL e/ou da PON devem ser introduzidas para a avaliação apropriada da atividade antioxidante da PON nas diferentes situações fisiopatológicas. A quantificação da LDL oxidada através de métodos imuno-enzimáticos vem, aos poucos, se tornando comum e pacientes diabéticos ou com DAC possuem níveis plasmáticos aumentados de LDL oxidada (KOPPRASCH e cols. 2002). No entanto, os níveis de LDL oxidada no plasma de pacientes diabéticos não estiveram associados ao alelo PON1-192 R (KOPPRASCH e cols., 2003). Mackness e Mackness (2004) também vêm enfatizando a necessidade de que sejam realizados mais estudos investigando a hidrólise de peróxidos lipídicos pela PON na DAC. Porém, na ausência de ensaios de rotina baseados na hidrólise de peróxidos lipídicos, os estudos deveriam incluir a hidrólise do paraoxon e/ou diazoxon e a concentração da enzima, pois para aqueles autores o fenótipo (atividade e concentração) tem maior importância como preditores para a DAC que o genótipo da PON.

Em resumo, considerando os resultados do presente trabalho, podemos sugerir que os polimorfismos PON1-192 e PON2-311 da paroxonase, bem como a atividade da enzima, não estão associados ao diabetes mellitus em pacientes sem DAC. Apesar da existência de uma

possível associação do alelo R do polimorfismo PON1-192 com maiores concentrações de glicose, insulina e triglicérides (coincidente com a associação desse alelo com a DAC e com a deficiência na hidrólise de peróxidos lipídicos na LDL demonstrada em alguns estudos), essa associação não foi significativa para a utilização desse parâmetro como indicador precoce de complicações em pacientes diabéticos tipo 2. Devemos considerar, ainda, que o tamanho da população analisada é, em geral, pequeno e que as conclusões obtidas são inerentes a essa amostragem. Estudos adicionais, com a participação de um número maior de indivíduos, deverão ser realizados para a confirmação dos resultados obtidos nesse trabalho.

7 CONCLUSÕES

- a) Os pacientes com diabetes mellitus tipo 2 apresentaram distribuição gênica e frequência alélica dos polimorfismos PON1-192 e PON2-311 semelhante aos indivíduos não diabéticos;
- b) A atividade paroxonase e arilesterase da enzima paroxonase de pacientes diabéticos tipo 2 foi semelhante à atividade observada em indivíduos controles;
- c) A atividade paroxonase foi maior nos portadores dos alelos PON1-192 R, independente da presença do diabetes mellitus tipo 2;
- d) A atividade paroxonase e arilesterase foi menor nos indivíduos do grupo controle portadores do genótipo PON2-311 SS;
- e) Os genótipos dos polimorfismos PON1-192 e PON2-311 não afetaram os parâmetros do controle glicêmico e do perfil lipídico nos pacientes diabéticos tipo 2, apesar de os pacientes portadores dos alelos PON1-192 R e PON2-311 C demonstrarem tendência para maiores níveis de glicose, insulina e triglicerídeos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, C.A.; MACKNESS, M.I.; KUMAR, S.; BOULTON, A.J.; DURRINGTON, P.N. Serum paraoxonase activity, concentration, and phenotype distribution in diabetes mellitus and its relationship to serum lipids and lipoproteins. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 15, p. 1812-1818, 1995.

ADKINS, S.; GAN, K.N., MODY, M.; LA DU, B.N. Molecular basis for the polymorphic forms of human serum paraoxonase/arylesterase: glutamine or arginine at position 191, for the respective A or B allozymes. **Am. H. Hum. Genet.**, v. 52, p. 598-608, 1993.

AGACHAN, B.; YILMAZ, H.; KARAALI, Z.; ISBIR, T. Paraoxonase 55 and 192 polymorphism and its relationship to serum paraoxonase activity and serum lipids in Turkish patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. **Cell. Biochem. Funct.**, v. 22, p. 163-168, 2004.

ALLEBRANDT, K.V.; SOUZA, R.L.R.; CHAUTARD- FREIRE-MAIA, E.A. Variability of the paraoxonase gene (PON1) in Euro- and Afro-brazilians. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 180, p. 151-156, 2002.

ANTIKAINEN, M.; MURTOMAKI, S.; SYVÄNNE, M.; PAHLMAN, R.; TAHVANAINEN, E.; JAUHAINEN, M.; FRICK HEIKKI, M.; EHNHOLM, C. The Gln-Arg 191 polymorphism of the human paraoxonase gene (HUMPONA) is not associated with risk of coronary artery disease in Finns. **J. Clin. Invest.**, v. 98, n. 4, p. 883-885, 1996.

ARONSON, D.; JOHNSTONE, M. T. Coronary Artery Disease in Diabetes. In: JOHNSTONE, M.T.; VEVES, A. **Diabetes and Cardiovascular Disease**. Contemporary Cardiology, Totowa, New Jersey: Humana Press, 2001.p. 247-300.

AUBÓ, C.; SENTÍ, M.; MARRUGAT, J.; TOMÁS, M.; VILA, J.; SALA, J.; MASIÁ, R. Risk of myocardial infarction associated with Gln/Arg 192 polymorphism in the human paraoxonase gene and diabetes mellitus. **Eur. Heart J.**, v. 21, n. 1, p. 33-38, 2000.

