

Associação do Genótipo e Fenótipo da Paraoxonase-1 com Angiografia Positiva para Doença Arterial Coronariana

Association of Paraoxonase-1 Genotype and Phenotype with Angiogram Positive Coronary Artery Disease

Sara Saffar Soflaei,^{1*} Mojtaba Baktashian,^{1*} Kiana Hosseinpour Moghaddam,² Maryam Saberi-Karimian,³ Negin Kosari,¹ Seyed Mohammad Hashemi,⁴ Mohsen Mouhebati,⁵ Mahsa Amini,¹ Mashallah Dehghani,⁵ Habibollah Esmaily,⁶ Mahmoud Ebrahimi,⁵ Homa Falsoleiman,⁵ Abolfazl Nosrati-Tirkani,⁷ Fatemeh Sadabadi,¹ Gordon A. Ferns,⁸ Mansoor Salehi,⁹ Alireza Pasdar,^{1,10} Majid Ghayour-Mobarhan^{3,5}

International UNESCO Center for Health-Related Basic Sciences and Human Nutrition, Mashhad University of Medical Sciences,¹ Mashhad – Irã
Department of Biology, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad,² Mashhad – Irã

Metabolic Syndrome Research Center, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences,³ Mashhad – Irã

Department of Cardiology, Chamran Hospital, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences,⁴ Isfahan – Irã

Cardiovascular Research Center, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences,⁵ Mashhad – Irã

Department of Biostatistics and Epidemiology, School of Health, Mashhad University of Medical Sciences,⁶ Mashhad – Irã

Biochemistry of Nutrition Research Center, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences,⁷ Mashhad – Irã

Brighton & Sussex Medical School, Division of Medical Education,⁸ Falmer, Brighton – Reino Unido

Department of genetics, Faculty of medicine and genetics laboratory AL Zahra hospital, Isfahan University of Medicine,⁹ Isfahan – Irã

Division of Applied Medicine, Medical School, University of Aberdeen,¹⁰ Foresterhill, Aberdeen – Reino Unido

*Os autores contribuíram igualmente

Resumo

Fundamento: Tem sido demonstrado que um aumento dos níveis séricos de PON1 é protetor contra vários distúrbios. Foi relatado que vários polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs, *single nucleotide polymorphisms*) do gene PON1 estão associados a níveis e atividade de proteínas enzimáticas séricas.

Objetivos: Investigar a associação de SNPs do PON1 e atividade da paraoxonase sérica com a doença arterial coronariana (DAC).

Métodos: Foram estudados 601 pacientes não relacionados submetidos à angiografia coronária, incluindo aqueles com estenose >50% (N=266) e aqueles com estenose <30% (N=335). Os SNPs rs662 e rs840560 do gene da paraoxonase foram determinados utilizando o método ARMS-PCR e o SNP rs705379 foi genotipado utilizando análise de PCR-RFLP. A atividade da paraoxonase sérica foi medida utilizando paraoxon como substrato. O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

Resultados: A atividade da paraoxonase sérica não foi significativamente diferente entre os grupos de estudo. Após ajuste para idade, sexo, hipertensão, diabetes mellitus e dislipidemia, o genótipo GG e o modelo codominante de rs662 foram positivamente associados a uma angiografia positiva (respectivamente, OR = 2,424, IC 95% [1,123-5,233], $p < 0,05$, OR = 1,663, IC 95% [1,086-2,547]). A atividade da paraoxonase sérica foi significativamente maior no alelo G e variante GG do polimorfismo rs662, alelo A e variante AA de rs854560 e alelo C e variante CC de rs705379. A análise de haplótipos mostrou que o haplótipo ATC foi significativamente mais prevalente no grupo com angiografia negativa. A análise entre os grupos indicou que o alelo A de rs662 foi significativamente associado à menor atividade da paraoxonase no grupo com angiografia positiva ($p=0,019$).

Conclusões: A presença do alelo G do polimorfismo de nucleotídeo único rs662 está independentemente associada ao aumento do risco de DAC.

Palavras-chave: Doença da Artéria Coronariana; Angiografia; Arildialquilfosfatase.

*<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>

Correspondência: Majid Ghayour-Mobarhan •

Metabolic Syndrome Research Center, School of Medicine, Mashhad – University of Medical Sciences, 99199-91766, Mashhad – Irã

E-mail: GhayourM@mums.ac.ir

Artigo recebido em 12/06/2021, revisado em 02/03/2022, aceito em 06/04/2022

DOI: <https://doi.org/10.36660/abc.20210422>

Abstract

Background: It has been shown that increased serum PON1 levels are protective against several disorders. Several single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the PON1 gene have been reported to be associated with serum enzyme protein levels and activity.

Objective: To investigate the association of SNPs of PON1 and serum paraoxonase activity with coronary artery disease (CAD).

Methods: A total of 601 unrelated patients who underwent coronary angiography including those who had >50% stenosis (N=266) and those with <30% stenosis (N=335) were studied. The Paraoxonase gene rs662 and rs840560 SNPs were determined using the ARMS-PCR method and the rs705379 SNP was genotyped using PCR-RFLP analysis. Serum paraoxonase activity was measured using paraoxon as a substrate. A p value of $p < 0.05$ was considered as significant.

Results: Serum paraoxonase activity was not significantly different between the study groups. After adjustment for age, sex, hypertension, diabetes mellitus and dyslipidemia, the GG genotype and co-dominant model of rs662 was positively associated with a positive angiogram (respectively, OR=2.424, 95%CI [1.123-5.233], $p < 0.05$, OR=1.663, 95%CI [1.086-2.547]). Serum paraoxonase activity was significantly higher in the G allele and GG variant of rs662, A allele and AA variant of rs854560 and C allele and CC variant of rs705379. The haplotype analysis has shown that the ATC haplotype was significantly more prevalent among the angiogram negative group. The analysis between groups indicated that the A allele of rs662 was significantly associated with lower paraoxonase activity in the positive angiogram group ($p = 0.019$).

