

Resumo

A paraoxonase 1 (PON1) é uma enzima associada às lipoproteínas HDL (lipoproteínas de alta densidade), que protege as LDL (lipoproteínas de baixa densidade) da oxidação, reverte os efeitos biológicos das LDL oxidadas, e preserva a função das HDL ao inibir a sua oxidação, possuindo assim propriedades antiateroscleróticas. A sua acção protectora resulta da capacidade de hidrólise de fosfolípidos oxidados biologicamente activos e de hidroperóxidos colesteril-éster das lipoproteínas LDL e HDL. Vários estudos, transgênicos, clínicos e epidemiológicos, confirmam a actividade antiaterogénica da PON1. O gene que codifica a proteína PON1 apresenta variações polimórficas, tanto na região codificadora, como na região reguladora. Desenvolveram-se uma série de estudos genéticos para examinar a importância do genótipo na determinação do risco de doença coronária. Duas meta-análises sustentam que os riscos-relativos por-alelo para os polimorfismos principais (Q192R, L55M e C-108T) são pouco significativos, e vários estudos apresentam resultados contraditórios entre si. Em muito menor número, foram realizados estudos que avaliaram a actividade e/ou concentração da PON1. Esses estudos concluíram que a actividade e/ou concentração da PON1 eram mais determinantes do risco cardiovascular do que o genótipo por si só. Através da quantificação das actividades de paraoxonase vs. diazoxonase, é possível resolver o genótipo da PON1 para o polimorfismo Q192R, que pode contudo ser confirmado por PCR. Considera-se que este método enzimático com dois substratos organofosforados da PON1 determina o *status* funcional da PON1 – genótipo para polimorfismo Q192R e actividade e/ou concentração da PON1. A maior importância do fenótipo da PON1, na determinação do risco de doença

coronária isquémica, levou os investigadores a estudar a modulação da enzima por factores ambientais farmacológicos, dietéticos e de estilo de vida. Um exemplo de modulação farmacológica da actividade da PON1 é a que acontece com as estatinas e os fenofibratos mas existem resultados opostos em vários estudos *in vitro* e também *in vivo*. Quando alguns autores compararam os resultados do tratamento com estatinas (efeito nos parâmetros lipídicos) em doentes dislipidémicos com actividades e/ou concentrações de PON1 diferentes, verificaram que o fenótipo da PON1 pode ser preditivo do sucesso ou insucesso desses tratamentos, um interesse adicional da PON1. Dadas as suas propriedades antiateroscleróticas, a descoberta de novos fármacos que aumentem com eficácia a actividade da PON1, pode potencialmente ter consequências clínicas, como a diminuição do risco de doença coronária isquémica.

Palavras-chave:

lipoproteínas HDL, paraoxonase 1 (PON1), actividade antioxidante, prevenção da doença coronária isquémica, genótipo vs. fenótipo da PON1, status funcional, modulação da actividade, estatinas.

Abstract

Paraoxonase 1 (PON1) is a *high density lipoprotein* (HDL)-associated enzyme that protects LDL (*low density lipoproteins*) from oxidation, reverts the biological effects of oxidized LDL, and preserves HDL function inhibiting its oxidation, thus having antiatherosclerotic properties. Its protective action results from the ability to hydrolyse biologically active oxidized phospholipids and cholesteryl-ester hydroperoxides of LDL and HDL lipoproteins. PON1 antiatherogenic activity is confirmed by different transgenic, clinical and epidemiological studies. PON1 gene has polymorphic variations in the coding and promoting regions. Several genetic studies examined the influence of genotype in the determination of coronary heart disease risk. Two meta-analysis conclude that the per-allele relative risks for Q192R, L55M and C-108T polymorphisms are not significant, and there is a number of studies in which the results are contradictory. The studies that evaluated PON1 activity and/or concentration occurred in a much lower number. That studies concluded that PON1 activity and/or concentration were more important for coronary heart disease risk than genotype alone. Through measuring of paraoxonase vs. diazoxonase activities, it is possible to know the Q192R polymorphism genotype, which can also be confirmed by PCR. It is considered that this dual-substrate enzymatic method, which uses two organophosphate compounds, determines the functional status of PON1 – polymorphism Q192R genotype and activity and/or concentration of PON1. The influence of phenotype in the determination of coronary heart disease risk lead the researchers to begin studying PON1 modulation by environmental factors, pharmacological, nutritional and life-style. Statins and fenofibrates give an example

of pharmacological modulation of PON1 activity, but there are opposite results among several *in vitro* and *in vivo* studies. When some authors compared the results of statin therapy (effect in lipid parameters) in dislipidemic patients with different PON1 activities and/or concentrations, they found that PON1 phenotype could be predictive of the therapy success or failure, an additional interest of PON1. Given PON1 antiatherosclerotic properties, the discovery of new drugs able to efficiently increase PON1 activity, can potentially have clinical consequences, as the decrease of the acute coronary events risk.

Key-words:

HDL lipoproteins, paraoxonase 1 (PON1), antioxidante activity, coronary heart disease prevention, PON1 genotype vs. phenotype, functional status, activity modulation, statins

Lista de abreviaturas

HDL, high density lipoproteins, lipoproteínas de alta densidade.

LDL,, low density lipoproteins, lipoproteínas de baixa densidade.

PON1, paraoxonase 1.

PON2 e 3, paraoxonases 2 e 3

mPON1, paraoxonase 1 do rato

SREBP-2, *sterol regulatory element-binding protein*.

PCR, *polymerase chain reaction*.

Índice

Resumo	1
Abstract	3
Lista de abreviaturas	5
Índice	6
I. Introdução	7
II. Objectivos e metodologia da revisão	9
III. A enzima paraoxonase 1	10
1. A família de proteínas PON	10
2. A actividade antioxidante e antiaterosclerótica da PON1	12
3. Os polimorfismos do gene PON1	16
IV. Genótipo <i>vs.</i> fenótipo da PON1 na determinação do risco de doença coronária isquémica	18
1. Estudos Genéticos – polimorfismos da PON1	18
2. Estudos de actividade – <i>status</i> funcional da PON1	21
V. A PON 1 e os fármacos antidislipidémicos	24
1. Efeito das estatinas e dos fenofibratos na actividade da PON1	25
2. Efeitos da actividade da PON1 (e do genótipo) nos resultados do tratamento com estatinas	28
VI. Conclusão e perspectivas futuras	29
VII. Bibliografia	31
Lista de figuras	38

I. Introdução

A doença coronária isquémica é a principal causa de mortalidade e morbidade nos países desenvolvidos, envolvendo, além disso, os mais elevados custos económicos, entre as afecções mais frequentes. As modificações do estilo de vida e as terapêuticas farmacológicas melhoraram e salvaram as vidas de inúmeros doentes, mas mesmo assim, nos países do mundo ocidental, a cardiopatia isquémica continua a ser uma das doenças mais sérias, afectando milhões de pessoas. Os estudos epidemiológicos identificam uma série de factores de risco bem conhecidos, entre os quais o baixo nível de *lipoproteínas de alta densidade* (HDL) se destaca como um dos mais importantes (Miller e Miller, 1975; Castelli, 1986). Dada uma qualquer concentração de *lipoproteínas de baixa densidade* (LDL), o nível de colesterol HDL relaciona-se inversamente com o risco de doença coronária isquémica e acidente vascular cerebral (Castelli et al., 1986; Assman et al., 1996; Tanne et al.1997). Devido a estas observações, os mecanismos através dos quais as HDL exercem a sua actividade protectora, tornaram-se um assunto importante da investigação científica.

As HDL constituem moléculas heterogéneas e complexas que se associam com várias proteínas em circulação. A sua bem conhecida actividade antiaterogénica depende dessas proteínas associadas, e deve-se à capacidade de transporte de lípidos na via inversa de transporte do colesterol, um processo mediante o qual as HDL dirigem o excesso de colesterol dos tecidos periféricos para o fígado. Contudo, sabe-se hoje que as HDL têm outra acção protectora, ao inibir a oxidação das *lipoproteínas de baixa densidade* (LDL), oxidação que tem um papel central no início e na progressão da aterosclerose. Os fosfolípidos e o colesterol que compõem as LDL, são incluídos no espaço subendotelial da parede das artérias e sofrem oxidação pelos produtos peróxidos das vias da lipooxigenase e mieloperoxidase, entre outros

(Navab et al., 2004). A oxidação de fosfolípidos com ácido araquidónico dá origem, por sua vez, a produtos pró-inflamatórios específicos que desencadeiam uma resposta imune. Essa resposta inclui a indução de moléculas de adesão e quimiotáticas dos monócitos que facilitam a formação de *foam cells*, características do processo fisiopatológico de formação das lesões ateromatosas (Navab et al., 2004). As HDL evidenciaram proteger as LDL da oxidação e também atenuar a actividade das LDL oxidadas (Navab et al., 2000). As várias proteínas que estão associadas às HDL são responsáveis pelas propriedades antioxidante e antiaterogénica referidas, e muitos trabalhos de investigação foram realizados para identificar e caracterizar essas proteínas.