AVIRAM, M.; ROSENBLAT, M.; BISGAIER, C.L.; NEWTON, R.S.; PRIMO-PARMO, S.; LA DU, B.N. Paraoxonase inhibits high density lipoprotein oxidation and preserves its functions: a possible role for paraoxonase. **J.Clin. Invest.**, v. 101, p. 1581-1590, 1998.

AVIRAM, M. Macrophage foam cell formation during early atherogenesis is determined by the balance between pro-oxidants and anti-oxidants in arterial cells and blood lipoproteins. **Antioxid. Redox. Signal.**, v. 1, n. 4, p. 585-594, 1999a.

AVIRAM, M. Does paraoxonase play a role in susceptibility to cardiovascular disease? **Mol. Med. Today.**, v. 5, n. 9, p. 381-386, 1999b.

AVIRAM, M.; HARDAK, E.; VAYA, J.; MAHMOOD, S.; MILO, S.; HOFFMAN, A.; BILLICKE, S.; DRAGANOV, D.; ROSENBLAT, M. Human serum paraoxonase (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions: PON1 esterase and peroxidase-like activities. **Circulation**, v. 101, n. 2, p. 2510-2517, 2000.

AYUB, A.; MACKNESS, M.I.; ARROL, S.; MACKNESS, B.; PATEL, J.; DURRINGTON, P.N. Serum paraoxonase after myocardial infarction. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 19, p. 330-335, 1999.

BECKMAN, J.A., CREAGER, M.A., LIBBY, P. Diabetes and atherosclerosis: Epidemiology, pathophysiology, and management. **JAMA**, v. 287, n. 19, p. 2570-2581, 2002.

BENNET, J.C., PLUM, F. **Cecil Tratado de Medicina Interna** 20ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2 volumes, 1997.

BEIGUELMAN, B. A lei de Hardy e Weinberg. In: **Dinâmica dos genes nas famílias e nas populações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. p. 179-202, 1995.

BONAFE, M.; MARCHEGANI, F.; CARDELLI, M.; OLIVIERI, F.; CAVALLONE, L.; GIOVAGNETTI, S.; PIERI, C.; MARRA, M.; ANTONICELLI, R.; TROIANO, L.; GUERESI, P.; PASSERI, G.; BERARDELLI, M.; PAOLISSO, G.; BARBIERI, M.; TESEI, S.; LISA, R.; DE BENEDICTIS, G.; FRANCESCHI, C. Genetic analysis of paraoxonase (PON1) locus reveal and increased frequency of Arg192 allele in centenarians. **Eur. J. Hum. Genet.**, v. 10, p. 292-296, 2002.

BOZZA, A.; VELLOSE, A.P.R.; ATIÉ, J.; HALFOUN, V.L.R.C. Macroangiopatia. In: OLIVEIRA, J.E.P.de; MILECH, A. **Diabetes Mellitus Clínica, Diagnóstico e Tratamento Multidisciplinar**. São Paulo: Atheneu, 2004. p 125-143.

BOEMI, M.; LEVIEV, I.; SIROLLA, C.; PIERI, C.; MARRA, M.; JAMES, R. W. Serum paraoxonase is reduced in type 1 diabetic patients compared to non-diabetic, first degree relatives; influence on the ability of HDL to protect LDL from oxidation. **Atherosclerosis**, v. 155, n. 1, p. 229-235, 2001.

BOEMI, M.; SIROLLA, C.; TESTA, R.; CENERELLI, S.; FUMELLI, P.; JAMES, R.W. Smoking is associated with reduced serum levels of the antioxidant enzyme, paraoxonase, in type 2 diabetic patients. **Diabet. Med.**, v. 21, p. 423-427, 2004.

BURSTEIN, M., SCHOLINCK, H. R., MORFIN, R. Rapid method for the isolation of lipoproteins from human serum by precipitation with polyanions. **J. Lipid. Res.**, v. 11, n. 6, p. 583-595, 1970.

CARNEIRO, J.R.I. Impacto da cirurgia bariátrica no tratamento de diabetes mellitus. In: OLIVEIRA, J.E.P.de; MILECH, A. **Diabetes Mellitus Clínica, Diagnóstico e Tratamento Multidisciplinar**. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 265-271.

DAVIES, H.G.; RICHTER, R.J.; KEIFER, M.; BROOMFIELD, C.A.; SOWALLA, J.; FURLONG, C.E. The effect of the human serum paraoxonase polymorphism in reversed with diazoxon, soman and sarin. **Nat. Genet.**, v. 14, p. 334-336, 1996.

DEAKIN, S.; LEVIEV, I.; NICAUD, V. Paraoxonase-1 L55M polymorphism is associated with an abnormal oral glucose tolerance test and differentiates high risk coronary disease families. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 87, n. 3, p. 1268-1273, 2002.

