

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

MARIA ISABEL SCHIAVON COUSEN¹; GABRIEL VEIGA²; BERNARDETE
WEBER³; LUCIA BORGES⁴; RENATA ABIB⁵; AUGUSTO SCHNEIDER⁶

1 Universidade Federal de Pelotas-UFPEL – isabelcousen@gmail.com¹

2 Universidade Federal de Pelotas-UFPEL – gabrielbveiga@icloud.com²

3 Hospital do Coração de São Paulo (Hcor-SP) – dicabr@hcor.com.br³

4 Universidade federal de Pelotas (UFPEL) – luciarotaborges@yahoo.com.br⁴

5 Universidade federal de Pelotas (UFPEL) –renata.abib@ymail.com⁵

6 Universidade federal de Pelotas (UFPEL) – augustoschneider@gmail.com⁶

1.INTRODUÇÃO

Segundo a organização mundial da saúde (OMS) as doenças cardiovasculares (DCV) são a causa de maior mortalidade no mundo. No Brasil, estima-se que até o ano de 2040 o país tornar-se-á o com maior morbidade e mortalidade relacionada às DCV (CHAGAS et al., 2009). Sabe-se que cardiopatas apresentam maior risco de reincidência de eventos cardiovasculares caso não manejem os fatores de risco associados aos hábitos de vida inadequados (FRANKOLA et al., 2018). Inclusive, é descrito que as DCV podem ser evitadas através da adoção de um estilo de vida saudável (OMS, 2007).

A paraoxonase-1 (PON1) é uma enzima associada às moléculas de lipoproteína de alta densidade (HDL), sintetizada pelo fígado (JAMES et al., 2010; MACKNESS et al., 1991; PRIMO-PARMO et al., 1996). A PON1 detêm efeito antioxidante, antiagregador plaquetário, assim como hidrolisa organofosfatos, propriedades essas que conferem proteção contra o processo aterosclerótico (MAZUR et al., 1946; MENESES et al., 2019; MACKNESS et al., 1991). Desta maneira, a PON1 possui relevância na saúde cardiovascular e há necessidade de estudos sobre a modulação da sua atividade.

São diversos os fatores que podem impactar os níveis de atividade sérica da PON1, incluindo a genética e escolhas alimentares (SANTOS et al., 2016). Até o momento são conhecidos mais de 160 polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) no gene da PON1 (KIM et al, 2012). Sendo que um dos polimorfismos mais relevantes é o situado na região promotora C(-107)T (rs705379), que é responsável por 12% da variação total do nível de atividade sanguínea da enzima (KIM et al, 2012). Observa-se que indivíduos portadores do alelo C/G demonstram níveis de atividade sérica de PON1 duas vezes maior em relação aos que possuem o alelo T/A (SANTOS et al., 2016; RITTA et al., 2019). Portanto, o alelo C no rs705379 por conferir maior atividade sérica da PON1 proporcionaria proteção contra eventos cardiovasculares (COSAN et al, 2016).

O impacto da dieta nos níveis de atividade da PON1 é dependente do genótipo individual (SANTOS et al., 2016). Ainda que controverso, o tipo de gordura ingerida poderia influenciar estes níveis (KIM et al, 2012; SANTOS et al., 2016; RITTA et al., 2019). O consumo de dietas ricas em ácidos graxos saturados, demonstrou reduzir a concentração sérica da PON1 nos indivíduos CC, sem diferença em outros genótipos (SANTOS et al., 2016). Dado a relevância dessa enzima contra eventos cardiovasculares, o objetivo do atual estudo foi avaliar as alterações na atividade sérica da PON1 em pacientes cardiopatas da cidade de Pelotas-RS.

2. METODOLOGIA

2.1 Dados Amostrais

O estudo transversal foi conduzido em Pelotas, Rio Grande do Sul, mediado pela Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). Aprovado pelo comitê de ética local sob o número 1.555.290. A amostra foi composta 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. Todos os participantes assinaram o termo de consentimento para inclusão no estudo.