A paraoxonase 1 (PON1) é uma dessas enzimas associadas às HDL, que contribui para os seus efeitos antioxidantes e antiateroscleróticos (Costa e Furlong, 2002). O presente trabalho constitui uma revisão sistemática de informação publicada relativa à enzima paraoxonase 1. Pretende, depois de apresentar e caracterizar a proteína, comparar a influência dos seus polimorfismos genéticos (genótipo) com a importância da concentração ou actividade da enzima (fenótipo) na determinação do risco de doença coronária isquémica. Esta comparação foi efectuada mediante a comparação dos resultados e conclusões dos principais estudos genéticos e de actividade. Finalmente, uma vez que as estatinas são fármacos muito utilizados pelos doentes com dislipidémia, os seus efeitos moduladores da actividade da paraoxonase 1, assim como o efeito do genótipo e do fenótipo da PON1 nos resultados do tratamento com estatinas, são também destacados neste artigo de revisão.

Pelas suas propriedades antiaterogénicas, a PON 1 tem sido extensamente investigada, e a melhor compreensão da modulação da actividade da enzima terá consequências clínicas relevantes se forem descobertos novos agentes farmacológicos que permitam aumentar com eficácia a sua actividade.

II. Objectivos e metodologia da revisão

Este artigo de revisão pretende expor alguns dos principais aspectos descritos na literatura acerca da enzima PON1. Descrevem-se, no início, as características dos 3 elementos que constituem a família de proteínas PON (PON1, PON2 e PON3), apontando-se as diferenças e semelhanças quanto à localização no organismo, à associação às lipoproteínas HDL e aos substratos da sua actividade. Seguidamente, apresentam-se as funções fisiológicas da PON1, a importância da sua actividade antioxidante e antiaterosclerótica, os mecanismos de acção sugeridos, e os principais polimorfismos da enzima.

O objectivo central do trabalho é proceder à comparação das influências do genótipo e do fenótipo na determinação do risco de doença coronária isquémica, o que é feito mediante a apresentação de resultados e conclusões dos principais estudos epidemiológicos genéticos e de actividade. Após a compreensão da questão *genótipo vs. fenótipo* e a introdução do conceito de *status* da PON1, sublinha-se a importância da modulação da actividade da enzima. Finalmente, expõem-se, por um lado, os efeitos das estatinas e dos fibratos na actividade da PON1, e, por outro, os efeitos da actividade e dos polimorfismos da PON1 nos resultados do tratamento da dislipidémia com estatinas.

Foram efectuadas 3 pesquisas através da base de artigos *PubMed*, utilizando-se as seguintes combinações para o título ou resumo: “paraoxonase 1” e “coronary heart disease” e “genotype”; “paraoxonase 1” e “coronary heart disease” e “phenotype”; “paraoxonase 1” e “statins”. Dos 84 artigos obtidos, retiraram-se e consideraram-se ainda outros, face à actualidade da informação e pertinência para o trabalho.

III. A enzima paraoxonase 1

1. A família de proteínas PON

A paraoxonase 1 (PON1), a PON2 e a PON3 constituem uma família de proteínas cujos genes se encontram em locais adjacentes dos braços longos do cromossoma 7 (q21.22) (Primo-Parmo et al., 1996). Nos humanos, a expressão do mRNA da PON1 está limitada ao fígado. De igual modo, a PON3 é expressa primariamente no fígado, com expressão encontrada também no rim (Reddy et al., 2001). Em contraste, a PON2 está mais difusamente expressa, distribuída por vários tecidos: coração, rim, fígado, pulmão, placenta, intestino delgado, baço, estômago e testículo (Ng et al., 2001) (Figura 1). Ao contrário da PON1 e da PON3, a PON2 é ainda detectada nas células da parede arterial: células endoteliais, células musculares lisas e macrófagos (Ng et al., 2001). Enquanto as primeiras se associam às HDL na circulação, a PON2 é indetectável nas HDL e LDL isoladas por ultracentrifugação e nos sobrenadantes das células endoteliais da microcirculação, através de análise Western; parece permanecer intracelular, associada com fracções da membrana plasmática dessas células (Ng et al., 2001) (Figura 2).

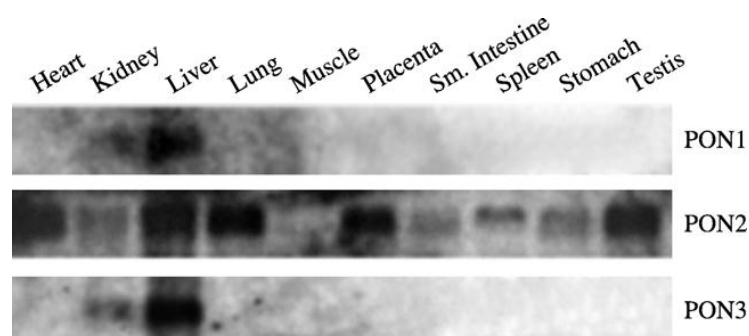


Figura 1. Distribuição por tecidos da família de genes humanos PON. Análise northern de fragmentos de tecidos humanos que contêm 2 µg de RNA poli(A)+ por linha. (Origene Technologies, Rockville, MD,USA) Retirado de Ng et al., 2001.

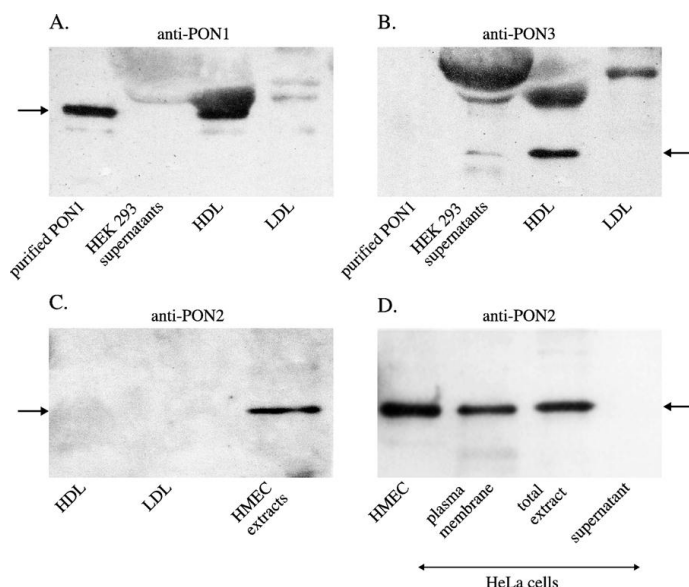


Figura 2. Localização da PON1 (A) e da PON3 (B) nas HDL mas não nas LDL por análise western. A PON2 não foi detectada nas HDL e LDL isoladas por centrifugação e nos sobrenadantes de células endoteliais microcirculatórias humanas (HMEC), mas foi encontrada em frações da membrana plasmática das HMEC. HEK 293, linha de células embrionárias do rim humanas. Retirado de Ng et al., 2001.

A PON1 deve o seu nome ao paraoxão, o metabolito tóxico do insecticida paratião, que é um dos substratos da enzima mais estudados. A PON1 hidrolisa também os metabolitos activos de outros insecticidas organofosforados, como o oxão clorpirifo e o diazoxão, assim como os agentes tóxicos do sistema nervoso sarin, soman e VX (Costa e Furlong, 2002; Costa et al., 2003). A PON1 tem ainda actividade de arilesterase ao hidrolisar ésteres aromáticos, como o fenilacetato (Draganov e La Du., 2004). Uma função fisiológica da enzima, que se vem revelando da maior importância para os grupos de investigadores, consiste no metabolismo de lípidos oxidados tóxicos tanto das LDL como das HDL através da sua actividade de hidroxidase. Mackness et al. (1991) foram os primeiros a demonstrar que a PON1 purificada podia inibir a oxidação das LDL *in vitro*. Vários estudos subsequentes confirmaram e aprofundaram esta descoberta, ao demonstrar que a PON1 previne a oxidação das LDL e inactiva fosfolípidos oxidados derivados das LDL uma vez formados. A PON1 também protege os fosfolípidos das HDL da oxidação (Costa et al., 2003). São estas últimas

acções da enzima que lhe conferem propriedades antiateroscleróticas, as que mais contribuíram para o interesse que a enzima despertou na comunidade científica e médica. Verificou-se igualmente que a PON1 metaboliza um conjunto de fármacos e pró-fármacos através da sua actividade de lactonase (Mackness et al., 1991; Draganov e La Du, 2004). A PON2 e a PON3 não possuem as actividades de paraoxonase nem de arilesterase mas, tal como a PON1, hidrolisam lactonas aromáticas e alifáticas de cadeia-longa (Draganov et al., 2000; Ng et al., 2001). Constituem exemplos relevantes as estatinas lovastatina e sinvastatina e o diurético espironolactona, três fármacos muito utilizados que são hidrolisados pela PON3 (Draganov et al., 2000).

O presente trabalho de revisão de artigos vai restringir-se aos aspectos relativos à PON1, a proteína mais estudada e mais bem compreendida das três que constituem a família.

2. A actividade antioxidante e antiaterosclerótica da PON1

A descoberta por Mackness et al. (1991) da associação da PON1 às HDL em circulação deu origem a investigações importantes no sentido de determinar o papel da enzima no metabolismo lipídico e na aterogénese. Ao longo dos últimos anos, demonstrou-se que a PON1 protege as LDL da oxidação, reverte os efeitos biológicos das LDL oxidadas, e preserva a função das HDL ao inibir a sua oxidação (Mackness et al., 1993; Watson et al., 1995; Aviram et al., 1998; Durrington et al., 2001). Num estudo de Shih et al. (1998), o HDL de ratos *knock-out* sem actividade plasmática de mPON1 detectável foi incapaz de proteger as LDL da oxidação num modelo de cultura da parede arterial. Oda et al. (2002) demonstraram que a função das HDL era preservada nos ratos transgénicos com sobreexpressão da mPON1, o que se devia ao facto das partículas de HDL serem mais resistentes à peroxidação lipídica, quando comparadas com o grupo controlo. As HDL isoladas de ratos transgénicos modificados através de clones cromossómicos artificiais de origem bacteriana exibiram num

estudo *in vivo* maior capacidade antioxidante na protecção das LDL. Além disso, em comparação com o grupo controlo, os ratos transgénicos desenvolviam no mesmo estudo lesões significativamente menores da raiz da aorta comparativamente a dois grupos de controlo diferentes (Tward et al., 2002) (Figura 3).