- DONANGELO, I.; OLIVEIRA, J.E.P. Diabetes e Dislipidemias. In: OLIVEIRA, J.E.P.de; MILECH, A. **Diabetes Mellitus Clínica, Diagnóstico e Tratamento Multidisciplinar**. São Paulo: Atheneu, 2004. p 317-329.
- DRAGANOV, V.; BALUTSOV, M.; LAZAROV, S. Contemporary views on the etiology and pathogenesis of atherosclerosis **Vutr. Boles**, v. 32, n.4, p. 25-32, 2000.
- DRAGANOV, D.I.; LA DU, B.N. Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.**, v. 369, p. 78-88, 2004.
- DURRINGTON, P.N.; MACKNESS, M.I. Paraoxonase and atherosclerosis. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**,v. 21, p. 473-480, 2001.
- FANELLA, S.; HARRIS, S.B.; YOUNG, T.K.; HANLEY, A.J.; ZINMAN, B.; CONNELLY, P.W.; HEGELE, R.A. Association between PON1 L/M55 polymorphism and plasma lipoproteins in two Canadian aboriginal populations. **Clin. Chem. Lab. Med.**, v. 38, p. 413-420, 2000.
- FERRÉ, N.; TOUS, M.; PAUL, A.; ZAMORA, A.; VENDRELL, J.J.; BARDAJÍ, A.; CAMPS, J.; RICHARD, C.; JOVEN, J. Paraoxonase Gln-Arg (192) and Leu-Met (55) gene polymorphisms and enzyme activity in a population with a low rate of coronary heart disease. **Clin. Biochem.**, v. 35, p. 197-203, 2002.
- FRIEDEWALD, W.T.; LEVY, R.I.; FREDRICKSON, D.S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clin. Chem.**, v. 18, n. 6, 1972.
- GAN, K.N.; SMOLEN, A.; ECKERSON, H.W.; LA DU, B.N. Purification of serum paraoxonase/ arylesterase: evidence of one esterase catalysing both activities. **Drug. Metab. Dispos.**, v. 19, n. 1, p. 100-106, 1991.
- GARIN, M.C.B.; JAMES, R.W.; DUSSOIX, P.; BLANCHE, H.; PASSA, P.; FROGUEL, P.; RUIZ, J. Paraoxonase polymorphism Met-Leu54 is associated with modified serum concentration of enzyme: a possible link between the paraoxonase gene and increase risk of cardiovascular disease in diabetes. **J. Clin. Invest.**, v. 99, n. 99, p. 62-66, 1997.
- GENSCHEL, L. SCHMIDT, H.H. HDL metabolism **Z. Gastroenterol** v. 39, n. 4, p. 321-327, 2001.
- GINSBERG, H. N.; TUCK, C. Diabetes and Dyslipidemia. In: JOHNSTONE, M.T; VEVES, A.**Diabetes and Cardiovascular Disease**, Contemporary Cardiology, Totowa, New Jersey: Humana Press, 2001. p. 131-148,
- GIUGLIANO, D. Dietary antioxidants for cardiovascular prevention. **Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.**, v.10, p. 38-44, 2000.
- GORDON, D.J.; PROBSTFIELD, J.L.; GARRISON, R.J.; NEATON, J.D.; CASTELLI, W.P.; KNOKE, J.D.; JACOBS, D.R. Jr.; BANGDIWALA, S.; TYROLER, H.A. High density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease: four prospective American studies. **Circulation**, v. 79, p. 8-15, 1989.

HAFFNER, S.M.; LETHO, S.; RONNEMAA, T.; PYORALA, K.; LAAKSO, M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. **N. Engl. J. Med.**, v.339, n. 4, p. 229-34, 1998.

HALLIWEL, W.P.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 2nd ed., Oxford: Clarenton Press, 1999.

HEDRICK, C.C.; THORPE, S.R.; FU, M.X.; HARPER, C.M.; YOO, J.; KIM, S.M.; WONG, H.; PETERES, A.L. Glycation impairs high-density lipoprotein function. **Diabetologia**, v. 43, n. 3, p. 312-320, 2000.

HEGELE, R.A.; CONNELLY, P.W.; SCHERER, S.W.; HANLEY, A. J.G.; HARRIS, S.B.; TSUI, L.; ZINMAN, B. Paraoxonase-2 gene (PON2) G148 variant associated with elevated fasting plasma glucose in noninsulin-dependent diabetes mellitus. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 82, n. 10, p. 3373-3377, 1997.

HONG, S.H., SONG, J., MIN, W.K., KIM, J.Q. Genetic variations of the paraoxonase gene in patients with coronary artery disease **Clin. Biochem.**, v. 34, n. 6, p. 475-481, 2001.

HUMBERT, R.; ADLER, D.A.; DISTECHE, C.M.; HASSETT, C.; OMIECINSKI, C.J.; FURLONG, C.E. The molecular bases of human serum paraoxonase activity polymorphism. **Nat. Genet.**, v. 3, p. 73-76, 1993.

HU, F.B.; STAMPFER, M.J.; SOLOMON, C.G. The impact of diabetes mellitus on mortality from all causes and coronary heart disease in women. **Arch. Inter. Med.**, v. 161, p. 1717-1723, 2001.

HU, Y.; TIAN, H.; LIU, R. Gln-Arg192 polymorphism of paraoxonase 1 is associated with carotid intima-media thickness in patients of type 2 diabetes mellitus of Chinese. **Diab. Res. Clin. Pract.**, v. 61 p.21-27, 2003.