2.2 Genotipagem

Para extrair o DNA, amostras de sangue foram utilizadas de acordo com um protocolo validado por KANAI et al. (1994). Para a amplificação da região onde está localizado o SNP PON1 C(-107)T a PCR foi feita utilizando 10 µL de mistura GOTaq® (Promega, Madison, WI, EUA), 1 µL (concentração de 10 µM) do primer forward AGCTAGCTGCGGACCCGGCGGGGAGGaG e 1 µL de o primer reverse GGCTGCAGCCCTCACCAACAACCC. A letra minúscula no primer forward 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 BsrBI. 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 (pb), enquanto a presença do alelo T não digerido, representado por um fragmento de 240 pb (CAMPO et al., 2004).

2.3 Atividade Sérica da PON1

A atividade da PON1 foi mensurada através dos níveis de atividade da arilesterase e da formação de fenol, conforme validado por BROWNE et al. (2007). As amostras, antes de serem adicionadas ao reagente de trabalho, foram diluídas 1:3 no tampão sem fenilacetato. Para mensuração da atividade as amostras foram misturadas ao reagente de trabalho (Tris/HCl 20 mM, CaCl₂ 1 mM, 1 mM de fenilacetato, pH 8,0) e a mudança na absorbância foi gravada 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 contendo apenas água foram utilizadas para corrigir a hidrólise não enzimática.

2.4 Análises Estatísticas

Os dados foram analisados utilizando o software SAS University Edition (SAS, Cary, NC, USA). Idade e gênero foram cofatores na análise. O procedimento MIXED foi usado para testar o efeito dos SNPs na atividade sérica de PON1. Valores de $P \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significante.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo a distribuição dos genótipos para o polimorfismo PON1 T(-107)C foi 18%, 51% e 30% para CC, CT e TT, respectivamente. Estas proporções alélicas foram similares as relatadas por RITTA et al.(2016) em estudo conduzido na mesma cidade, mas com mulheres saudáveis (CC 25%:CT 44%:TT 32%). Visto que a presença do alelo C está associada com maiores níveis de atividade sérica da PON1 e menor risco cardiovascular (DECHARATCHAKUL et al., 2020), pode-se inferir que a menor presença deste alelo em nosso estudo decorre da característica amostral, cardiopata.

Interessantemente não encontramos associação entre o genótipo PON1 C(-107) T e a atividade sérica da PON1. Achados similares foram vistos em indivíduos diabéticos (FLEKAC et al., 2008). Evidências sugerem que o estado inflamatório, presente em comorbidades, atua na redução da atividade da PON1 (FEINGOLD et al., 1998). Justificando possivelmente nossos achados, visto que todos pacientes foram e são acometidos por doenças cardiovasculares, isto pode influenciar a relação genética e atividade de PON1. Assim, percebe-se que outros fatores além da genética podem ser relevantes na determinação dos níveis de atividade sérica da PON1 em pacientes com histórico de DCV. Isto também indica que o genótipo da PON1 pode não ser um bom marcador da reincidência de DCV.

Mulheres apresentam níveis maiores da PON1 devido o papel cardioprotetor do estradiol (AHMAD et al, 2010). Tal benefício é reduzido pela menor produção de estrógeno que discorre do envelhecimento e menopausa (KUMRU et al, 2005). Nosso n amostral era predominantemente composto por homens, e as mulheres tinham idades acima de 50 anos, indicando possível relação com os resultados obtidos.

Por fim, a dieta não demonstrou associação com os níveis da PON1. Além disso, os portadores do genótipo CC apresentavam menores níveis de pressão sistólica em comparação com os demais genótipos ($p<0,05$), conferindo aos portadores do genótipo CC maior proteção contra novos eventos cardiovasculares.