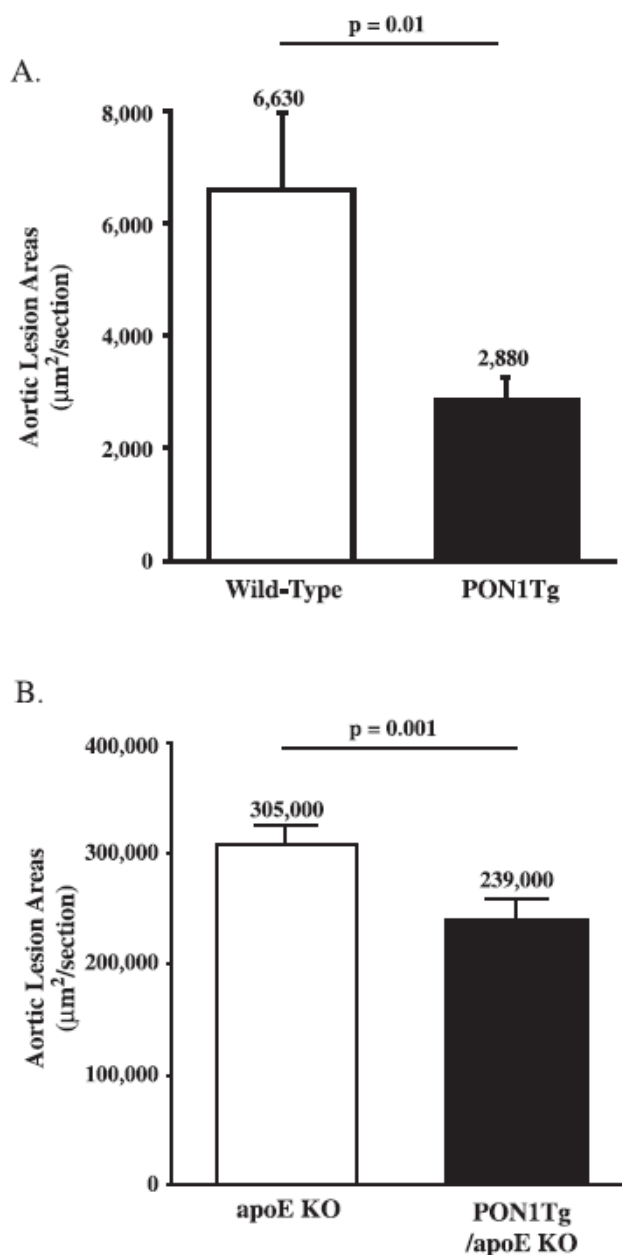
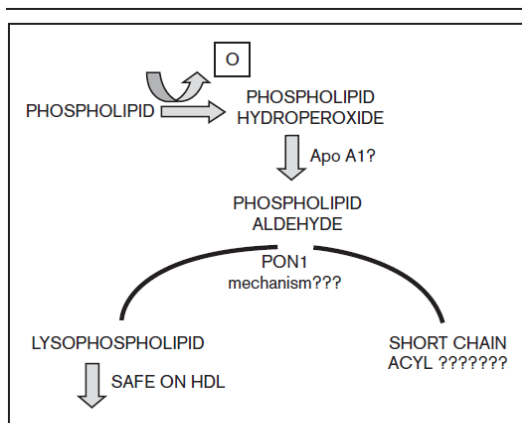


Figura 3. Ratos transgénicos para PON1 são mais resistentes à aterosclerose. (A) Ratos macho e fêmea C57BL/6J transgénicos para a PON1 humana (Tg) (n=24) e *wild-type* (n=25) foram submetidos a dieta aterogénica durante 15 semanas antes de serem determinadas as áreas das lesões na raiz da aorta. (B) Ratos knock out para ApoE (n=21) e transgénicos para hPON1 e knock out para ApoE (n=18) foram submetidos a dieta normal até aos 6,5 meses de idade antes de serem determinadas as áreas das lesões na raiz da aorta. ApoE, apolipoproteína E. Retirado de Tward et al., 2002.

Os efeitos antiaterogénicos da PON1 são devidos à hidrólise de fosfolípidos oxidados biologicamente activos e hidroperóxidos colesteril-éster das lipoproteínas LDL e HDL (Mackness et al., 1991, 1995; Watson et al., 1995; Aviram et al., 1998; Ahmed et al., 2001). Ahmed et al. (2001, 2002) compararam os produtos da oxidação de HDL puro, HDL tripsinizado e suspensões lipídicas de HDL e proteolipossomas de fosfatidilcolina e apolipoproteína A1 e verificaram que a apolipoproteína A1 aumentava a formação de aldeídos de fosfatidilcolina. Por sua vez, a lisofosfatidilcolina foi encontrada em quantidades significativas somente durante a oxidação de HDL puro, o que evidencia a activação de uma actividade de fosfolipase A2. Concluiu-se que a PON1 tinha actividade de fosfolipase A2 nos aldeídos de fosfatidilcolina. Mackness e Durrington (1995) já tinham referido que a actividade de fosfolipase A2 nas HDL se deve à PON1 e não a uma enzima separada. A figura 4 mostra o possível mecanismo principal de acção da PON1 elaborado por Mackness et al. (2004) a partir de várias fontes. A redução do stress oxidativo nos macrófagos é outro mecanismo da acção protectora da PON1, como mostraram Rozenberg et al. (2003). No sangue, a PON1 tem ainda outra função cardioprotectora em estudo, a hidrólise de tiolactonas de homocisteína, um metabolito da homocisteína que pode ter efeitos adversos na síntese proteica e provocar disfunção endotelial e lesão vascular (Jakubowski, 2000, 2005).

Vários estudos revelam que a actividade da PON1 é mais baixa em indivíduos mais susceptíveis ao desenvolvimento de aterosclerose, como diabeticos do tipo 1 e 2 (especialmente quando estão presentes lesões vasculares), doentes com hipercolesterolemia familiar e doença renal (Mackness et al., 1991; Mackness et al., 1998; Hasselwander et al., 1999; Mackness et al. 2000; Boemi et al., 2001; Mackness et al., 2002) (Figura 5). Estas observações tornam evidente o envolvimento da PON1 no processo de aterogénese.



Apo A1, apolipoprotein A1; HDL, high-density lipoprotein.

Figura 4. Esquema proposto do mecanismo de ação da PON1 na hidrólise de hidroperóxidos lipídicos. Elaborado por Mackness et al. a partir de várias fontes. Retirado de **Mackness et al., 2004.**

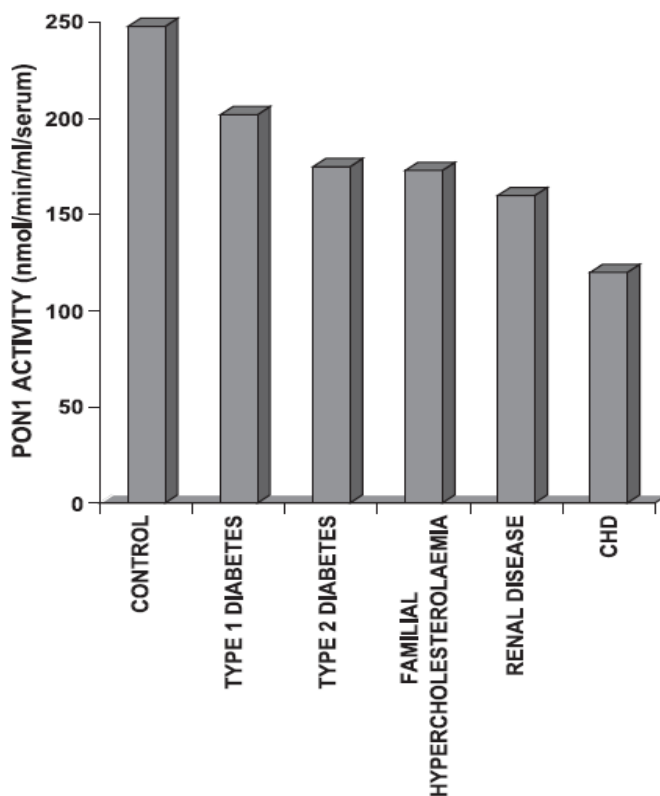


Figura 5. Atividades relativas da PON1 em populações com risco aumentado de desenvolver aterosclerose em comparação com um grupo controlo saudável e um grupo de doentes coronários isquémicos (CHD). Todas as populações são significativamente diferentes do grupo controlo, $p \leq 0,05$. Dados estatísticos adaptados de Mackness et al., 1991; Mackness et al., 1998; Hasselwander et al., 1999; Mackness et al. 2000; Boemi et al., 2001; Mackness et al., 2002. CHD, coronary heart disease. Retirado de **Mackness e Mackness, 2004.**