ICCMB- International Congress of Clinical Molecular Biology. Standardization and Quality Control of Molecular Biological Techniques in Clinical Laboratory. Firenze, Italy, 6-11 june, 1999. **Clin. Chem. Lab. Med.**, v.37, p.S35- S37, 1999.

IKEDA, Y.; SUEHIRO, T.; INOUE, M.; NAKAUCHI, Y.; MORITA, T.; ARII, K.; ITO, H.; KUMON, Y.; HASHIMOTO, K. Serum paraoxonase activity and its relationship to diabetic complications in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Metabolism**, v. 47, p. 598-602, 1998.

INOUE, M.; SUEHIRO, T.; NAKAMURA, T.; IKEDA, Y.; KUMON, Y.; HASHIMOTO, K. Serum arylesterase/diazoxonase activity and genetic polymorphisms in patients with type 2 diabetes. **Metabolism**, v. 49, n.11, p.1400-1405, 2000.

JAMES, R.W.; LEVIEV, I.; RUIZ, J. Promoter polymorphism T(-107)C of the paraoxonase PON1 gene is a risk factor for coronary heart disease in type 2 diabetic patients. **Diabetes**, v. 49, n. 8, p.1390-1393, 2000a.

JAMES, R.W.; LEVIEV, I.; RIGHETTI, A. Smoking is associated with reduced serum paraoxonase activity and concentration in patients with coronary artery disease. **Circulation**, v. 101, p. 2252-2257, 2000b.

KAO, Y.L.; DONAGHUE, K.; CHAN, A.; KNIGHT, J.; SILINK, M. A variant of paraoxonase (PON1) gene is associated with diabetic retinopathy in IDDM. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 83, p. 2589-2592, 1998.

KAPLAN, M.; AVIRAM, M. Oxidized low density lipoprotein: atherogenic and proinflammatory characteristics during macrophage foam cell formation. An inhibitory role for nutritional antioxidants and serum paraoxonase **Clin. Chem. Lab. Med.**, v.37, n.8, p.777-787, 1999.

KLEEMOLA, P.; FREESE, R.; JAUHAINEN, M.; PAHLMAN, R.; ALFTHAN, G.; MUTANEN, M. Dietary determinants of serum paraoxonase activity in healthy humans. **Atherosclerosis**, n.160, p. 425-432, 2002

KLIMOV, A.N.; KOZHEMYAAKIN, L.A.; PLESKOV, V.M.; ADREEVA, L. Antioxidative effect of high density lipoproteins in the oxidation of low density lipoproteins. **Bull. Exp. Biol. Med.**, v. 103, p. 103-106, 1987.

KOCH, M.; HERING, S.; BARTH, C. Paraoxonase 1 192 Gln/Arg gene polymorphism and cerebrovascular disease: interaction with type 2 diabetes. **Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes**. v. 109, n. 3, p. 141-145, 2001.

KOYA, D.; KING, G.L. Protein Kinase C activation and the development of diabetic complications. **Diabetes**, v. 47, p. 859-866, 1998.

KOPPRASCH, S.; PIETZSCH, J.; KUHLISCH, E.; FUECKER, K.; TEMELKOVKURKTSCHIEV, T.; HANEFELD, M.; KUHNE, H.; JULIUS, U.; GRAESSLER, J. In vivo evidence for increase oxidation of circulating LDL in impaired glucose tolerance. **Diabetes**, v. 51, n. 10, p. 3102-3106, 2002.

KOPPRASCH, S.; PIETZSCH, J.; KUHLISCH, E.; GRAESSLER, J. Lack of association between serum paraoxonase 1 activities and increased oxidized low-density lipoprotein levels in impaired glucose tolerance and newly diagnosed diabetes mellitus. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 88, p. 1711-1716, 2003.

KWITEROVICH, P.O. J. The antiatherogenic role of high-density lipoprotein cholesterol. **Am. J. Cardiol.**, v. 82, p. 13Q-21Q, 1998.

LA DU, B.N. Structural and functional diversity of paraoxonases. **Nature Med.** v. 2, p. 1186-1187, 1996.

LEUS, R.F.; ZWART, M.; KASTELEIN, J.J.P.; VOORBIJ, A.M. PON2 gene variants are associated with clinical manifestations of cardiovascular disease in familial hypercholesterolemia patients. **Atherosclerosis**, v. 154, p. 641-649, 2001.

LEVIEV, I.; KALIX, B.; BRULHART MEYNET M.C.; JAMES, R.W. The paraoxonase PON1 promoter polymorphism C(-107)T is associated with increased serum glucose concentrations in non-diabetic patients. **Diabetologia**, v. 44, n. 9, p. 1177-1183, 2001.

LI, W.F.; COSTA, L.G.; RICHTER, R.J.; HAGEN, T; SHIH, D.; TWARD, A.; LUSIS, A.J.; FURLONG, C.E. Catalytic efficiency determines the in vivo efficacy of PON1 for detoxifying organophosphorus compounds. **Pharmacogenetics**, v. 10, p. 767-779, 2000.

LI, H.L.; LIU, D.P.; LIANG, C.C. Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress, and diseases. **J. Mol. Med.**, v. 81, p. 766-779, 2003.

MACKNESS, M.I., ARROL, S., ABBOTT, C., DURRINGTON, P.N. Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase. **Atherosclerosis**, v. 104, p. 129-135, 1984.