Conclusions: The presence of the G allele of the rs662 single nucleotide polymorphism is independently associated to increased risk of CAD.

Keywords: Coronary Artery Disease; Angiography; Aryldialkylphosphatase.

Full texts in English - <https://abccardiol.org/en/>

Introdução

A Organização Mundial da Saúde (OMS) relata que 71% das mortes a cada ano são devido a doenças não transmissíveis, das quais, 43% são devido à doença arterial coronariana (DAC).¹ Isso também foi relatado como sendo de aproximadamente 46% no Irã em 2019,² onde a prevalência de DAC está aumentando.^{3,4}

O estresse oxidativo tem um papel fundamental no início e progressão da aterosclerose,⁵ bem como na patogênese da DAC e seus desfechos relacionados.⁶ Tem sido demonstrado que a lipoproteína de alta densidade (HDL, *high-density lipoprotein*) possui propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias nas quais a paraoxonase 1 (PON1) pode desempenhar um papel, diminuindo a produção de lipoproteína de baixa densidade (LDL, *low-density lipoprotein*) oxidada durante o processo de peroxidação lipídica. A PON1 é uma esterase cálcio-dependente, cuja concentração sérica difere por etnia e geograficamente. Foi demonstrado que a diminuição da atividade de PON1 está associada a condições em que há estresse oxidativo, incluindo síndrome metabólica, DAC, Alzheimer e envelhecimento, e nesse caso, níveis aumentados de PON1 podem ser protetores.⁷ O *cluster* de genes da paraoxonase codifica três membros distintos, PON1-PON2 e PON3, localizados no cromossomo 7q21.3. Mais de 160 polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs, *single nucleotide polymorphisms*) foram identificados para o gene PON1,⁸ dos quais rs662, rs854560, rs705379 são descritos como associados aos níveis e atividade de proteínas enzimáticas séricas. Os SNPs rs662 e rs850560 estão localizados dentro de regiões codificadoras e resultam em uma substituição de aminoácidos^{9,10} enquanto o terceiro polimorfismo, rs705379, está localizado na região promotora.¹¹ A presença do rs662 resulta em uma substituição de glutamina por arginina, aumenta a taxa de hidrólise de paraoxon e clorpirifós-oxon. Enquanto o polimorfismo rs850560, uma substituição do aminoácido leucina para metionina, também está associado à diminuição da PON1¹² sérica. O SNP rs705379 ocorre no local de ligação do fator de transcrição Sp1, e tem o maior

efeito sobre a expressão de PON1.¹¹ Esse polimorfismo é responsável por aproximadamente 30% das variações nos níveis plasmáticos de PON1. O alelo C de rs705379 está associado a um aumento da atividade do promotor e, portanto, a expressão do gene PON1 é aumentada.¹³ Além disso, vários estudos mostraram que esse polimorfismo está associado a um risco aumentado de DAC, especialmente em jovens¹⁴⁻¹⁶ e em indivíduos com diabetes tipo 2.¹⁷

Como a DAC é uma doença importante em relação à mortalidade e os estudos mostram que existe uma associação entre PON1 e DAC, decidiu-se investigar essa associação na sociedade iraniana, principalmente no nordeste do país.¹⁸ Existem poucos estudos sobre a associação entre o genótipo ou fenótipo de PON1 e DAC no nordeste do Irã,¹⁹⁻²¹ e a atividade enzimática sérica não foi estudada juntamente com polimorfismos. O objetivo do presente estudo foi avaliar a associação entre polimorfismos de PON1 e atividade da paraoxonase com DAC em adultos iranianos que vivem no nordeste do país.

Material e Métodos

Desenho e população do estudo

Esse estudo de caso-controle foi realizado entre dezembro de 2014 e abril de 2017; foram recrutados 601 pacientes iranianos não relacionados que foram submetidos à angiografia coronária eletiva. Os pacientes foram encaminhados para angiografia devido a dor torácica ou sintomas equivalentes, como dispneia aos esforços. Com base nos resultados da angiografia, os pacientes foram divididos em dois grupos: aqueles com doença arterial coronariana obstrutiva com estenose coronariana >50% em pelo menos uma artéria coronária (N=266) (angiografia positiva) e pacientes com doença arterial coronariana não obstrutiva com estenose <30% nas artérias coronárias (N=335) (angiografia negativa).

Os dados demográficos incluindo sexo, idade, histórico de tabagismo, histórico progresso de diabetes mellitus

(DM), hipertensão (HAS) e dislipidemia foram coletados dos prontuários médicos. A pressão arterial sistólica (PAS) e a pressão arterial diastólica (PAD) foram medidas imediatamente antes do procedimento. Pacientes com doença autoimune, câncer ativo, trombofilia ou doença renal crônica foram excluídos.

As amostras de sangue foram coletadas antes do procedimento em tubos contendo EDTA para extração de DNA e em tubos sem anticoagulante para medida da atividade da paraoxonase. O soro foi separado por centrifugação do sangue por 15 min a 1000 rpm, que é velocidade recomendada pelo fabricante (BEHDA, Irã) e armazenado a -80°C.

Genotipagem

O DNA foi extraído do sangue com EDTA, utilizando um kit de isolamento de DNA genômico (Genet bio, Coreia) com base nas instruções do fabricante. A pureza e a quantificação do DNA foram determinadas por espectrofotometria UV (Infinito 200PRONanoQuant, Tecan).

Três SNPs dos genes PON1 foram genotipados. Utilizamos o método duplo ARMS-PCR para os SNPs rs662 e rs854560 e o método PCR-RFLP para o SNP rs705379. Detalhes sobre os primers utilizados e as condições de PCR são detalhados no Suplemento 1. A eletroforese em gel foi realizada utilizando agarose 2% com tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) para os três SNPs. Para determinar os genótipos de rs705379, foram utilizadas 5 unidades de Bsh1236I (Thermo Scientific) por 16 horas a 37°C. O produto da PCR 109bp foi cortado em fragmentos de 67pb e 42pb e visualizado com Transiluminador UV. O sequenciamento foi realizado para confirmar a precisão das técnicas de genotipagem.