3. Os polimorfismos do gene PON1

Várias observações anteriores indicaram que a actividade da PON1 sérica nas populações humanas apresentava uma distribuição polimórfica (Costa et al., 2003). Estão descritos perto de 200 polimorfismos do gene da proteína PON1, alguns nas regiões codificadoras e outros nos intrões e regiões reguladoras do gene (Durrington et al., 2001; Furlong et al., 2008). Existem 2 polimorfismos principais na região codificadora, que são os mais referidos na literatura: uma substituição de glutamina por arginina na posição 192 (Q192R) e uma substituição de leucina por metionina na posição 55 (L55M). Além destes dois polimorfismos na região codificadora do gene da PON1, um terceiro polimorfismo mais importante foi encontrado na região não codificadora do gene designado C-108T (Brophy et al., 2002), situado num local de ligação do factor de transcrição Sp1 (Deakin et al., 2003). A aloforma Q192 hidrolisa o paraoxão com menos eficiência do que a aloforma R192, enquanto o contrário se verifica no caso dos agentes tóxicos sarin ou soman (Davies et al., 1996). A forma Q192 é também mais eficiente no metabolismo das HDL e LDL oxidadas do que a R192 (Aviram et al., 2000). Enquanto que este polimorfismo se relaciona com a actividade da paraoxonase, o polimorfismo L55M está associado aos níveis plasmáticos ou concentração da PON1. A forma M55 está associada com baixos níveis plasmáticos de PON1, mas parece ser devido primariamente a um desequilíbrio de ligação com a forma -108T do polimorfismo da região não codificadora atrás referido. O alelo -108C está associado a níveis plasmáticos de PON1 que são o dobro dos do alelo -108T (Brophy et al., 2001). Existem outros polimorfismos descritos na região promotora do gene, sendo contudo menos relevantes (Suehiro et al., 2000; Leviev e James., 2000; Brophy et al., 2001).

A figura 6 representa alguns polimorfismos do gene da PON1 e as respectivas frequências identificadas pelo sequenciamento SeattleSNP (Furlong et al., 2008).

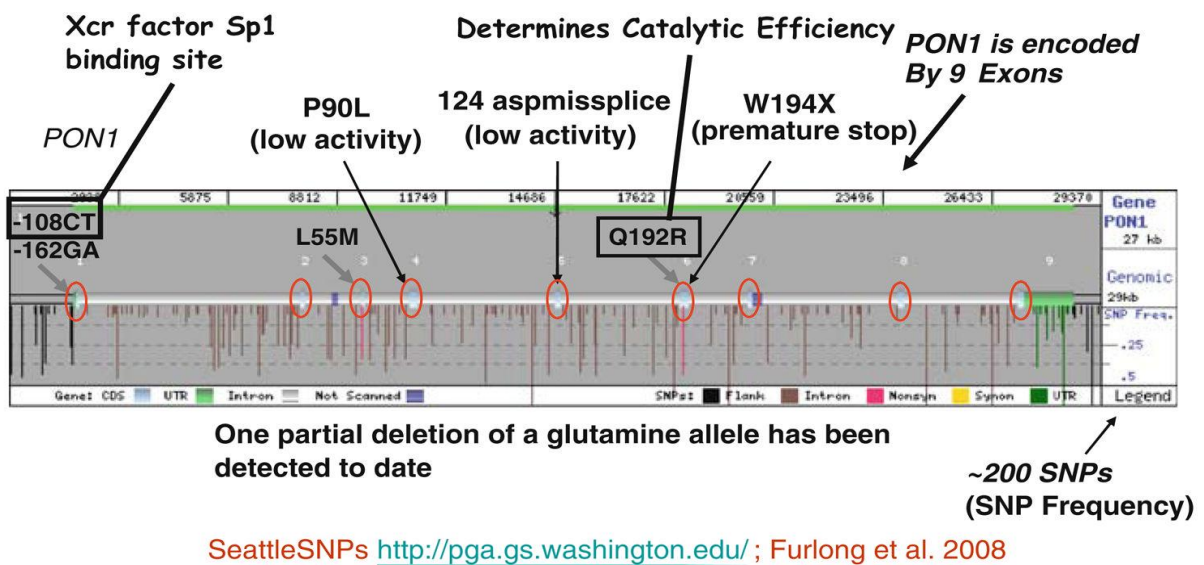


Figura 6. Os polimorfismos do gene humano PON1 e as suas frequências. A extremidade 5' do gene está à esquerda. (Seattle SNPs, <http://pga.gs.washington.edu/>). Retirado de **Furlong et al., 2008.**

IV. Genótipo vs. fenótipo da PON1 na determinação do risco de doença coronária isquémica

1. Estudos genéticos – polimorfismos da PON1

A descoberta de polimorfismos no gene da PON1 motivou os investigadores a realizar estudos genéticos que pudessem determinar a relação entre as variações polimórficas da enzima e o risco de doença coronária isquémica. Embora alguns estudos genéticos clínicos e epidemiológicos do tipo caso-controlo tenham referido uma associação entre os polimorfismos das regiões codificadora e promotora do gene PON1 e o risco de doença coronária isquémica, muitos outros, com destaque para o estudo prospectivo *Northwich Park Heart II*, não revelaram essa associação (Durrington et al., 2001; Robertson et al., 2003).

Mackness et al. (2000) conduziram a primeira meta-análise de 19 estudos publicados até esse ano sobre o polimorfismo Q192R da PON1 e a doença coronária isquémica: embora a relação seja significativa (odds ratio 1,5 (1,2-1,7)), este efeito pareceu dever-se mais ao facto da associação entre o polimorfismo Q192R e a doença coronária isquémica ser altamente significativa nas populações de diabéticos tipo 2 (Mackness et al., 2001). Com efeito, varios estudos sugeriram que o alelo R192 aumentava a susceptibilidade a outros factores de risco de doença coronária isquémica bem estabelecidos, como diabetes melítus (Ikeda et al., 1998), tabagismo (James et al., 2000) e idade (Senti et al., 2001).

Existem menos estudos de tipo caso-controlo do polimorfismo L55M. Alguns revelaram uma associação entre o alelo M55 e a aterosclerose (Blatter-Garin et al., 1997; Salonen et al., 1999) enquanto outros concluem o contrário (Sanghera et al., 1998; Arca et al. 2002).

Com efeito, ocorreram resultados bem contraditórios em vários estudos epidemiológicos genéticos. Uma das razões apontadas é o problema da distribuição dos alelos ser diferente conforme a população étnica considerada, que deve ser considerado ao interpretar-se a relação

entre os polimorfismos da PON1 e a doença coronária isquémica (Brophy et al., 2002). O genótipo Q predomina nos Caucasianos enquanto o genótipo R predomina nas raças Negra e Oriental (La Du, 1992); no entanto, as taxas de doença coronária isquémica destas últimas, pelo menos nos seus países de origem, é mais baixa que nos Caucasianos (Durrington, 1995). Existem vários estudos que revelam mais resultados surpreendentes, como o alelo R192 estar associado a um pequeno mas significativo aumento da longevidade numa população da Irlanda do Norte (Rea et al., 2004), ou o alelo 55M estar relacionado com um efeito protector (Tobin et al., 2004), dois alelos mais associados ao aumento do risco cardiovascular. Este tipo de discrepâncias requer mais investigações para a sua resolução.

Uma meta-análise de 2004 realizada por Wheeler et al., que incluiu dados de todos os estudos publicados sobre as variantes polimórficas da enzima PON1, envolveu um total de 11212 doentes coronários isquémicos e 12786 controlos (Figura 7). A associação da doença coronária isquémica com os polimorfismos L55M e C-108T não foi significativa: os riscos relativos por alelo foram 1,0 (0,95-1,06; IC 95%) para o alelo 55M e 1,02 (0,92-1,14) para o alelo -108T. Houve uma relação global fraca da doença coronária isquémica com o polimorfismo Q192R: o risco relativo por alelo foi de 1,12 (1,07-1,16) para o alelo 192R (Figura 7). Esta associação não é significativa se apenas se tratarem os dados dos cinco maiores estudos, passando o risco relativo a ser de 1,05 (0,98-1,13) (Wheeler et al., 2004). Segundo os autores os resultados deste e de outros trabalhos acerca da influência dos polimorfismos da PON1 na determinação do risco cardiovascular podem apresentar o viés da não publicação de pequenos estudos inconclusivos.

O *Northwick Park Heart Study II* é um estudo prospectivo que procurou numa população de 3052 homens, com idades compreendidas entre os 50 e os 60 anos, a associação entre os diferentes polimorfismos da PON1 e a ocorrência de eventos cardiovasculares. Em 205 eventos documentados ao longo de 6 anos, os autores não encontraram associação directa para

os polimorfismos Q192R e L55M do gene da proteína PON1 (Robertson et al., 2003). Um outro estudo prospectivo, designado *Lipoprotein and Coronary Atherosclerosis Study*, revelou que o polimorfismo Q192R não estava associado com a gravidade, progressão ou regressão da aterosclerose coronária, nem com os eventos clínicos ou a resposta à fluvastatina (Turban et al., 2001).