4. CONCLUSÕES

De acordo com o exposto, conclui-se que não houve interação do genótipo sobre os níveis de atividade sérica da PON1. Além disso, destaca-se que a literatura ainda não fornece estudos comparando o efeito dos genótipos PON1 C (-107)T na atividade sérica de PON1 em pacientes com DCV, sendo este estudo pioneiro. Portanto, novos estudos devem ser realizados para melhor elucidação deste fenômeno.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CHAGAS ACP, Zilli EC, Ferreira JFM, Moretti MA, Ramos RF. Saúde cardiovascular do homem brasileiro: visão da Sociedade Brasileira de Cardiologia. Arquivos Brasileiros de Cardiologia. 2009;93:584-7.
2. FRANCUOLA ZS, Nola IA. Management of Measurable Variable Cardiovascular Disease' Risk Factors. Curr Cardiol Rev.2018;14(3):153-63.
3. ORGANIZAÇÃO MS. Prevention of cardiovascular disease: guidelines for assessment and management of total cardiovascular risk.2007.

4. JAMES RW, Brulhart-Meynet MC, Singh AK, 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.
5. PRIMO-PARMO SL, Sorenson RC, Teiber J, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics.* 1996;33(3):498-507.
6. MACKNESS MI, Arrol S, Durrington PN. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett.* 1991;286(1-2):152-4.
7. MENESES MJ, Silvestre R, Sousa-Lima I, Macedo MP. Paraoxonase-1 as a Regulator of Glucose and Lipid Homeostasis: Impact on the Onset and Progression of Metabolic Disorders. *Int J Mol Sci.* 2019;20(16):4049.
8. Mazur A. An enzyme in animal tissues capable of hydrolysing the phosphorus-fluorine bond of alkyl fluorophosphates. *J Biol Chem.* 1946;164:271-89.
9. SANTOS FG, Becker MK, Corrêa VS, et al. The effect of the paraoxonase 1 (PON1) T(-107)C polymorphism on serum PON1 activity in women is dependent on fatty acid intake. *Nutr Res.* 2016 Jan;36(1):9-15
10. KIM DS, Burt AA, Ranchalis JE, Richter RJ, et al. Dietary cholesterol increases PON1 enzyme activity. *J Lipid Res.* 2012 Nov;53(11):2450-8.
11. RITTA MC, Baldez AM, Oliveira IO, Garcia DN, et al. Paraoxonase 1 serum activity in women: the effects of menopause, the C(-107)T polymorphism and food intake. *Arch Endocrinol Metab.* 2019 May-Jun;63(3):272-9
12. COSAN, Didem & Çolak, Emine & Saydam, Faruk & Yazıcı, H. & Degirmenci, İrfan & Birdane, Alparslan & Gunes, H. Association of paraoxonase 1 gene polymorphisms and concentration with essential hypertension. *Clinical and experimental hypertension* 2016.
13. BROWNE RW, Koury ST, Marion S, Wilding G, Muti P, Trevisan M. Accuracy and biological variation of human serum paraoxonase 1 activity and polymorphism (Q192R) by kinetic enzyme assay. *Clinical chemistry.* 2007;53:310-7. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2006.074559>
14. CAMPO S, Sardo MA, Trimarchi G, Bonaiuto 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.
15. DECHARATCHAKUL N, Settasatian C, Settasatian N, et al. Association of combined genetic variations in SOD3, GPX3, PON1, and GSTT1 with hypertension and severity of coronary artery disease. *Heart and vessels* 2020.
16. FLEKAC M, Skrha J, et al. PON1 gene polymorphisms and enzyme activities in diabetes mellitus. *Physiological research.* 2008;57(5):717-26. LIII
17. FEINGOLD KR, Memon RA, et al. Paraoxonase activity in the serum and hepatic mRNA levels decrease during the acute phase response. *Atherosclerosis.* 1998;139(2):307-15.
18. AHMAD, Syed; SCOTT, John E. Estradiol enhances cell-associated paraoxonase 1 (PON1) activity in vitro without altering PON1 expression. *Biochemical and biophysical research*, v.397, n.3, p.441-446, 2010.
19. 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.