Atividade da paraoxonase

A atividade da paraoxonase foi medida pela adição de 10 μ L de soro a 290 μ L de tampão Tris-HCl (100mmol/L, pH=8,0) contendo 1mmol/L de CaCl_2 e 1mmol/L de paraoxon (D9286, Sigma Chemical Company, Deisenhofen, Alemanha). A geração de p-nitrofenol foi medida a 405 nm e à temperatura ambiente, utilizando um leitor de placas (EPOCH, EUA) 3 e 6 minutos após a adição de paraoxon como substrato. A atividade da paraoxonase foi relatada em Unidades por litro de soro por minuto.

Considerações éticas

Todos os participantes preencheram um formulário de consentimento informado por escrito. O Comitê de Ética da *Mashhad University of Medical Sciences* aprovou o protocolo do estudo (número de identificação: 930834).

Análise estatística

Todos os dados foram analisados estaticamente utilizando o software *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS Inc., IL, EUA). A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. As variáveis com distribuição normal foram expressas em média \pm desvio padrão (DP) e as variáveis sem distribuição normal foram descritas por mediana e

intervalo interquartil. As variáveis categóricas foram expressas por número e porcentagem. Para a análise entre grupos, o teste de qui-quadrado foi usado para dados categóricos, e para dados quantitativos, utilizou-se o teste *t* para amostras independentes (para dados normalmente distribuídos) ou teste de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis (para dados não distribuídos normalmente), respectivamente. Para indicar a associação entre SNPs e angiografia positiva, foram realizadas as análises univariada e multivariada com regressão logística binária, sendo expressas em OR (IC95%). A significância estatística foi estabelecida em $p < 0,05$. A análise de haplótipos foi realizada utilizando o SNPAlzye (versão demo, V8.1.1).

Resultados

As diferenças nas características basais entre os grupos de estudo são mostradas na Tabela 1. As diferenças entre a frequência dos três genótipos e a positividade da angiografia são mostradas na Tabela 2. Após ajuste para idade, sexo, hipertensão, DM e dislipidemia, um modelo recessivo para o genótipo GG de rs662 foi significativo entre as populações do estudo. Além disso, um resultado significativo foi observado no modelo codominante para rs662.

A análise do haplótipo mostrou que o haplótipo "ATC" apresentou diferença significativa entre os dois grupos analisados ($p=0,017$) (Tabela 3).

A Tabela 4 mostra a diferença entre os genótipos e a atividade da paraoxonase nos grupos de estudo. No total e em ambos os casos e controles, a atividade da paraoxonase estava aumentada na presença do alelo G em comparação com a presença do alelo A. Além disso, a atividade da paraoxonase foi significativamente maior na presença do alelo A de rs850560 em comparação com a presença do alelo T nesse locus e do alelo C de rs705379 no promotor de PON1. As comparações entre os grupos indicaram que a atividade da paraoxonase foi significativamente menor para o genótipo AA do polimorfismo rs662 na DAC em comparação aos controles ($p=0,019$).

Discussão

Não foi possível demonstrar qualquer associação significativa entre os polimorfismos rs850560 e rs705379 e CAD definida angiograficamente em adultos iranianos, enquanto a análise do polimorfismo rs662 mostrou que a homozigiosidade para a variante GG vs. AA e AG totais estava associada a uma prevalência maior do que 2 vezes na angiografia positiva em comparação com indivíduos com angiografia negativa. Além disso, observamos que a atividade da paraoxonase sérica estava associada a todos os três SNPs avaliados em ambos os grupos de indivíduos. Pode-se dizer que a atividade da enzima paraoxonase era maior nos portadores dos alelos R de rs662, alelo A de rs850560 e alelo C de rs705379. Não houve relação significativa entre a positividade da angiografia e a atividade da paraoxonase sérica, embora uma atividade sérica média mais baixa de PON1 tenha sido observada nos pacientes com angiografia positiva.

Em uma metanálise de 17 estudos de diferentes cidades e estados do México realizados em 2018, os genótipos mais

Tabela 1 – Características basais da população do estudo

Variável	Angiografia negativa (N=266)	Angiografia positiva (N=335)	p Valor
Idade (anos) (Média±DP) ¹	55,70±10,96	61,53±8,91	<0,001
Sexo (N%) ²	Masculino	227 (69,8%)	<0,001
	Feminino	98 (30,2%)	
Histórico de tabagismo (N %) ²	42 (16,0%)	52 (16,5%)	0,890
Histórico de HTN (N %) ²	121 (45,5%)	192 (59,3%)	0,001
Histórico de DM (N %) ²	70 (26,3%)	130 (40,5%)	<0,001
IMC (N %) ²	Normal (BMI<25)	104 (35,6%)	0,683
	Sobrepeso (25≤BMI<30)	138 (47,3%)	
	Obeso (BMI≥30)	50 (17,1%)	
PAS (Média ± DP) ¹	121,81±17,37	124,93±15,44	0,035
PAD (Média ± DP) ¹	76,12±10,42	77,75±8,75	0,063
Atividade da paraoxonase sérica (U/L) (Mediana (IQR)) ¹	57,60(32,70-105,15)	52,20(30,38-95,18)	0,237

HTN: hipertensão; DM: diabetes mellitus; IMC: índice de massa corporal; PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica. ¹ Análise por teste t ou teste de Mann-Whitney quando necessário. ² Análise pelo teste do qui-quadrado.

associados com atividade enzimática diminuída foram AT/TT de rs850560 e AA de rs662.²² Esses resultados foram compatíveis com nossos achados, embora tenha sido uma metanálise nacional conduzida na população do México e, portanto, a etnia era diferente.