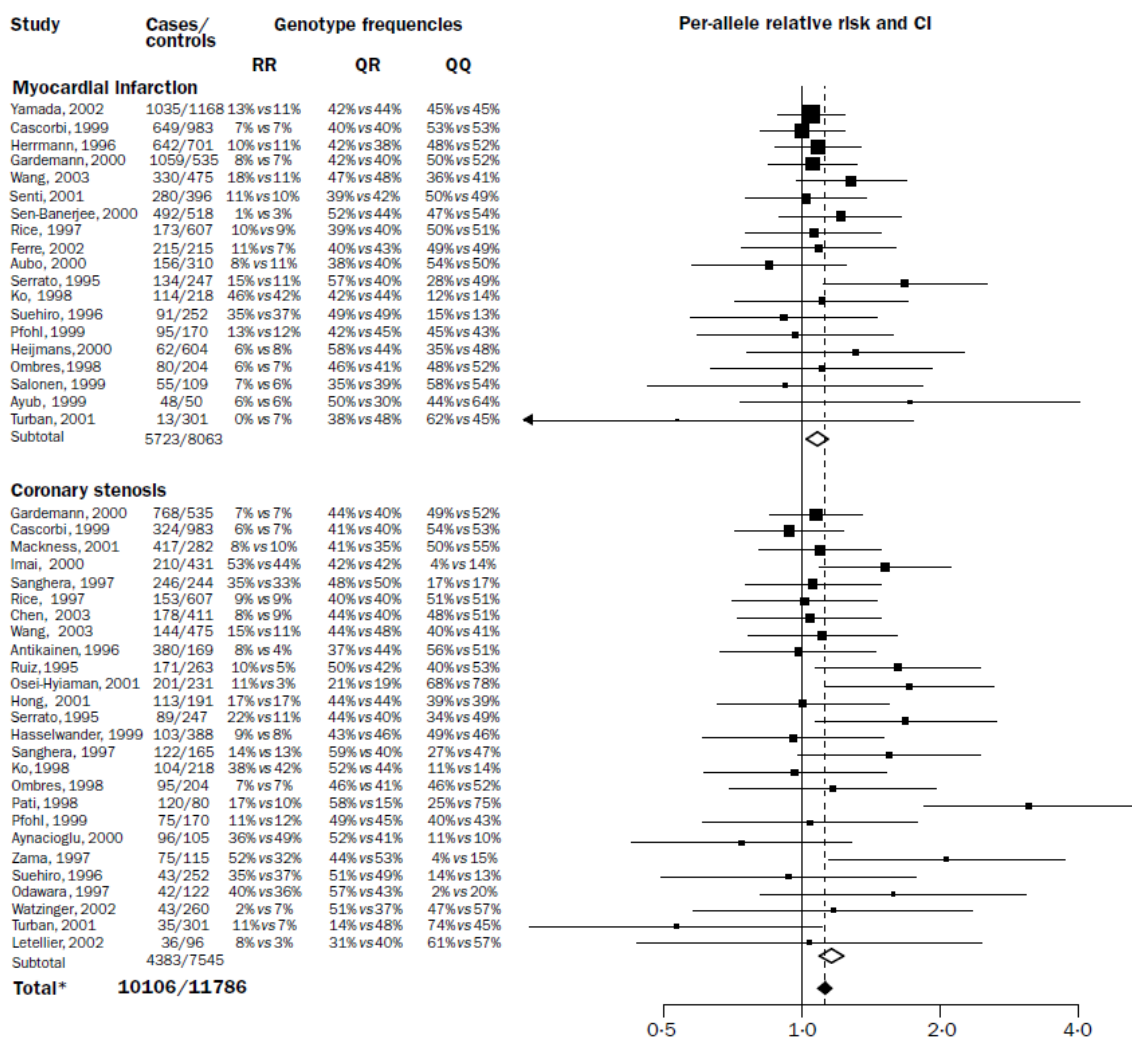


Figura 7. Meta-análise de estudos da associação entre o polimorfismo Q192R da PON1 e a doença coronária isquémica. Segundo os autores, a não publicação de pequenos estudos não conclusivos afecta os resultados da meta-análise. O tamanho dos quadrados relaciona-se com o número de doentes em cada estudo. O eixo horizontal tem uma escala logarítmica dupla. O número total de casos refere-se à soma dos doentes com enfarte do miocárdio e doentes com estenose aórtica, uma vez que nenhum doente manifestou ambos os episódios. Retirado de **Wheeler et al., 2004**.

2. Estudos de actividade – *status* funcional da PON1

Vários resultados dos estudos genéticos referidos, além de outros, parecem indicar que o controlo genético da PON1 é muito menos importante do que determinados factores ambientais com influência na actividade da enzima. Em comparação com os estudos epidemiológicos genéticos, os estudos epidemiológicos que envolveram a determinação da actividade e/ou concentração da enzima ocorreram em menor número.

Mackness et al. (2001) estudaram a actividade e concentração da PON1 e a distribuição de alelos para os polimorfismos Q192R e L55M do seu gene, em 417 doentes com coronariopatia isquémica comprovada por angiografia, e num grupo controlo saudável de 282 indivíduos. Os resultados mostraram que a actividade e a concentração da PON1 eram significativamente mais baixas nos doentes coronários isquémicos do que no grupo-controlo: actividade de paraoxonase 122,8 vs. 214,6 nmol/min/mL, $p < 0,001$; concentração 71,6 vs. 89,1 $\mu\text{g/mL}$, $p < 0,001$. Não existiam diferenças significativas entre os dois grupos nas frequências dos alelos e dos genótipos para os 2 principais polimorfismos, confirmados por PCR. Jarvik et al. (2000, 2003) concluíram igualmente, nos seus trabalhos, que a baixa actividade e concentração da PON1 eram mais determinantes da presença de doença coronária isquémica do que os polimorfismos da enzima.

Numa dada população, a actividade da PON1 pode variar até 40 vezes (Mueller et al., 1983; Richter e Furlong., 1999), e níveis plasmáticos até 13 vezes diferentes podem ser encontrados num mesmo genótipo (Costa et al., 2003). Apesar de uma parte destas variações poder ser explicada pela natureza polimórfica do gene, os factores de risco adquiridos, prevalentes na doença coronária isquémica, podem desempenhar um papel mais importante, não tido em conta nos estudos genotípicos directos.

A análise genómica funcional é um método mais informativo uma vez que a medição da função da PON1 no indivíduo (actividade plasmática) tem em conta todos os polimorfismos

que possam afectar a actividade da enzima. Uma vez que não existe um método que avalie directamente a hidrólise de hidroperóxidos lipídicos, utiliza-se um método enzimático de alto débito que envolve dois substratos da PON1, normalmente o diazoxão e o paraoxão (Richter e Furlong, 1999). Este método enzimático, mediante o gráfico das actividades de paraoxonase *vs.* diazoxonase, permite a inferência do genótipo do indivíduo para o polimorfismo Q192R (que pode ser confirmado por PCR), e a determinação dos níveis plasmáticos de PON1 em cada indivíduo, englobando assim os dois principais factores que afectam a actividade e/ou concentração da enzima. Considera-se que este método determina o *status* funcional da enzima (Richter e Furlong, 1999). A figura 8 representa a comparação de dois protocolos para a determinação do *status* da PON1, em que o primeiro utiliza os substratos altamente tóxicos diazoxão e paraoxão, e o segundo utiliza os substratos não-organofosforados fenilacetato e CMPA (4-clorometil-fenilacetato), um método recente que pode ser de grande utilidade aos laboratórios sem equipamento para a utilização de compostos com altos níveis de toxicidade (Richter et al., 2008, 2009). A quantificação da actividade de hidrólise de fenilacetato (arilesterase) não é afectada pelo polimorfismo Q192R e pode de forma fiável indicar os níveis plasmáticos da enzima PON1 (Furlong et al., 2006; Richter et al., 2008). A concentração de PON1, que deve ser medida em qualquer estudo epidemiológico, pode também ser determinada pelo método ELISA.

Num estudo prospectivo de 1353 homens (idades compreendidas entre 49 e 65 anos), por um período médio de 15 anos, Mackness et al. (2003) verificaram que a actividade da PON1 era 20% mais baixa nos 163 homens que sofreram um evento coronário agudo (enfarte agudo do miocárdio, fatal ou não) ($p=0,039$). Os homens no quintil com mais alta actividade da PON1 tinham um risco diminuído relativamente aos indivíduos no quintil com a actividade da PON1 mais baixa (odds ratio 0,57 IC 95% (0,33 – 0,96)). Nesse trabalho, os autores concluíram que a baixa actividade da PON1 no substrato paraoxão é um factor de risco da

ocorrência de eventos cardiovasculares independente nos doentes em maior risco, que tenham doença preexistente (n=313) ou outros factores de risco associados (n=390).

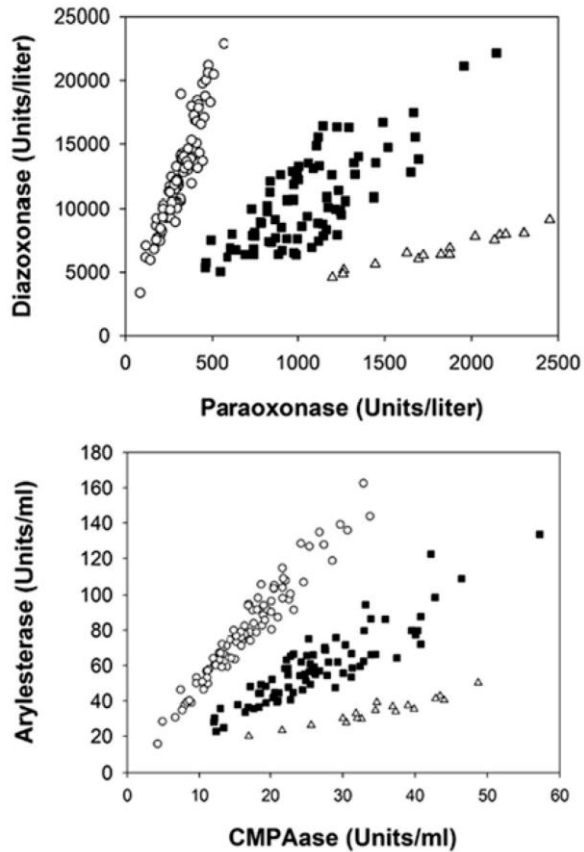


Figura 8. Comparação de dois protocolos para a determinação do *status* da PON1. Estes protocolos *dual-subtract* permitem inferir o genótipo para o polimorfismo Q192R. Em cima: protocolo que utiliza os substratos organofosforados altamente tóxicos diazoxão e paraoxão. Em baixo: protocolo que utiliza os substratos não organofosforados fenilacetato e CMAA. 183 amostras de plasma incluem 86 homocigóticos 192Q (círculos), 79 heterocigóticos (quadrados) e 18 homocigóticos 192R (triângulos) com os genótipos confirmados por PCR. Retirado de Richter et al., 2010.