MACKNESS, M.I. "A"-esterases. Enzymes looking for a role? **Biochem. Pharmacol.**, v. 38, p. 385-390, 1989.

MACKNESS, M.I.; ARROL, S.; DURRINGTON, P.N. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. **FEBS Lett.**, v. 286, p. 152-154, 1991.

MACKNESS, M.I.; HARTY, B.; BHATNAGAR, D.; WINCOUR, P.H.; ARROL, S.; ISHOLA, M.; DURRINGTON, P.N. Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolaemia and insulin dependent diabetes mellitus. **Atherosclerosis**, v. 86, p. 193-199, 1991.

MACKNESS M.I.; DURRINGTON P.N. HDL, its enzymes and it potential to influence lipid peroxidation. **Atherosclerosis**, v. 115, p. 243-253, 1995.

MACKNESS, M.I.; MACKNESS, B.; DURRINGTON, P.N.; CONNELLY, P.W.; HEGELE, R.A. Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. **Curr. Opin. Lipidol.**, v. 7, p. 69-76, 1996.

MACKNESS, B.; MACKNESS, M.I.; ARROL, S.; TURKIE, W.; DURRINGTON, P.N. Effect of the human serum paraoxonase 55 and 192 genetic polymorphisms on the protection by high density lipoprotein against low density lipoprotein oxidative modification. **FEBS Let.**, v. 423, p. 57-60, 1998.

MACKNESS, B.; DURRINGTON, P.N.; MACKNESS, M.I. Polymorphisms of paraoxonase genes and low-density lipoprotein lipid peroxidation. **Lancet**, v. 353, p. 468-469, 1999.

MACKNESS, B.; DURRINGTON, P.N.; ABUASHIA, B.; BOULTON, A.J.; MACKNESS, M.I. Low paraoxonase activity in type II diabetes mellitus complicated by retinopathy. **Clin. Sci.**, v. 98, p. 355-363, 2000.

MACKNESS, B.; DAVIES G.K; TURKIE, W.; LEE, E.; ROBERTS, D.H.; HILL, E.; ROBERTS, C.; DURRINGTON, P.N.; MACKNESS, M.I. Paraoxonase status in coronary heart disease: are activity and concentration more important than genotype? **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 21, n. 9, p.1451-1457, 2001.

MACKNESS, M.I.; MACKNESS, B.; DURRINGTON, P.N. Paraoxonase and coronary heart disease. **Atheroscl. Supp.**, n. 3, p. 49-55, 2002.

MACKNESS, M.I.; MACKNESS, B. Paraoxonase 1 and atherosclerosis: is the gene or the protein more important? **Free Radic. Biol. Med.**, v. 37, p. 1317-1323, 2004.

MALIN, R.; HUANG, X.H.; WIRTA, O.; RANTALAIHO, V.; PASTERNAK, A.; JOKELA, H.; KOIVULA, T.; LEHTIMÄKI, T. The Met54Leu polymorphism of paraoxonase

(PON) enzyme gene is not a genetic risk factor for non-insulin-dependent diabetes mellitus in Finns. **Clin. Genet.**, v. 54, p. 254-255, 1998.

MALIN, R.; LOIMAALA, A.; NENONEM, A.; MERCURI, M.; VUORRI, I.; PASANEN, M.; OJA, P.; BOND, G.; KOIVULA, T.; LEHTIMÄKI, T. Relationship between high-density lipoprotein paraoxonase gene M/L 55 polymorphism and carotid atherosclerosis differs in smoking and nonsmoking men. **Metabolism**, v. 50, p. 1095-1101, 2001.

McELVEEN, J.; MACKNESS, M.I.; COLLEY, C.M.; PEARD, T.; WARNER, S.; WALKER, C.H. Distribution of paraoxon hydrolytic activity in serum of patients after myocardial infarction. **Clin. Chem.**, v. 32, p. 671-673, 1986.

MERTENS, A.; HOLVOET, P. Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherotrombosis. **FASEB J.**, v. 15, p. 2073-2084, 2001.

MION, D.; MACHADO, C.A.; GOMES, M.A.M.; NOBRE, F.; KOHLMANN, O.; AMODEO, C.; PRAXEDES, J.N.; PASCOAL, I.; MAGALHÃES, L.C. IV Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 82, supl. IV, 2004.

MOORADIAN, A.D. Cardiovascular disease in type 2 diabetes mellitus: current management guidelines. **Arch. Intern. Med.**, v. 163, n. 1, p. 33-40, 2003.

MURATA, M.; NAKAGAWA, M.; TAKAHASHI. Molecular variant of human paraoxonase/arylesterase gene is associated with central retinal vein occlusion in the Japanese population. **Ophthalmologica**, v. 212, p. 257-259, 1998.

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTHY, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (acessado em junho de 2002).

NAVAB, M.; HAMA-LEVY, S.; VAN LENTEN, B.J.; FONAROW, G.C.; CARDINEZ, C.J.; CASTELLANI, L.W.; BRENNAN, M.L.; LUSIS, A.J.; FOGELMAN, A.M.; LA DU, B.N. Mildly oxidized LDL induces an increased apolipoprotein J/paraoxonase ratio. **J. Clin. Invest.**, v. 99, p. 2005-2009, 1997.

NAVAB, M.; HAMA, S.Y.; COOKE, C.J.; ANANTHARAMAIAH, G.M.; CHADDHA, M.; JIN, L.; SUBBANAGOUNDER, G.; FAULL, K.F.; REDDY, S.T.; MILLER, N.E.; FOGELMAN, A.M. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: step 1. **J. Lipid Res.**, v. 41, p. 1481-1494, 2000.

ODAWARA, M.; TACHI, Y.; YAMASHITA, K. Paraoxonase polymorphism (Gln192-Arg) is associated with coronary heart disease in Japanese noninsulin-dependent diabetes mellitus. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 82, n. 7, p. 2257-2262, 1997.

OLIVIERA, J. E. P.; MILECH, A. **Diabetes Mellitus- clínica, diagnóstico e tratamento multidisciplinar**. Atheneu, São Paulo, 2004.

OSEI-HYIAMAN, D.; HOU, L.; MENGBAI, F.; ZHIYIN, R.; ZHIMING, Z.; KANO, K. Coronary artery disease risk in Chinese type 2 diabetics: is there a role for paraoxonase 1 gene (Q192R) polymorphism? **Eur. J. Endocrinol.**, v. 144, p. 639-644, 2001.

PFOHL M.; KOCH, M.; ENDERLE, M.D.; KUHN, R.; FULLHASE, J.; KARSCH, K.R.; HARING, H.U. Paraoxonase: Gln/Arg gene polymorphism, coronary artery disease and myocardial infarction in type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 48, n. 3, p. 623-627, 1999.

PINIZZOTTO, M.; CASTILLO, E.; FIAUX, M.; TEMPLER, E.; GAILLARD, R.C.; RUIZ, J. Paraoxonase 2 polymorphisms are associated with nephropathy in type II diabetes. **Diabeteologia**, v. 44, p. 104-107, 2001.

PORTO, C.C. **Doenças do coração – Prevenção e tratamento**. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, 1998.

RAHMANI, M.; RAISZADEH, F.; ALLAHVERDIAN, S.; KIAII, S.; NAVAB, M; AZIZI, F. Coronary artery disease is associated with the ratio of apolipoprotein A-I/B and serum concentration of apolipoprotein B, but not with paraoxonase enzyme activity in Iranian subjects. **Atherosclerosis**, v. 162, p. 381-389, 2002.

ROSS, R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. **Nature**, v. 362 p. 801-809, 1993.

RUIZ, J.; BLANCHÉ, H.; JAMES, R.W.; GARIN, M.C.; VAISSE, C.; CHARPENTIER, G.; COHEN, N.; MORABIA, A.; PASSA, P.; FROGUEL, P. Gln-Arg192 polymorphisms of paraoxonase and coronary heart disease in type 2 diabetes. **Lancet**, v. 346, p. 869-872, 1995.

RUIZ, J. Diabetes mellitus and the late complications: influence of genetics factors. **Diabetes Metab.**, v. 23, p. 57-63, 1997.

SAKAI, T.; MATSUURA, B.; ONJI, M. Serum paraoxonase activity and genotype distribution in Japanese patients with diabetes mellitus. **Intern. Med.**, v. 37, p. 581-584, 1998.

SALAZAR, L.A.; HIRATA, M.H.; CAVALLI, S.A., MACHADO, M.O.; HIRATA, R.D.C. Optimized procedure for DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. **Clin. Chem.**, v. 44, n. 8, p. 1748-1750, 1998.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.R.; MANIATIS, T. Gel electrophoresis of DNA In: **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2 ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. Cap. 6, p. 6.3-6.19.

SANGHERA, D.K.; SAHA, N.; ASTON, C.E.; SAHA, N.; KAMBOH, I. Genetic polymorphisms of paraoxonase and the risk of coronary heart disease. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 17, p. 1067-1073, 1997.

SANGHERA, D.K.; ASTON, C.E.; SAHA, N.; KAMBOH, M.I. DNA polymorphisms in two paraoxonase genes (PON1 and PON2) are associated with risk of coronary heart disease. **Am. J. Human Genet.**, v. 62, p. 36-44, 1998.

SANGUINETTI, S.M.; BRITES, F.D.; FASULO, V.; VERONA, J.; ELBERT, A.; WIKINSKI, R.L.W.; SCHEIER. HDL oxidability and its protective effect against LDL oxidation in type 2 diabetic patients. **Diab. Nutr. Metab.**, v. 14, p. 27-36, 2001.

SANTOS, R.D.; GIANNINI, S.D.; FONSECA, F.H.; MORIGUCHI, E.H.; MARANHÃO, R.C.; LUZ, P.L.; LIMA, J.C.; SALGADO-FILHO, W.; AVEZUM, A.; DUNCAM, B.; LOURES-VALE, A.A.; SANTOS, J.E.; BERTOLAMI, M.C.; FALUDI, A.A.; FONSECA, F.H. III Diretrizes brasileiras sobre dislipidemias e diretriz de prevenção da aterosclerose do departamento de aterosclerose da sociedade brasileira de cardiologia. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 77, p. 15-18, supl. III, São Paulo, 2001.

SECCHIERO, S.; MUSSAP, M.; ZANINOTTO, M. Serum arylesterase (paraoxonase) activity following myocardial infarction. **Clin. Chem. Acta.**, v. 183, p. 71-76, 1989.

SENTÍ, M.; AUBO, C.; TOMAS, M. Differential effects of smoking on myocardial infarction risk according to the Gln/Arg 192 variants of the human paraoxonase gene. **Metabolism**, v. 49, p. 557-559, 2000.

SERES, I.; PARAGH, G.; DESCHENE, E.; FULOP, T.; KHALIL, A. Study of factors influencing the decreased HDL associated PON1 activity with aging. **Exp. Geront.**, v. 39, p. 59-66, 2004.

SERRATO, M.; MARIAN, J. A variant of human paraoxonase/arylesterase (HUPONA) gene is a risk factor for coronary artery disease. **J. Clin. Invest.**, v. 96, p. 3005-3008, 1995.

SIM-Sistema de Informações sobre Mortalidade- Ministério da Saúde. Brasil, 2000, em: <http://www.datasus.gov.br>.

SMITH, S.C.; JACKSON, R.; PEARSON, T.A.; FUSTER, V.; YUSUF, S.; PHIL, D.; FAERGEMAN, O.; WOOD, D.A.; ALDERMAN, M.; HORGAN, J.; HOME, P.; HUNN, M.; GRUNDY, S. M. Principles for national and regional guidelines on cardiovascular disease prevention. A scientific statement from the world heart and stroke forum. **Circulation**, v. 109, p. 3112-3121, 2004.

SORENSEN, R.C.; BISGAIER, C.L.; AVIRAM, M.; HSU, C.; BILLECKE, S. LA DU, B.N. Human serum paraoxonase/arylesterase's retained hydrophobic N-terminal leader sequence associates with HDLs by binding phospholipids: apolipoprotein A-I stabilizes activity. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 19, n. 9, p. 2214-2225, 1999.

SOZMEN, E.Y.; SOZMEN, B.; GIRGIN, F.K. Antioxidant enzymes and paraoxonase show a co-activity in preserving low-density lipoprotein from oxidation. **Clin. Exp. Med.**, v. 1, n. 4, p. 195-199, 2001.

SUTHERLAND, W.H.F., WALKER, R.J., JONG, S.A., VAN RIJ, A.M., PHILLIPS, V., WALKER, H.L. Reduced postprandial serum paraoxonase activity after a meal rich in used cooking fat. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 19, p. 1340-1347, 1999.

THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP (DCCT): The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. **N. Engl. J. Med.**, v. 329, p. 977-986, 1993.

TOMÁS, M.; ELOSUA, R.; SENTÍ, M. Paraoxonase1-192 polymorphism modulates the effects of regular and acute exercise on paraoxonase 1 activity. **J. Lipids Research**, v. 43, p. 713-720, 2002.

TOMÁS, M; LATORRE , G.; SENTÍ, M.; MARRUGAT, J. The antioxidant function of high density lipoproteins: a new paradigm in atherosclerosis. **Rev. Esp. Cardiol.**, v. 57, n. 6, p. 557-569, 2004.

UNITED KINGDOM PROSPECTIVE DIABETES STUDY GROUP (UKPDS): Intensive blood glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes. **Lancet**, v. 352, p. 837-853, 1998.

VAN LENTEN, B.J.; NAVAB, M.; SHIH, D.; FOGELMAN, A.M.; LUSIS, A.J. The role of high-density lipoproteins in oxidation and inflammation. **Trends. Cardiovasc. Med.**, v. 11, n. 3/4, p. 155-161, 2001.

VLISSARA, H.; PALACE, M.R. Diabetes and advanced glycation endproducts. **J. Intern. Med.**, v. 251, n. 2, p. 87-101, 2002.

WATSON, A.D.; BERLINER, J.A.; HAMA, S.Y.; LA DU, B.N.; FAULL, K.F.; FOGELMAN, A.M.; NAVAB, M. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase: inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. **J. Clin. Invest.**, v. 96, p. 2882-2891, 1995.

WATZINGER, N.; SCHMIDT, H.; SCHUMACHER, M.; SCHMIDT, R.; EBER, B.; FRUHWALD, F.M.; ZWEIKER, R.; KOSTNER, G.M.; KLEIN, W. Human paraoxonase 1 gene polymorphisms and the risk of coronary heart disease: a community-based study. **Cardiology**, v. 98, p. 116-122, 2002.

WHEELER, J G.; KEAVNEY, B.D.; WATKINS, H.; COLLINS, R.; DANESH, J. Four paraoxonase gene polymorphisms in 11212 cases of coronary heart disease and 12786 controls: meta-analysis of 43 studies. **Lancet**, v. 363, p. 689-695, 2004.

ZAJDENEVERG, L. Monitorização e critérios de bom controle. In: OLIVEIRA, J.E.P.de; MILECH, A. **Diabetes Mellitus Clínica, Diagnóstico e Tratamento Multidisciplinar**. São Paulo: Atheneu, 2004. p 99-112.

ZAMA, T.; MURATA, M.; MATSUBARA, Y.; KAWANO, K.; AOKI, N.; YOSHINO,H.; WARANBE, G.; ISHIKAWA, K.; IKEDA, Y.A ¹⁹²Arg variant of the human paraoxonase (HUMPONA) gene polymorphism is associated with an increased risk for coronary artery disease in the Japanese. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 17, n.12, p. 3565-3569, 1997.

ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS
 CAMPUS UNIVERSITÁRIO – TRINDADE
 CEP.: 88040-970 - FLORIANÓPOLIS – SANTA CATARINA
 TEL.: (048) 331-9712 / 331- 9856 – FAX.: (048) 331-9542

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O (A) senhor (a) está sendo convidado a participar de um estudo, onde pretende-se avaliar a presença do polimorfismo genético da enzima paraoxonase (diferenças na estrutura da enzima, modificando a sua atividade) em pacientes diabéticos.

Este estudo é necessário porque acredita-se que o risco de desenvolver doenças do coração esteja relacionado à presença de diferenças na estrutura da enzima paraoxonase (polimorfismo). Supõe-se que esta enzima seja um dos fatores envolvidos na proteção de doenças do coração.

Precisamos de sua colaboração e autorização para uma coleta de sangue (três tubos) em jejum de 12 horas. Isto traz apenas o desconforto de uma coleta de sangue, mas esperamos que traga benefícios, tais como a possibilidade de conhecimento de novos fatores de risco para doenças do coração.

Esta pesquisa não oferece riscos, não tem fins lucrativos, é confidencial, o seu nome servirá apenas para que você possa receber o resultado do exame. As amostras serão identificadas pelo número do seu cadastro.

O (A) senhor (a) poderá se beneficiar diretamente dos resultados obtidos caso este seja de interesse clínico.

Sua participação é voluntária, podendo desistir desta pesquisa em qualquer de suas fases.

Se você tiver alguma dúvida em relação ao estudo ou não quiser mais fazer parte do mesmo, pode entrar em contato pelos telefones 99601492 ou 234-2727 (Elisangela) ou 3319712 (prof. Edson). Se você estiver de acordo em participar, posso garantir que as informações fornecidas serão confidenciais (ou material coletado) e só serão utilizados neste trabalho.

Eu, abaixo assinado concordo em fornecer amostra de sangue para realização deste estudo.

 Nome do paciente

 Assinatura

 Data

Elisangela Catapan
 Nome do pesquisador

 Assinatura

Tel. Contato: 9960-1492



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS
 CAMPUS UNIVERSITÁRIO – TRINDADE
 CEP.: 88040-970 - FLORIANÓPOLIS – SANTA CATARINA
 TEL.: (048) 331-9712 / 331- 9856 – FAX.: (048) 331-9542

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Eu, _____, fui esclarecido sobre a pesquisa Polimorfismo genético da enzima Paraoxonase (PON) em pacientes diabéticos e concordo que meus dados sejam utilizados na realização da mesma.

Florianópolis, ____ de _____ de 2002.

Assinatura: _____ RG: _____

**ANEXO B - PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITE DE ÉTICA EM
PESQUISA COM SERES HUMANOS**

ANEXO C – QUESTIONÁRIO – AVALIAÇÃO CLÍNICA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS
 CAMPUS UNIVERSITÁRIO – TRINDADE
 CEP.: 88040-970 - FLORIANÓPOLIS – SANTA CATARINA
 TEL.: (048) 331-9712 / 331- 9856 – FAX.: (048) 331-9542

Projeto de pesquisa: Polimorfismo da enzima Paraoxonase

Questionário – Avaliação Clínica

Identificação: Paciente N° _____ Grupo: _____
 Nome: _____
 N° Protocolo (cadastro) _____
 Sexo: masculino feminino Estado civil: _____
 Data do nascimento: ____/____/____ Idade: _____
 Peso: _____ Kg Altura: _____ cm IMC: _____
 Raça: branco pardo amarelo negro
 Descendência: _____
 Ocupação: _____
 Endereço: _____ Bairro: _____
 Cidade: _____
 Estado: _____ Cep.: _____ Telefone: _____
 Dados Complementares: _____

Fatores de Risco:

1. Hipertensão arterial: sim não
2. Diabetes: sim não Última glicose: _____
3. Dislipidemia: sim não
4. Histórico Familiar de Diabetes: sim não Parentesco: _____
5. Tabagista: sim não N° cigarros: _____ Passado Parou há: _____
6. Antecedentes Familiares da DAC (infarto, AVC): sim não
7. Problema respiratório: _____

Antecedentes Morbidades

1. Cirurgias: _____
2. Internações: _____
3. Doenças: _____
4. Angina Pectoris: sim não Início: ____/____/____
5. Infarto do Miocárdio: Sim Não Data: ____/____/____
6. DAC em outro local: Cérebro Periférico Aorta Renal Intestino
7. Pés: _____

Hábitos

1. Atividade Física: sim não

Frequência: _____

2. Bebida Alcoólica: sim não Diário 1-3x semana

Tipo da bebida: _____

3. Stress: sim não

4. Medicamentos: Frequente sim não

Quais: _____

Insulina: _____ (há quanto tempo)

Vitaminas: _____

Chimarrão: _____

Observações

Para uso do pesquisador:

Bioquímica Data: _____

Glicemia: _____

Hemoglobina glicada: _____

Colesterol Total _____

HDL _____ LDL _____ VLDL _____ Triglicérides _____

Observações _____