Vários estudos investigaram a relação entre os dois SNPs codificadores (rs662 e rs850560) e DAC. A metanálise sugere uma associação entre DAC e PON1. Qinghua Zeng e Juan Zeng sugeriram que o polimorfismo rs662 poderia ser usado para identificar indivíduos altamente suscetíveis a DAC.²³ Em uma metanálise de 43 estudos que avaliaram 11.000 casos e 13.000 controles. Wheeler et al., mostraram que houve uma relação significativa entre o alelo G de rs662 e a DAC, mas não houve associação entre o polimorfismo rs850560 e DAC,²⁴ semelhante aos nossos achados. Uma metanálise realizada por Wang et al., de 88 estudos de caso-controle em 2011, relatou resultados semelhantes.²⁵

Vaisi-Raygani et al. também encontraram uma relação significativa entre o polimorfismo rs662 e DAC no oeste do Irã. Assim, indivíduos com alelo G têm uma chance 1,6 vezes maior de apresentarem DAC.²⁶ Por outro lado, Ahmad et al. afirmaram que o alelo G de rs662 está associado ao risco de DAC.²⁷ Nossos resultados também são consistentes com outro estudo realizado no norte do Irã, que relatou uma relação entre rs705379 e DAC. Najafi et al. mostraram que, embora esse polimorfismo esteja associado à atividade enzimática sérica, não houve relação significativa com a ocorrência de DAC quando comparado ao grupo controle.²⁸

Tang et al., avaliaram as atividades séricas da PON-1 e seus determinantes genéticos relacionados em 3.668 indivíduos estáveis (média de idade de 63±11 anos) submetidos à angiografia coronária eletiva (ACE) sem síndrome coronariana aguda e que foram acompanhados prospectivamente para eventos cardiovasculares adversos maiores por um período

de 3 anos. Os resultados mostraram que as variantes rs854560 e rs662 tinham fortes efeitos genéticos na atividade sérica de PON1, mas não estavam associadas ao risco de eventos cardíacos adversos maiores (ECAM). Eles sugeriram que os efeitos genéticos desse SNP sobre a atividade da arilesterase são muito fracos para serem observados, especialmente se um limiar biológico mínimo de mudança de atividade for necessário para influenciar o risco de incidentes de ECAM.²⁹

Da mesma forma, o estudo GeneBank, um estudo prospectivo com 1.399 indivíduos submetidos à coronariografia diagnóstica eletiva com (idade de 65±11 anos) e sem (idade de 57±12 anos) DAC, mostrou que o polimorfismo rs662 é responsável por cerca de 60% das variações na atividade da PON1. Além disso, a diminuição da atividade sérica de PON1 e seu genótipo AA foram associados a um aumento do estresse oxidativo. Esse genótipo está associado a um aumento na mortalidade e desfechos adversos de eventos cardiovasculares, incluindo infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral. Seus resultados mostraram que a incidência desses efeitos adversos foi significativamente menor em indivíduos com maior atividade de PON1.³⁰

Um estudo de Ochoa-Martínez et al. observou que os portadores do alelo G do polimorfismo rs662 apresentavam níveis mais altos de biomarcadores de DAC do que os portadores do alelo A.³¹

Liu et al., relataram que o polimorfismo rs662 está significativamente associado à DAC. Em consonância com nossos achados, esse estudo mostrou que os portadores do alelo G desse polimorfismo estão significativamente mais expostos à DAC, e que a atividade e concentração de PON1 estavam positivamente associadas ao alelo G. Além disso, a concentração e a atividade dessa enzima estavam diminuídas nos pacientes com DAC em relação aos controles,¹⁸ o que não foi encontrado em nosso estudo. Há um paradoxo que já foi explicado por Aviram et al., que relataram que o sítio ativo de PON1 necessário

Tabela 2 – Associação entre polimorfismos de PON1 e DAC

Genótipos		Angiografia negativa (N=266)	Angiografia positiva (N=335)	Regressão univariada	Regressão multivariada ¹	
rs662	A	0,70	0,68	1,093 (0,847-1,410)	1,062 (0,773-1,460)	
	G	0,30	0,32			
	AA	112(44,8%)	150(48,1%)	Ref,	Ref,	
	AG	121(48,4%)	121(38,8%)	0,747 (0,525-1,061)	0,685 (0,439-1,069)	
	GG	17(6,8%)	41(13,1%)	1,913 (1,022-3,583)*	1,802 (0,827-3,925)	
	Modelo dominante	AA	112(44,8%)	150(57,3%)	0,833 (0,632-1,233)	0,818 (0,535-1,250)
		AG+GG	138(55,2%)	162(51,9%)		
	Modelo recessivo	AA+AG	234(93,6%)	271(86,9%)	2,360 (1,274-4,373)**	2,424 (1,123-5,233)*
		GG	16(6,4%)	41(13,1%)		
	Modelo aditivo	AA	112(87,5%)	150(78,5%)	2,041 (1,076-3,871)*	2,080 (0,900-4,810)
		GG	16(12,5%)	41(21,5%)		
	Modelo codominante	AG	122(48,8%)	121(38,9%)	1,508 (1,077-2,113)*	1,663 (1,086-2,547)*
AA+GG		128(51,2%)	190(61,1%)			
rs854560	A	0,62	0,67	0,944 (0,682-1,309)	0,836 (0,583-1,200)	
	T	0,38	0,33			
	AA	88(35,5%)	131(42,3%)	Ref,	Ref,	
	AT	131(52,8%)	149(48,1%)	1,053 (0,692-1,603)	0,918 (0,550-1,533)	
	TT	29(11,7%)	30(9,7%)	0,299(0,694-1,383)	0,603(0,260-1,399)	
	Modelo dominante	AA	86(34,7%)	130(41,9%)	1,004(0,643-1,568)	0,854(0,523-1,393)
		AT+TT	162(65,3%)	180(58,1%)		
	Modelo recessivo	AA+AT	220(88,7%)	279(90,0%)	0,770(0,381-1,556)	0,631(0,285-1,398)
		TT	28(11,3%)	31(10,0%)		
	Modelo aditivo	AA	86(75,4%)	130(81,2%)	0,789(0,374-1,665)	0,601(0,259-1,396)
		TT	28(24,6%)	30(18,8%)		
	Modelo codominante	AT	134(54,0%)	149(48,2%)	0,909(0,586-1,412)	0,990 (0,610-1,607)
AA+TT		114(46,0%)	160(51,8%)			
rs705379	C	0,50	0,49	1,055 (0,798-1,394)	0,941(0,669-1,322)	
	T	0,50	0,51			
	CC	49(24,1%)	68(21,9%)	Ref,	Ref,	
	CT	109(53,7%)	171(55,0%)	0,941(0,574-1,544)	1,079(0,589-1,975)	
	TT	45(22,2%)	72(23,2%)	1,098 (0,603-2,000)	0,585(0,418-1,761)	
	Modelo dominante	CC	52 (25,6%)	67(21,4%)	1,086 (0,642-1,838)	1,143 (0,645-2,028)
		CT+TT	151(74,4%)	246(78,6%)		
	Modelo recessivo	CC+CT	159(78,3%)	242(77,3%)	1,001 (0,600-1,703)	0,820 0,460-1,462)
		TT	44(21,7%)	71(22,7%)		
	Modelo aditivo	CC	52(54,2%)	67(48,6%)	1,075 (0,561-2,063)	0,939 (0,458-1,924)
		TT	44(45,8%)	71(51,4%)		
	Modelo codominante	CT	107(52,7%)	175(55,9%)	0,952 (0,613-1,478)	0,791 (0,486-1,288)
CC+TT		96(47,3%)	138(44,1%)			

A análise foi realizada usando regressão univariada e multivariada. * Valor $p \leq 0,05$. **Valor $p \leq 0,01$. ¹ Ajustado para idade, sexo, hipertensão, diabetes mellitus, dislipidemia.

Tabela 3 – Diferença entre frequências de haplótipos nos grupos de estudo

Haplótipos ¹	Total (N=591)	Angiografia negativa (N=266)	Angiografia positiva (N=335)	p valor
AAC	0,241	0,226	0,248	0,509
ATT	0,205	0,200	0,209	0,781
AAT	0,150	0,159	0,144	0,639
GAC	0,140	0,134	0,147	0,682
GAT	0,120	0,110	0,126	0,549
ATC	0,095	0,133	0,072	0,017
GTT	0,024	0,021	0,026	0,742
GTC	0,025	0,017	0,029	0,437

¹ Teste de Qui-quadrado usado para análise.

para a proteção contra a oxidação de LDL é diferente daquele necessário para sua atividade da paraoxonase, sugerindo que o alelo R, apesar de apresentar maior atividade em relação ao paraoxon, é defeituoso, pois impede sua atividade antioxidante em relação ao LDL devido ao seu efeito modulador do sítio ativo.³² Assim, os portadores do alelo G possuem capacidade reduzida de prevenir a modificação oxidativa de LDL e, conseqüentemente, são mais suscetíveis a desenvolver DAC do que os portadores do alelo A.³⁰

O efeito do SNP rs705379 no promotor do gene PON1 é o outro determinante da atividade de PON1. Brophy et al. mostraram que esse polimorfismo foi responsável por 22,8% da inconsistência na atividade de PON1. Seus resultados mostraram que a atividade de PON1 estava reduzida em 376 indivíduos brancos na presença do alelo T do polimorfismo rs705379 em comparação com a presença do alelo C.³³ Vários estudos anteriores relataram que o alelo T desse polimorfismo

Tabela 4 – Análise entre grupos de diferentes genótipos de PON1 e atividade de paraoxonase sérica

SNPs	Total (N=591)	p valor ¹	Angiografia negativa (N=266)	p valor ²	Angiografia positiva (N=335)	p valor ³	p valor ⁴
rs662	A (27,9-78,75)	<0,001	46,80 (28,35-87,75)	<0,001	45,00 (26,55-67,50)	<0,001	0,019
	G (48,26-148,95)		95,85 (60,19-158,44)		94,28 (48,26(147,15)		0,527
	AA (25,2-57,60)	41,40 (26,55-58,05)	40,05 (23,40-57,15)	0,345			
	AG (43,76-126,79)	<0,001*, **, ***	85,63 (44,55-141,08)	<0,001*, **, ***	80,10 (43,65-122,85)	<0,001*, **, ***	0,084
	GG (80,21-175,73)	142,65 (84,60-176,40)	127,35 (62,21-175,28)	0,933			
rs854560	A (35,51-117,56)	<0,001	65,70 (34,65-119,35)	0,001	59,40 (36,90-110,59)	<0,001	0,162
	T (22,95-79,54)		43,00 (26,55-84,71)		42,08 (22,50-70,88)		0,585
	AA (42,41-129,49)	80,10 (38,40-130,28)	65,48 (43,20(128,81)	0,228			
	AT (28,30-87,75)	<0,001*, **, ***	57,10 (31,95-95,40)	<0,001*, **	47,70 (26,55(83,25)	<0,001*, **, ***	0,487
	TT (17,10-46,80)	30,15 (17,55-43,50)	29,25 (17,10-48,15)	0,888			
rs705379	C (34,20-122,51)	<0,001	78,08 (38,40-133,54)	0,003	63,00 (32,85-111,60)	0,001	0,180
	T (27,00-87,75)		45,46 (26,55-91,05)		47,70 (29,25-86,85)		0,530
	CC (40,50-144,00)	83,93 (44,59-156,83)	72,90 (36,90-127,35)	0,329			
	CT (31,30-98,10)	<0,001*, **, ***	56,70 (31,46-103,24)	<0,001*, **	54,90 (31,16-94,40)	<0,001**	0,299
	TT (22,89-65,93)	37,35 (17,55-73,80)	45,45 (24,98-60,30)	0,770			

Para a análise estatística, teste de Kruskal-Wallis foi usado para comparação entre mais de 2 grupos e teste de Mann-Whitney para comparação entre 2 grupos. ¹ status de atividade da paraoxonase sérica e SNPs no total. ² status de atividade da paraoxonase sérica e SNPs no grupo angiografia negativa. ³ status de atividade da paraoxonase sérica e SNPs no grupo angiografia positiva. ⁴ Comparação entre a atividade da paraoxonase sérica e diferentes genótipos nos grupos angiografia positiva e negativa. *Diferença significante entre homozigotos dominantes e heterozigotos. ** Diferença significante entre dois homozigotos. ***Diferença significante entre homozigotos recessivos e heterozigotos.

está associado a um risco aumentado de DAC em homens,^{14,15} embora não fosse possível confirmar esse resultado, o que pode ser devido a diferenças de idade, etnia, presença de doença, número de participantes inscritos em vários estudos ou diferença no grupo controle. Voetsch et al., mostraram resultados semelhantes em 118 pacientes jovens (idade <45 anos) com um primeiro AVC isquêmico arterial não fatal.¹⁶ Gupta et al., relataram que a atividade de PON1 está reduzida em pacientes com DAC demonstrada angiograficamente em comparação com indivíduos saudáveis em um grupo étnico discreto de indianos no noroeste do Punjab, que têm alta incidência de DAC. Além disso, seus resultados mostraram que os polimorfismos rs662 nas regiões codificadoras estão todos independentemente associados à DAC.³⁴ James et al. relataram que existe uma associação entre o alelo T de rs705379 e o risco aumentado de DAC em pacientes diabéticos tipo II.¹⁷

A presença do SNP rs662 por si só não é suficiente para o desenvolvimento de aterosclerose, pois vários estudos anteriores relataram que, além do genótipo, a atividade e as concentrações enzimática também têm papéis importantes.³⁵ Além disso, diferenças étnicas,³⁶ fatores dietéticos e ambientais,³⁷ e o status do HDL³⁸ podem afetar o fenótipo de PON1. Além disso, um estudo destacou a importância do HDL, que é um fator relacionado à DAC, e que envolve PON1.³⁹ Foi relatado que os três genótipos AA, AG e GG apresentam valores médios semelhantes de níveis de PON1/HDL. Este resultado pode explicar por que tentativas anteriores de correlacionar o genótipo rs662 com uma predisposição para aterosclerose falharam e abre caminho para novas metodologias de fenotipagem de PON1 que podem fornecer uma melhor correlação.⁴⁰ Uma limitação do nosso estudo foi o uso de indivíduos com estenose <30% como controles. Idealmente, os controles seriam indivíduos com DAC mínima definida angiograficamente, mas esses indivíduos raramente necessitam de angiografia nessa idade.

Conclusões

Descobrimos que portadores do alelo G do polimorfismo Q192R do gene PON1 estavam independentemente associados a uma angiografia coronária positiva. Além disso, portadores do alelo G de rs662, alelo A de rs850560 e alelo C de rs705379 têm

níveis aumentados de atividade sérica de PON1. Não foi possível estabelecer qualquer relação significativa entre a atividade da paraoxonase sérica e uma angiografia positiva em uma amostra do nordeste do Irã.

Agradecimento

Este estudo recebeu apoio de Mashhad e Isfahan University of Medical Sciences. Os autores agradecem aos técnicos do laboratório de cateterismo Sina, Sadi, Chaem e aos técnicos do laboratório de genética Isfahan Alzahra.

Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa: Soflaei SS, Baktashian M, Hashemi SM, Mouhebat M, Dehghani M, Ebrahimi M, Falsoleiman H, Ferns GA, Salehi M, Pasdar A, Ghayour-Mobarhan M; Obtenção de dados: Soflaei SS, Baktashian M, Moghaddam KH, Kosari N, Amini M, Dehghani M, Ebrahimi M, Falsoleiman H, Nosrati-Tirkani A, Sadabadi F; Análise e interpretação dos dados: Soflaei SS, Moghaddam KH, Saberi-Karimian M, Amini M, Nosrati-Tirkani A, Pasdar A; Análise estatística: Esmaily H; Obtenção de financiamento: Hashemi SM, Salehi M, Ghayour-Mobarhan M; Redação do manuscrito: Soflaei SS, Saberi-Karimian M, Nosrati-Tirkani A; Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Mouhebat M, Falsoleiman H, Ferns GA, Salehi M, Pasdar A, Ghayour-Mobarhan M.

Potencial conflito de interesse

Não há conflito com o presente artigo

Fontes de financiamento

O presente estudo foi financiado por Mashhad and Isfahan University of Medical Sciences.

Vinculação acadêmica

Este artigo é parte de tese de doutorado de Majid Ghayour-Mobarhan pelo Mashhad University of Medical Sciences.