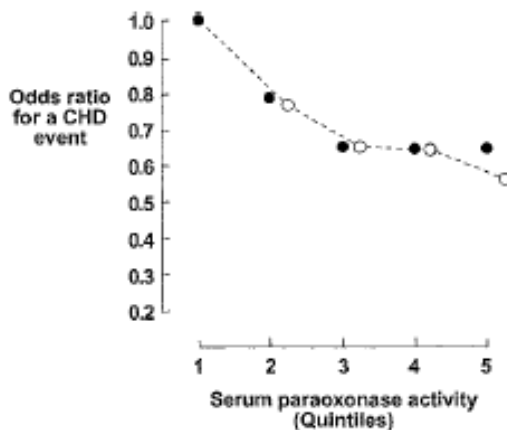


Figura 9. Odds ratio da ocorrência de um novo evento coronário agudo para os quintis de actividade sérica da PON1, em 1353 homens (o quintil 1 tem a actividade enzimática mais baixa). Os valores de odds ratio foram ajustados para: idade, história familiar, hábitos tabágicos, IMC, história de doença coronária isquémica, diabetes, pressão arterial, colesterol total, triglicérideos e colesterol HDL. Os valores não ajustados estão dispostos no gráfico a tracejado. Retirado de Mackness et al., 2003.

V. A PON 1 e os fármacos antidislipidémicos

A importância do *status* funcional da PON1 na determinação do risco de doença coronária isquémica, que emergiu dos resultados dos estudos de actividade, motivou os investigadores a debruçarem-se no estudo dos factores não genéticos que podem ser moduladores da actividade da enzima e dos níveis de expressão (Durrington et al., 2002; Ferrè et al., 2003). Pode ler-se num artigo de revisão de Mackness et al. (2004):

Em virtude de descobertas recentes, consideramos que não devem ser realizados mais estudos epidemiológicos genéticos dos polimorfismos da PON1 e da sua relação com a doença coronária isquémica, a não ser que envolvam um grande número de doentes e sejam de tipo prospectivo. Mais investigação deve ser feita para descobrir os mecanismos bioquímicos subjacentes ao modo de acção da paraoxonase 1 e os factores que modulam a sua actividade e/ou concentração.

Costa et al. descrevem num artigo de revisão muito recente (2011) a influência de factores ambientais farmacológicos, de estilo de vida e de dieta na actividade da enzima PON1. A presente revisão não tem como objectivo a exposição detalhada de cada um dos factores moduladores da actividade da PON1, mas estudar a relação entre a PON1 e os fármacos utilizados no tratamento da dislipidémia. Vários trabalhos trouxeram conclusões interessantes, nomeadamente acerca da influência da actividade da PON1 e do seu genótipo no sucesso do tratamento da dislipidémia com estatinas (Malin et al., 2001; Van Himbergen et al., 2005; Deakin et al., 2007). No entanto, há resultados opostos em vários estudos, quando apenas se avaliam os efeitos do tratamento com estatinas ou fenofibratos na actividade e concentração da PON1.

1. Efeito das estatinas e dos fenofibratos na actividade da PON1

Gouedard et al. (2003) expôs *in vitro* células de hepatoma humano HuH7 a pravastatina, simvastatina e fluvastatina (10-100 μ M), e obteve uma diminuição de 25-50% na actividade da PON1 no meio de cultura e uma diminuição equiparada na expressão do mRNA da enzima, sendo estes efeitos revertidos pelo mevalonato (Figura 10). No mesmo estudo, o fenofibrato (250 μ M) foi responsável por um aumento de 50% na actividade da enzima e de 30% no mRNA. Nesse artigo, os autores concluem que o fenofibrato induziu a actividade promotora do gene enquanto as estatinas tiveram um efeito contrário. Num estudo *in vitro* anterior, dois metabolitos oxidados da atorvastatina (p-hidroxi e o-hidroxi) (5-50 μ M), e um metabolito do gemfibrozil (2-80 μ M), mas não os compostos relacionados, aumentavam a actividade da PON1 associada às HDL isoladas (Aviram et al., 1998). Em ratos, houve um trabalho no qual a administração de fluvastatina (20mg/kg/dia durante 3 semanas) reduziu a actividade plasmática e hepática da PON1, enquanto que uma dose menor (2mg/kg/dia) tinha efeito apenas na actividade hepática. A pravastatina (4 e 40mg/kg/dia) não tinha efeito na actividade plasmática da PON1 (Beltowski et al., 2004). Noutro estudo em ratos (Wistar), dos mesmos autores (2002), uma outra estatina, a cerivastatina, também provocou diminuição da actividade e concentração da PON1.

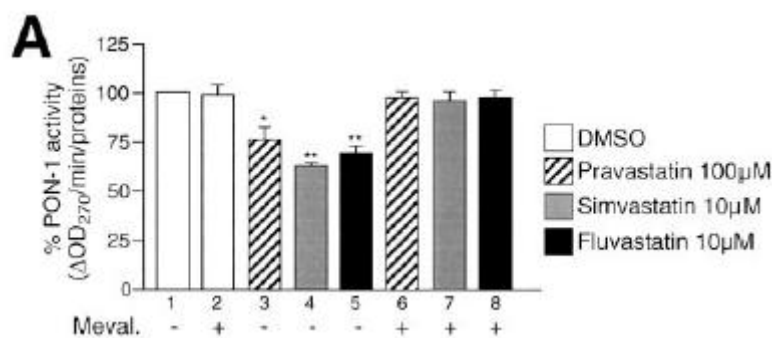


Figura 10. Diminuição da actividade da PON1 em células HuH7 pelas estatinas pravastatina, simvastatina e fluvastatina. O efeito é revertido pelo mevalonato. DMSO, grupo controlo tratado apenas com veículo solvente a 10% v/v. Retirado de Gouedard et al., 2003.

Deakin et al. (2003) realizaram um estudo em células hepáticas humanas HepG2 e verificaram, por sua vez, que a simvastatina (1,2-25µg/mL) aumentava de forma dependente da dose a actividade promotora do gene PON1 ao aumentar um factor de transcrição nuclear, *sterol regulatory element-binding protein – 2* (SREBP-2); constatava-se ainda que era possível reverter o efeito pelo mevalonato. Nesse estudo, o SREBP-2 aumentava *in vitro* a actividade promotora do gene, e pacientes tratados com estatinas apresentavam aumento da actividade de arilesterase e da concentração da PON1 sérica. Ota et al. (2005) fizeram outro estudo, e demonstraram que a pitavastatina, a atorvastatina e a simvastatina aumentavam a actividade promotora da gene PON1 em células HepG2 e HEK293 (linha de células embrionárias de rim humano). O efeito na expressão da PON1, de acordo com os autores, era mediado pela activação de Sp1 e era revertido pelo mevalonato. Deakin et al. (2007) confirmaram o papel de SREBP-2 e Sp1 no aumento da expressão da PON1 causado pela simvastatina em células da linha HepG2. Os autores referem, para além disso, que a ligação dos factores de transcrição induzida pela simvastatina, e o consequente aumento da actividade promotora do gene, eram mais pronunciados no alelo -108C do que no alelo -108T. Assim, os pacientes com o alelo -108C, que já possuem por isso níveis mais elevados de PON1, poderiam ter maior aumento na expressão de PON1 com o tratamento com estatinas do que os pacientes com o alelo -108T. Outro estudo revelou, no entanto, que o tratamento de doentes com hipercolesterolemia com atorvastatina aumentava a actividade da PON1 sérica, mas neste caso, de forma independente do genótipo para os polimorfismos Q192R, L55M e C-108T (Sardo et al., 2005).

Num estudo recente em células da linha HuH7, Arii et al. (2009) mostrou que também a pitavastatina aumentava a actividade promotora do gene e a expressão da proteína PON1 através dos factores de transcrição Sp1 e SREBP-2. Os autores referem que a activação dos factores de transcrição resultava da activação pela pitavastatina das proteína-cinases

mitogéneas p44/42, e levantam a possibilidade de outros factores que actuem por esta via afectarem também a expressão da PON1. Num estudo recente em células HuH7, a simvastatina aumentava duas vezes a actividade da PON1 (Ahmad et al., 2010).

Os estudos *in vivo* da acção das estatinas e dos fenofibratos na actividade da PON1 trouxeram também resultados diferentes. Num estudo recente de caso-controlo com 138 doentes coronários isquémicos com indicação para angiografia (e possível angioplastia) coronária percutânea, a concentração e a actividade da PON1 estavam aumentadas significativamente nos 64 doentes tratados com estatinas (Poulakou et al., 2008). Foram encontrados aumentos ligeiros, de 5 a 23%, na actividade da PON1 sérica em doentes tratados com simvastatina (Figura 11) (Deakin et al., 2003; Mirdamadi et al., 2008) e atorvastatina (Paragh et al., 2004; Mirdamadi et al., 2008; Arangi et al., 2009; Kassai et al., 2007). No seu estudo prospectivo randomizado de 49 doentes com hipercolesterolemia dos tipos IIa e IIb, Paragh et al. (2004) não detectaram efeitos na actividade da PON1 nos pacientes tratados durante 3 meses com simvastatina (20mg/dia), mas apenas naqueles tratados com atorvastatina (10mg/dia) durante o mesmo período, que apresentavam aumento da actividade da PON1. No caso dos fenofibratos, estudos de doentes tratados com gemfibrozil e fenofibrato detectaram um aumento na actividade da PON1 (Jarvik et al., 2002; Balogh et al., 2002; Paragh et al., 2003; Yesilbursa et al., 2005), mas trabalhos anteriores com pacientes tratados com ciprofibrato (Turay et al., 2000), benzafibrato e gemfibrozil (Durrington et al., 1998) não referem qualquer efeito.

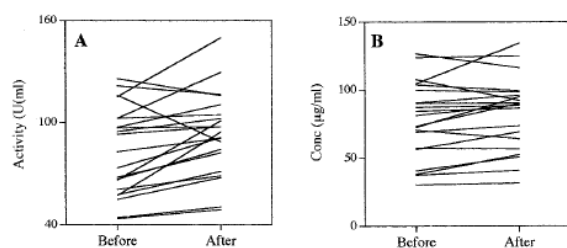


Figura 11. Respostas individuais da actividade de arilesterase (A) e da concentração da PON1 (B) ao tratamento com 20 mg de simvastatina por dia (se tratamento prévio), em pacientes não diabéticos com hipercolesterolemia e doença coronária isquémica. *Before*, início do tratamento. *After*, 6,7 semanas depois, em média. Retirado de **Deakin et al., 2003**.

2. Efeitos da actividade da PON1 (e do genótipo) nos resultados do tratamento com estatinas

Com objectivos diferentes em comparação com os trabalhos atrás referidos, num estudo prospectivo, randomizado e duplamente cego com 51 doentes hipercolesterolémicos ligeiros, Maline et al. (2001) examinaram o efeito do genótipo da PON1 para o polimorfismo Q192R na resposta ao tratamento com pravastatina (6 meses). A resposta era quantificada como variação do colesterol HDL. Os autores verificaram que a pravastatina aumentava a concentração de colesterol HDL em portadores do alelo 192R o que não se verificava nos homocigóticos QQ.

Himbergen et al. (2005), ao estudar 134 doentes com hipercolesterolémia familiar, concluíram, por sua vez, que a concentração e a actividade da enzima PON1, e a concentração inicial do colesterol HDL, eram factores preditivos da resposta ao tratamento com estatinas (variação do colesterol HDL). Os resultados são mais evidentes ao utilizar-se uma classificação por grupos, baseada no *status* da PON1 e no nível inicial de colesterol HDL: o aumento no colesterol HDL foi mais pronunciado nos grupos com os genótipos -108TT/CT e 192RR/QR e com níveis iniciais baixos de colesterol HDL, e menos pronunciado nos grupos com os genótipos -108CC e 192QQ e com níveis iniciais altos de colesterol HDL.

Num trabalho mais recente, Mirdamadi et al. (2008) avaliaram os efeitos de tratamentos por 3 meses com atorvastatina (10mg/dia), simvastatina (10/20mg/dia) e fluvastatina de libertação prolongada (80mg/dia), quantificando a variação da actividade da PON1 e dos níveis de lipidémia, em 164 pacientes com hipercolesterolémia do tipo IIb. Os autores concluíram igualmente que o fenótipo da PON1, actividade e/ou concentração, pode ser um factor preditivo dos resultados do tratamento com estatinas.

VI. Conclusão e perspectivas futuras

Muitas investigações contribuíram para uma melhor compreensão da acção da PON1 no metabolismo de hidroperóxidos lipídicos, e da resultante participação no processo de formação de placas ateroscleróticas. A caracterização de alguns polimorfismos principais nas regiões promotora e codificadora do gene, que afectam a actividade e/ou concentração da enzima, levou à realização de estudos epidemiológicos genéticos e à determinação dos riscos relativos de doença coronária isquémica para as diferentes variações polimórficas. Devido a resultados pouco significativos em vários estudos genéticos, os investigadores passaram a recomendar, em trabalhos mais recentes, a avaliação da concentração e/ou actividade da enzima, para além do genótipo para o polimorfismo Q192R, determinando assim o *status* da PON1. Vários autores concluíram que a baixa actividade e concentração da PON1 eram mais determinantes da presença de doença coronária isquémica do que os polimorfismos da enzima (o fenótipo mais determinante do que o genótipo).

Mesmo que uma parte das diferenças na actividade e/ou na concentração da PON1, em diferentes indivíduos, possa ser explicada pela distribuição polimórfica do gene nas várias populações, há factores de modulação não genéticos importantes que contribuem para diferenças consideráveis na actividade da enzima, mesmo entre indivíduos do mesmo genótipo. A investigação passou a dirigir-se para o estudo dos mecanismos bioquímicos da acção da PON1 e dos vários factores que intervêm na modulação da sua actividade, em detrimento da realização de novos estudos de genótipo directos.

As estatinas são um grupo importante de fármacos para o tratamento da dislipidémia e a prevenção de doença coronária isquémica. Os estudos que testam o efeito das estatinas na actividade e/ou concentração da PON1 não são consensuais nas suas conclusões, bem como

no caso dos fenofibratos. No entanto, vários trabalhos sugerem um interesse adicional da PON1, e mostram que a actividade sérica da enzima é um factor preditivo da resposta ao tratamento com estatinas, avaliada pela variação dos parâmetros lipídicos.

Na comparação de opiniões de muitos autores, parece acreditar-se que, futuramente, a descoberta e a introdução de novos modos de intervenção nutricional e farmacológica, que aumentem com eficácia a actividade da PON1 sérica, poderão ter consequências clínicas perceptíveis na diminuição do risco de doença coronária isquémica. É orientada por estes desafios que a investigação laboratorial, clínica e epidemiológica da enzima PON1 deve prosseguir, no sentido da potencial diminuição das taxas de mortalidade e morbidade associadas às doenças cardiovasculares.

VII. Bibliografia

- Ahmad S, Carter JJ, Scott JE (2010) A homogenous cell-based assay for measurement of endogenous paraoxonase activity. *Anal Biochem* 400:1–9.
- Ahmed Z, Ravandi A, Maguire GF, et al. (2001) Apolipoprotein AI promotes the formation of phosphatidylcholine core aldehydes that are hydrolysed by paraoxonase (PON1) during high density lipoprotein oxidation with a peroxy nitrite donor. *J Biol Chem* 2001; 276:24473–24481.
- Ahmed Z, Ravandi A, Maguire GF, et al. (2002) Multiple substrates for paraoxonase 1 during oxidation of phosphatidylcholine by peroxy nitrite. *Biochem Biophys Res Commun* 290:391-396.
- Arca M, Ombres D, Montali A, et al. (2002) PON1 L55M polymorphism is not a predictor of coronary atherosclerosis either alone or in combination with Q192R polymorphism in an Italian population. *Eur J Clin Invest* 32:9-15.
- Arii K, Suehiro T, Ota K, Ikeda Y, Kumon Y, Osaki F, et al. (2009) Pivastatin induces PON1 expression through p44/42 mitogen-activated protein kinase signaling cascade in Huh7 cells. *Atherosclerosis* 202:439–45.
- Assmann G, Schulte H, von Eckardstein A, Huang Y. (1996) High density lipoprotein cholesterol as a predictor of coronary heart disease risk: the PROCAM experience and pathophysiological implications for reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis* 1996; 124:S11-S20.
- Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS, Primo-Parmo SL, La Du BN (1998) Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest* 101:1581–1590.
- Aviram M, Billecke S, Sorenson R, et al. (1998) Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulphhydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraoxonase activities: selective action of human paraoxonase alloenzymes Q and R. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 10:1617–1624.
- Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS (1998) Atorvastatin and gemfibrozil metabolites, but not the parent drugs, are potent antioxidants against lipoprotein oxidation. *Atherosclerosis* 138:271–280.
- Aviram M, Hardak E, Vaya J, et al. (2000) 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* 101:2510–2517.
- Balogh Z, Seres I, Marangi M, Kovacs P, Kakuk G, Paragh G (2001) Gemfibrozil increases paraoxonase activity in type 2 diabetic patients. A new hypothesis of the beneficial action of fibrates? *Diabetes Metab* 27:604–10.
- Bełtowski J, Wójcicka G, Jamroz A (2002) Differential effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors on plasma paraoxonase 1 activity in the rat. *Pol J Pharmacol* 54(6):661-71.

- Beltowski J, Wojcicka G, Jamroz A (2004) Effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors (statins) or tissue paraoxonase 1 and plasma platelet activating factor acetylhydrolase activities. *J Cardiovasc Pharmacol* 43:121–7.
- Blatter-Garin M-C, James RW, Dussoix P, et al. (1997) Paraoxonase polymorphism Met-Leu 54 is associated with modified serum concentrations of the enzyme. *J Clin Invest* 99:62-66.
- Boemi M, Leviev I, Sirolla C, Pieri C, Marra M, James RW (2001) 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* 155:229– 235.
- Brophy VH, Hastings MD, Clendenning JB, et al. (2001) Polymorphisms in the human paraoxonase (PON1) promoter. *Pharmacogenetics* 11:77-84.
- Brophy VH, Jampsa RL, Clendenning JB, McKinsty LA, Jarvik GP, Furlong CE (2001) Effects of 50 regulatory-region polymorphisms on paraoxonase- gene (PON1) expression. *Am J Hum Genet* 68:1428–36.
- Brophy VH, Jarvik GP, Furlong CE (2002) PON1 polymorphisms. In: Costa LG, Furlong CE, editors. *Paraoxonase (PON1) in health and disease: basic and clinical aspects*. pp 53–77 Boston: Kluwer Academic Publishing.
- Castelli WP, Garrison RJ, Wilson PW, et al. (1986) Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham Study. *JAMA* 256:283-2838.
- Castelli, W. P. Lipids, risk factors and ischaemic heart disease. (1996) *Atherosclerosis* 124 (Suppl.):S1 – S9.
- Christidis DS, Liberopoulos EN, Kakafika AI, Miltiados GA, Liamis GL, Kakaidi B, Tselepis AD, Cariolou MA, Elisaf MS (2007) Effect of paraoxonase 1 polymorphisms on the response of lipids and lipoprotein-associated enzymes to treatment with fluvastatin. *Arch Med Res* 38(4):403-10.
- Costa LG, Furlong CE (2002) *Paraoxonase (PON1) in health and disease: basic and clinical aspects*. Boston: Kluwer Academic.
- Costa LG, Cole TB, Jarvik GP, Furlong CE (2003) Functional genomics of the paraoxonase (PON1) polymorphisms: effects on pesticide sensitivity, cardiovascular disease, and drug metabolism. *Annu Rev Med* 2003;54:371–92.
- Costa LG, Giordano G, Furlong CE (2011) Pharmacological and dietary modulators of paraoxonase 1 (PON1) activity and expression: The hunt goes on. *Biochem Pharmacol* 81:337-344.
- Davies H, Richter RJ, Kiefer M, Broomfield C, Sowalla J, Furlong CE (1996) The human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin. *Nat Genet* 14:334–6.
- Deakin S, Leviev I, Brulhart-Meynet M-C, James RW (2003) Paraoxonase-1 promoter haplotypes and serum paraoxonase: a predominant role for polymorphic position –107, implicating the Sp1 transcription factor. *Biochem J* 372:643–649.
- Deakin S, Leviev I, Guernier S, James RW (2003) Statin modulates expression of the PON1 gene and increases serum paraoxonase. A role for sterol regulatory element-binding protein-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 2083–9.

- Deakin S, Guernier S, James RW (2007) Pharmacogenetic interaction between paraoxonase-1 gene promoter polymorphism C-107T and statin. *Pharmacogenet Genomics* 17:451–7.
- Draganov DI, La Du BN (2004) Pharmacogenetics of paraoxonase: a brief review. *Naunyn's Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 369:79–88.
- Draganov D, Stetson PL, Watson C, Billecke S, LaDu BN (2000) Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high-density lipoprotein-associated lactonase and protects lipoprotein against oxidation. *J Biol Chem* 275:33435–42.
- Durrington PN (1995) *Hyperlipidaemia: Diagnosis and Management*. 2nd ed. London: Butterworth–Heinemann.
- Durrington PN, Mackness MI, Bhatnagar D, Julier K, Prais H, Arrol S (1998) et al. Effects of two different fibric acid derivatives on lipoproteins, cholesterol ester transfer, fibrinogen, plasminogen activator inhibitor and paraoxonase activity in type IIb hyperlipoproteinemia. *Atherosclerosis* 138:217–25.
- Durrington PN, Mackness B, Mackness MI (2001) Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:473–480.
- Durrington PN, Mackness B, Mackness MI (2002) The hunt for nutritional and pharmacological modulators of paraoxonase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:1248–50.
- Furlong C, Holland N, Richter R, Bradman A, Ho A, Eskenazi B (2006) PON1 status of farm-worker mothers and children as a predictor of organophosphate sensitivity. *Pharmacogenet Genomics* 16:183–190.
- Ferrè N, Camps J, Fernandez-Ballart J, Arija V, Murphy MM, Ceruelo S, et al. (2003) Regulation of serum paraoxonase activity by genetic, nutritional and lifestyle factors in the general population. *Clin Chem* 49:1491–7.
- Furlong CE, Richter RJ.; Li, W-F, Brophy VH, Carlson C, Meider M, Nickerson D, Costa LG, Ranchalis J, Lusic AJ, Shih DM, Tward A, Jarvik GP (2008) The functional consequences of polymorphisms in the human PON1 gene. In: Mackness B, Mackness M, Aviram M, Paragh G, editors. *The Paraoxonases: Their Role in Disease, Development and Xenobiotic Metabolism*. pp. 267-281. Dordrecht, The Netherlands: Springer.
- Gouedard C, Koum-Besson N, Barouki R, Morel Y (2003) Opposite regulation of the human paraoxonase-1 gene PON1 by fenofibrate and statins. *Mol Pharmacol* 63:945–56.
- Harangi M, Mirdamadi HZ, Seres I, Sztanek F, Molnar M, Kassai A, et al. (2009) Atorvastatin effect on the distribution of high-density lipoprotein subfractions and human paraoxonase activity. *Transl Res* 153:190–8.
- Himbergen TM, van Tits LJ, Voorbij HA, de Graaf J, Stalenhoef AF, Roest M (2005) The effect of statin therapy on plasma high-density lipoprotein cholesterol levels is modified by paraoxonase-1 in patients with familial hypercholesterolaemia. *J Intern Med* 258(5):442–9.
- Jakubowski H (2000) Calcium-dependent human serum homocysteine thiolactone hydrolase. A protective mechanism against protein Nhomocysteinylation. *J Biol Chem* 275:3957–62.

- Jakubowski H (2005) Anti-N-homocysteinylated protein autoantibodies and cardiovascular disease. *Clin Chem Lab Med* 43:1011–4.
- Jarvik GP, Rozek LS, Brophy VH, et al. (2000) Paraoxonase (PON1) phenotype is a better predictor of vascular disease than is PON1192 or PON155 genotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:2441–2447.
- Jarvik GP, Trevanian Tsai N, McKinstry LA, Wani R, Brophy VH, Richter RJ, et al. (2002) Vitamins C and E intake is associated with increased paraoxonase activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:1329–33.
- Jarvik GP, Hatsukami TS, Carlson C, et al. (2003) Paraoxonase activity, but not haplotype utilizing the linkage disequilibrium structure, predicts vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:1465–1471.
- La Du BN (1992) Human serum paraoxonase/arylesterase. In: Kalow W editors *Pharmacogenetics of drug metabolism*. pp. 51–91 New York: Pergamon Press.
- Kassai A, Illyes L, Mirdamadi HZ, Seres I, Kalmar T, Audikovszky M, et al. (2007) The effect of atorvastatin therapy on lecithin:cholesterol acyltransferase, cholesteryl ester transfer protein and the antioxidant paraoxonase. *Clin Biochem* 40:1–5.
- Leviev I, James RW (2000) Promoter polymorphisms of human paraoxonase PON1 gene and serum activities and concentrations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:516–521.
- Mackness B, Mackness MI, Arrol S, Turkie W, Julier K, Abuashia B, Miller JE, Boulton AJM, Durrington PN (1998) Serum paraoxonase (PON1) 55 and 192 polymorphism and paraoxonase activity and concentration in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 139:341–349.
- Mackness B, Durrington PN, Abuashia B, Boulton AJM, Mackness M (2000) Low paraoxonase activity in type II diabetes complicated by retinopathy. *Clin Sci* 98:355–363.
- Mackness B, Davies GK, Turkie W, Lee E, Roberts DH, Hill E, Roberts C, Durrington PN, Mackness MI (2001) Paraoxonase status in coronary heart disease: are activity and concentration more important than genotype? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:1451–1457.
- Mackness B, Durrington PN, Boulton AJM, Hine D, Mackness MI (2002) Serum paraoxonase activity in patients with type 1 diabetes compared to healthy controls. *Eur. J. Clin. Invest.* 32:259–264.
- Mackness B, Durrington P, McElduff P, Yarnell J, Azam N, Watt M, Mackness M (2003) Low paraoxonase activity predicts coronary events in the Caerphilly Prospective Study. *Circulation* 107:2775–2779.
- Mackness MI, Arrol S, Durrington PN (1991) Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett* 286:152–4.
- Mackness MI, Harty D, Bhatnagar D, Winocour PH, Arrol S, Ishola M, Durrington PN (1991) Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolaemia and insulin-dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 86:193–199.
- Mackness MI, Arrol S, Abbott C, Durrington PN (1993) Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high density lipoprotein associated paraoxonase. *Atherosclerosis* 104:129–135.

- Mackness MI, Durrington PN (1995) High density lipoprotein, its enzymes and its potential to influence lipid peroxidation. *Atherosclerosis* 115:243±253.
- Mackness M, Durrington P, Mackness B (2004) Paraoxonase 1 activity, concentration and genotype in cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 15:399-404.
- Mackness M, Mackness B (2004) