

FATORES ASSOCIADOS COM A ATIVIDADE SÉRICA DA PON1 EM PACIENTES COM DOENÇAS CARDIOVASCULARES

**GABRIEL VEIGA¹; MARIA ISABEL SCHIAVON²; BERNARDETE WEBER³;
LUCIA ROTA BORGES⁴ RENATA TORRES ABIB BERTACCO⁵ AUGUSTO
SCHNEIDER⁶**

¹Universidade federal de Pelotas (UFPEL) – gabrielveiga@icloud.com

²Universidade federal de Pelotas (UFPEL) – isabelcousen@gmail.com

³Hospital do Coração de São Paulo (HCor-SP) – dicabr@hcor.com.br

⁴Universidade federal de Pelotas (UFPEL) – luciarotaborges@yahoo.com.br

⁵Universidade federal de Pelotas (UFPEL) – renata.abib@ymail.com

⁶Universidade federal de Pelotas (UFPEL) – augustoschneider@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A prevalência de indivíduos com 40 anos ou mais apresentando pelo menos uma doença cardiovascular no Brasil é de aproximadamente 35% (MALTA et al, 2011). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), doenças cardiovasculares (DCVs) podem ser prevenidas por meio da adoção de padrões alimentares saudáveis, bem como a prática de atividade física e o não tabagismo (OMS, 2007).

Dentre os fatores de risco para a incidência de DCVs, enzimas da família Paraoxanases, com destaque para a Paraoxanase-1 (PON-1), tornaram-se foco de estudos de diversos pesquisadores ao redor do mundo. Sintetizada no fígado, a PON-1 é uma enzima com capacidade de inibir a agregação plaquetária e tem alta atividade antioxidante, sendo a mesma associada a molécula de lipoproteína de alta densidade (HDL) (JAMES et al, 2010). Além disto, a PON-1 demonstra efeito protetivo contra o processo aterosclerótico por inibir a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (HASSELWANDER et al, 1999). Desta forma, ficam claros os possíveis efeitos benéficos da PON-1 para a saúde cardiovascular, bem como a importância de estudar fatores que modulam sua atividade.

Em meio a complexidade de fatores que afetam a PON1, estudos anteriores evidenciam a influência de fatores genéticos na atividade sérica da PON-1 (RITTA et al, 2019). Neste cenário, mais de 160 polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs, do inglês *Single Nucleotide Polymorphisms*) no gene da PON-1 são conhecidos (COSTA et al, 2005), contudo o SNP localizado na região promotora, conhecido como C(-107)T ou rs705379 é um dos mais estudados e relevantes moduladores da atividade sérica da PON-1 (KIM et al, 2012). A presença do alelo C no rs705379 está relacionado com maior atividade sérica da PON-1 e assim menor suscetibilidade a desfechos cardiovasculares negativos (COSAN et al, 2016).

Ainda mais, a atividade enzimática da PON-1 revela também ser modulada pelo ambiente, presença de doenças e hábitos alimentares individuais. Onde que por mais que ainda controversos, estudos deixam claro que o perfil do consumo de gorduras apresenta importantes efeitos na PON-1 (KIM et al, 2012; RITTA et al, 2019), sendo isto ainda dependente de fatores genéticos. Ao exemplo, o trabalho realizado por SANTOS et al (2016) expôs que apenas sujeitos com o genótipo CC no rs705379 apresentaram redução da atividade sérica da PON1 em resposta a dietas ricas em ácidos graxos saturados. Levando em consideração todos os aspectos então relatados, o objetivo do atual trabalho consiste em

avaliar fatores associados com a atividade enzimática da PON-1 em pacientes com doenças cardiovasculares.

2. METODOLOGIA

Características e amostra

Trata-se de um estudo transversal realizado na cidade Pelotas, Rio Grande do Sul, mediado pela Universidade Federal de Pelotas (UFPel). O mesmo foi submetido ao comitê de ética local e aprovado pelo número 1.555.290, bem como todos os participantes assinaram o termo de consentimento para inclusão no estudo.

A amostra foi formada por voluntários com 45 anos ou mais com doença aterosclerótica manifesta diagnosticada nos últimos 10 anos, participantes do Programa Alimentar Brasileiro Cardioprotetor (DICABr) do município de Pelotas/RS, coordenado pelo Hospital do Coração em São Paulo, em parceria com o Ministério da Saúde, a partir do Programa de Apoio ao Desenvolvimento Institucional do Sistema Único de Saúde.

Avaliação dietética

Os dados de ingestão alimentar foram obtidos por meio de recordatórios alimentares de 24 horas e registrados no software Nutriquanti (São Paulo, SP, Brasil), um software brasileiro que prioriza a composição das tabelas brasileiras de alimentos. Um álbum de fotos contendo imagens de tamanhos de porções de alimentos padronizados, foi usado para auxiliar na avaliação da ingestão alimentar (WEBER et al, 2016)

Genotipagem

Para extração de DNA, amostras de sangue total foram utilizadas de acordo com um protocolo validado por KANAI et al (1994). Para amplificar a região onde o SNP PON1 T (-107) está localizado, a PCR foi realizada usando 10 µL de mistura GOTaq® (Promega, Madison, WI, EUA), 1 µL (concentração de 10 µM) do primer AGCTAGCTGCGGACCCGGCGGGAGGaG e 1 µL de o primer reverso GGCTGCAGCCCTCACCAACCC. A letra minúscula no primer direto indica uma incompatibilidade que introduz um sítio de restrição para a enzima BsrBI (Thermofischer, Waltham, MA, EUA). Para a etapa de digestão, as amostras foram incubadas por 2 horas a 37 ° C com 3 U da enzima de restrição BrsBI. Em seguida, os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel em agarose 3% com SYBR Safe (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A presença do alelo C foi identificada por fragmentos de 28 e 212 pares de bases (bp), enquanto a presença do alelo T não digerido, representado por um fragmento de 240 bp (CAMPO et al, 2004).

Atividade sérica da PON-1

A atividade da PON1 foi medida por meio da formação de fenol, conforme validado anteriormente (29). O reagente de trabalho consistia em tampão Tris / HCl 20 mM, pH 8,0, incluindo CaCl₂ 1 mM e fenilacetato 1 mM como substrato. As amostras, antes de serem adicionadas ao reagente de trabalho, foram diluídas 1: 3 no tampão sem fenilacetato e a alteração da absorbância foi registrada por 60 segundos a 270 nm. Uma unidade de atividade de arilesterase foi considerada igual a 1 mM de fenol formado por minuto e expresso em U / mL. Amostras em branco contendo apenas água foram usadas para corrigir a hidrólise não enzimática.

Análises estatísticas

Os dados foram analisados utilizando a plataforma (SAS) University Edition (SAS, Cary, NC, USA). Onde um procedimento de regressão logística stepwise foi realizado para identificar as variáveis independentes que mais contribuíram para a previsão da atividade sérica de PON1. O valor de $P \leq 0,05$ foi considerado significativo para todas as variáveis.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O modelo multivariado regressivo logístico demonstrou que as variáveis com maior capacidade de modular a atividade sérica da PON-1 são, respectivamente, o consumo de ácidos graxos saturados ($p=0.03$), genótipo ($p=0.09$), gênero ($p=0.04$), idade ($p=0.07$) e consumo de carboidratos ($p=0.16$).

Ao encontro do demonstrado por outros autores, é bem conhecido que o perfil de consumo de ácidos graxos é um forte modulador da atividade da PON-1 e das concentrações serícas de HDL, moléculas intimamente relacionadas. A literatura indica que dietas com alto consumo de colesterol, ácidos graxos saturados monoinsaturados e trans resultaram em menor atividade da enzima, ainda que alguns autores não tenham encontrado tal correlação (ROOS et al, 2002; RITTA et al, 2019). Somando-se a isto, a interação entre genótipo e dieta aparenta formar um contexto determinante para a atividade da enzima, em que não apenas a presença do alelo C, o qual está relacionado a atividade sérica 2 vezes maior que diante ao alelo T, mas também que o genótipo do indivíduo irá responder de forma específica a hábitos alimentares. Por exemplo, no trabalho realizado por SANTOS et al (2016) apenas sujeitos do genótipo CC mostram menor atividade da PON-1 em resposta a dietas ricas em ácidos graxos saturados.

Além das interações citadas, características hormonais como maiores concentrações de estrógenos, situação encontradas em mulheres, regulam a atividade da PON-1. O estrogênio demonstra efeito cardioprotetor, tendo em vista que sua presença está associada a maior atividade da PON-1 (AHMAD et al, 2010). Entretanto, esta situação é revertida ao avançar da idade quando a produção de estrógenos é reduzida pelo inicio da menopausa (KUMRUP et al, 2005). Outro fator relevante demonstra ser o consumo de carboidratos, o qual é sabido que conforme fonte e se excesso contribuem para diversos desfechos negativos à saúde como obesidade, doenças cardiovasculares e diabetes (GRUNDY, 2016).

4. CONCLUSÕES

Dado o exposto, fica claro que a atividade sérica da PON-1 será resultado da interação entre fatores ambientais, genéticos, presença de doenças e individuais, ou seja, será determinado por um conjunto de variáveis com suas respectivas capacidades de modulação, assim ressaltando a complexidade multifatorial de doenças cardiovasculares e metabólicas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - Malta DC, Morais Neto OLd, Silva Junior JBd. Apresentação do plano de ações estratégicas para o enfrentamento das doenças crônicas não transmissíveis no Brasil, 2011 a 2022. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*. 2011;20:425-38.
- 2 - Organization WH. Prevention of cardiovascular disease : guidelines for assessment and management of total cardiovascular risk.2007.
- 3 - James RW, Brulhart-Meynet M-C, Singh AK, Riederer B, Seidler U, Out R, et al. The scavenger receptor class B, type I is a primary determinant of paraoxonase-1 association with high-density lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(11):2121-7.
- 4 - Hasselwander O, McEneny J, McMaster D, Fogarty DG, Nicholls DP, Maxwell AP, et al. HDL composition and HDL antioxidant capacity in patients on regular haemodialysis. *Atherosclerosis*. 1999;143(1):125-33.
- 5 - RITTA, Mauren Castro et al. Paraoxonase 1 serum activity in women: the effects of menopause, the C (-107) T polymorphism and food intake. **Archives of endocrinology and metabolism**, v. 63, n. 3, p. 272-279, 2019.
- 6 - Costa LG, Vitalone A, Cole TB, Furlong CE. Modulation of paraoxonase (PON1) activity. *Biochemical pharmacology*. 2005;69(4):541-50.
- 7 - Kim DS, Burt AA, Ranchalis JE, Richter RJ, Marshall JK, Nakayama KS, et al. Dietary cholesterol increases paraoxonase 1 enzyme activity. *Journal of lipid research*. 2012;53(11):2450-8.
- 8 - TURGUT COSAN, Didem et al. Association of paraoxonase 1 (PON1) gene polymorphisms and concentration with essential hypertension. **Clinical and Experimental Hypertension**, v. 38, n. 7, p. 602-607, 2016.
- 9 - Kanai N, Fujii T, Saito K, Tokoyama T. Rapid and simple method for preparation of genomic DNA from easily obtainable clotted blood. *J Clin Pathol*. 1994;47(11):1043-4.
- 10 - Campo S, Sardo MA, Trimarchi G, Bonaiuto M, Fontana L, Castaldo M, et al. Association between serum paraoxonase (PON1) gene promoter T(-107)C polymorphism, PON1 activity and HDL levels in healthy Sicilian octogenarians. *Exp Gerontol*. 2004;39(7):1089-94.
- 11 - AHMAD, Syed; SCOTT, John E. Estradiol enhances cell-associated paraoxonase 1 (PON1) activity in vitro without altering PON1 expression. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 397, n. 3, p. 441-446, 2010.
- 12 - KUMRU, Selahattin et al. Effects of surgical menopause and estrogen replacement therapy on serum paraoxonase activity and plasma malondialdehyde concentration. **Gynecologic and obstetric investigation**, v. 59, n. 2, p. 108-112, 2005.
- 13 - GRUNDY, Scott M. Overnutrition, ectopic lipid and the metabolic syndrome. **Journal of investigative medicine**, v. 64, n. 6, p. 1082-1086, 2016.
- 14 - WEBER, Bernardete et al. Implementation of a Brazilian Cardioprotective Nutritional (BALANCE) Program for improvement on quality of diet and secondary prevention of cardiovascular events: A randomized, multicenter trial. **American heart journal**, v. 215, p. 187-197, 2019.
- 15 - Weber B, Bersch-Ferreira AC, Torreglosa CR, Ross-Fernandes MB, da Silva JT, Galante AP, et al. The Brazilian Cardioprotective Nutritional Program to reduce events and risk factors in secondary prevention for cardiovascular disease: study protocol (The BALANCE Program Trial). *Am Heart J*. 2016;171(1):73-81 e1-2.