Referências

1. Helgason D, Helgadottir S, Viktorsson SA, Orrason AW, Ingvarsdottir IL, Geirsson A, et al. Acute Kidney Injury and Outcome Following Aortic Valve Replacement for Aortic Stenosis. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2016;23(2):266-72. doi: 10.1093/icvts/ivw117.
2. Sarrafzadegan N, Mohammadifard N. Cardiovascular Disease in Iran in the Last 40 Years: Prevalence, Mortality, Morbidity, Challenges and Strategies for Cardiovascular Prevention. *Arch Iran Med.* 2019;22(4):204-10.
3. Baktashian M, Riazat MD AR, Moshaveri F, Rouzbahani R. Periodic Health Assessment in Office Workers of Isfahan Insurance Organization, Iran. *Journal of Isfahan Medical School.* 2012;30(201):1225-33.
4. Esteghamati A, Meysamie A, Khalilzadeh O, Rashidi A, Haghazali M, Asgari F, et al. Third National Surveillance of Risk Factors of Non-Communicable Diseases (SuRFNCD-2007) in Iran: Methods and Results on Prevalence of Diabetes, Hypertension, Obesity, Central Obesity, and Dyslipidemia. *BMC Public Health.* 2009;9:167. doi: 10.1186/1471-2458-9-167.
5. Alamdari DH, Ghayour-Mobarhan M, Tavallaie S, Parizadeh MR, Moohebat M, Ghafoori F, et al. Prooxidant-antioxidant Balance as a New Risk Factor in Patients with Angiographically Defined Coronary Artery Disease. *Clin Biochem.* 2008;41(6):375-80. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2007.12.008.
6. Ashok BT, Ali R. The Aging Paradox: Free Radical Theory of Aging. *Exp Gerontol.* 1999;34(3):293-303. doi: 10.1016/s0531-5565(99)00005-4.
7. Martinelli N, Micaglio R, Consoli L, Guarini P, Grison E, Pizzolo F, et al. Low Levels of Serum Paraoxonase Activities are Characteristic of Metabolic Syndrome and May Influence the Metabolic-syndrome-related Risk of Coronary Artery Disease. *Exp Diabetes Res.* 2012;2012:231502. doi: 10.1155/2012/231502.

8. Costa LG, Vitalone A, Cole TB, Furlong CE. Modulation of Paraoxonase (PON1) Activity. *Biochem Pharmacol.* 2005;69(4):541-50. doi: 10.1016/j.bcp.2004.08.027.
9. Imai Y, Morita H, Kurihara H, Sugiyama T, Kato N, Ebihara A, et al. Evidence for Association Between Paraoxonase Gene Polymorphisms and Atherosclerotic Diseases. *Atherosclerosis.* 2000;149(2):435-42. doi: 10.1016/s0021-9150(99)00340-8.
10. She ZG, Chen HZ, Yan Y, Li H, Liu DP. The Human Paraoxonase Gene Cluster as a Target in the Treatment of Atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal.* 2012;16(6):597-632. doi: 10.1089/ars.2010.3774.
11. Kim DS, Burt AA, Ranchalis JE, Richter RJ, Marshall JK, Nakayama KS, et al. Dietary Cholesterol Increases Paraoxonase 1 Enzyme Activity. *J Lipid Res.* 2012;53(11):2450-8. doi: 10.1194/jlr.P030601.
12. Zafiroopoulos A, Linardakis M, Jansen EH, Tsatsakis AM, Kafatos A, Tzanakakis GN. Paraoxonase 1 R/Q Alleles are Associated with Differential Accumulation of Saturated Versus 20:5n3 Fatty Acid in Human Adipose Tissue. *J Lipid Res.* 2010;51(7):1991-2000. doi: 10.1194/jlr.P004960.
13. Furlong CE, Suzuki SM, Stevens RC, Marsillach J, Richter RJ, Jarvik GP, et al. Human PON1, a Biomarker of Risk of Disease and Exposure. *Chem Biol Interact.* 2010;187(1-3):355-61. doi: 10.1016/j.cbi.2010.03.033.
14. Leviev I, Kalix B, Meynet M-CB, James R. The paraoxonase PON1 promoter polymorphism C (-107) T is associated with increased serum glucose concentrations in non-diabetic patients. *Diabetologia.* 2001;44(9):1177-83.
15. Leviev I, Poirier O, Nicaud V, Evans A, Kee F, Arveiler D, et al. High Expressor Paraoxonase PON1 Gene Promoter Polymorphisms are Associated with Reduced Risk of Vascular Disease in Younger Coronary Patients. *Atherosclerosis.* 2002;161(2):463-7. doi: 10.1016/s0021-9150(01)00668-2.
16. Voetsch B, Benke KS, Panhuysen CI, Damasceno BP, Loscalzo J. The Combined Effect of Paraoxonase Promoter and Coding Region Polymorphisms on the Risk of Arterial Ischemic Stroke Among Young Adults. *Arch Neurol.* 2004;61(3):351-6. doi: 10.1001/archneur.61.3.351.
17. James RW, Leviev I, Ruiz J, Passa P, Froguel P, Garin MC. Promoter Polymorphism T(-107)C of the Paraoxonase PON1 Gene is a Risk Factor for Coronary Heart Disease in Type 2 Diabetic Patients. *Diabetes.* 2000;49(8):1390-3. doi: 10.2337/diabetes.49.8.1390.
18. Liu T, Zhang X, Zhang J, Liang Z, Cai W, Huang M, et al. Association between PON1 rs662 Polymorphism and Coronary Artery Disease. *Eur J Clin Nutr.* 2014;68(9):1029-35. doi: 10.1038/ejcn.2014.105.
19. Vaisi-Raygani A, Ghaneialvar H, Rahimi Z, Tavilani H, Pourmotabbed T, Shakiba E, et al. Paraoxonase Arg 192 Allele is an Independent Risk Factor for Three-vessel Stenosis of Coronary Artery Disease. *Mol Biol Rep.* 2011;38(8):5421-8. doi: 10.1007/s11033-011-0696-3.
20. Shahsavari G, Nouryazdan N, Adibhesami G, Birjandi M. Genetic Associations and Serum Paraoxonase Levels with Atherosclerosis in Western Iranian Patients. *Mol Biol Rep.* 2020;47(7):5137-44. doi: 10.1007/s11033-020-05585-2.
21. Mahrooz A, Shokri Y, Variji A, Zargari M, Alizadeh A, Mehtarian E. Improved Risk Assessment of Coronary Artery Disease by Substituting Paraoxonase 1 Activity for HDL-C: Novel Cardiometabolic Biomarkers Based on HDL Functionality. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2021;31(4):1166-76. doi: 10.1016/j.numecd.2020.12.026.
22. Moreno-Godínez ME, Galarce-Sosa C, Cahua-Pablo JÁ, Rojas-García AE, Huerta-Beristain G, Alarcón-Romero LDC, et al. Genotypes of Common Polymorphisms in the PON1 Gene Associated with Paraoxonase Activity as Cardiovascular Risk Factor. *Arch Med Res.* 2018;49(7):486-96. doi: 10.1016/j.arcmed.2019.02.002.
23. Zeng Q, Zeng J. A Meta-analysis on Relationship Between Paraoxonase 1 Polymorphisms and Atherosclerotic Cardiovascular Diseases. *Life Sci.* 2019;232:116646. doi: 10.1016/j.lfs.2019.116646.
24. Wheeler JG, Keavney BD, 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.* 2004;363(9410):689-95. doi: 10.1016/S0140-6736(04)15642-0.
25. Wang M, Lang X, Zou L, Huang S, Xu Z. Four Genetic Polymorphisms of Paraoxonase Gene and Risk of Coronary Heart Disease: A Meta-analysis Based on 88 Case-control Studies. *Atherosclerosis.* 2011;214(2):377-85. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2010.11.028.
26. Vaisi-Raygani A, Rahimi Z, Tavilani H, Vaisi-Raygani H, Kiani A, Aminian M, et al. Synergism Between Paraoxonase Arg 192 and the Angiotensin Converting Enzyme D Allele is Associated with Severity of Coronary Artery Disease. *Mol Biol Rep.* 2012;39(3):2723-31. doi: 10.1007/s11033-011-1027-4.
27. Ahmad I, Narang R, Venkatraman A, Das N. Two- and three-locus Haplotypes of the Paraoxonase (PON1) Gene are Associated with Coronary Artery Disease in Asian Indians. *Gene.* 2012;506(1):242-7. doi: 10.1016/j.gene.2012.06.031.
28. Najafi M, Gohari LH, Firoozrai M. Paraoxonase 1 Gene Promoter Polymorphisms are Associated with the Extent of Stenosis in Coronary Arteries. *Thromb Res.* 2009;123(3):503-10. doi: 10.1016/j.thromres.2008.03.004.
29. Tang WH, Hartiala J, Fan Y, Wu Y, Stewart AF, Erdmann J, et al. Clinical and Genetic Association of Serum Paraoxonase and Arylesterase Activities with Cardiovascular Risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(11):2803-12. doi: 10.1161/ATVBAHA.112.253930.
30. Bhattacharyya T, Nicholls SJ, Topol EJ, Zhang R, Yang X, Schmitt D, et al. Relationship of Paraoxonase 1 (PON1) Gene Polymorphisms and Functional Activity with Systemic Oxidative Stress and Cardiovascular Risk. *JAMA.* 2008;299(11):1265-76. doi: 10.1001/jama.299.11.1265.
31. Ochoa-Martínez AC, Araiza-Gamboa Y, Varela-Silva JA, Orta-García ST, Carrizales-Yáñez L, Pérez-Maldonado IN. Effect of Gene-environment Interaction (arsenic exposure - PON1 Q192R polymorphism) on Cardiovascular Disease Biomarkers in Mexican Population. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2021;81:103519. doi: 10.1016/j.etap.2020.103519.
32. Aviram M, Billecke S, Sorenson R, Bisgaier C, Newton R, Rosenblat M, et al. Paraoxonase Active Site Required for Protection Against LDL Oxidation Involves its Free Sulfhydryl Group and is Different from that Required for its Arylesterase/paraoxonase Activities: Selective Action of Human Paraoxonase Allozymes Q and R. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18(10):1617-24. doi: 10.1161/01.atv.18.10.1617.
33. Brophy VH, Jampsa RL, Clendenning JB, McKinstry LA, Jarvik GP, Furlong CE. Effects of 5' Regulatory-region Polymorphisms on Paraoxonase-gene (PON1) Expression. *Am J Hum Genet.* 2001;68(6):1428-36. doi: 10.1086/320600.
34. Gupta N, Singh S, Maturu VN, Sharma YP, Gill KD. Paraoxonase 1 (PON1) Polymorphisms, Haplotypes and Activity in Predicting Cad Risk in North-West Indian Punjabis. *PLoS One.* 2011;6(5):e17805. doi: 10.1371/journal.pone.0017805.
35. Mackness M, Mackness B. Paraoxonase 1 and Atherosclerosis: Is the Gene or the Protein More Important? *Free Radic Biol Med.* 2004;37(9):1317-23. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.07.034.
36. La Du B. *Human Serum Paraoxonase/arylesterase.* Amsterdam: Elsevier; 1992.
37. Aviram M, Rosenblat M, Gaitini D, Nitecki S, Hoffman A, Dornfeld L, et al. Pomegranate Juice Consumption for 3 Years by Patients with Carotid Artery Stenosis Reduces Common Carotid Intima-media Thickness, Blood Pressure and LDL Oxidation. *Clin Nutr.* 2004;23(3):423-33. doi: 10.1016/j.clnu.2003.10.002.
38. Cabana VG, Reardon CA, Feng N, Neath S, Lukens J, Getz GS. Serum Paraoxonase: Effect of the Apolipoprotein Composition of HDL and the Acute Phase Response. *J Lipid Res.* 2003;44(4):780-92. doi: 10.1194/jlr.M200432-JLR200.

-
39. Mahrooz A, Mackness M, Bagheri A, Ghaffari-Cherati M, Masoumi P. The Epigenetic Regulation of Paraoxonase 1 (PON1) as an Important Enzyme in HDL Function: The Missing Link Between Environmental and Genetic Regulation. *Clin Biochem.* 2019;73:1-10. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2019.07.010.
40. Gaidukov L, Rosenblat M, Aviram M, Tawfik DS. The 192R/Q Polymorphs of Serum Paraoxonase PON1 Differ in HDL Binding, Lipolactonase Stimulation, and Cholesterol Efflux. *J Lipid Res.* 2006;47(11):2492-502. doi: 10.1194/jlr.M600297-JLR200.

***Material suplementar**

Para informação adicional, por favor, clique aqui.



Este é um artigo de acesso aberto distribuído sob os termos da licença de atribuição pelo Creative Commons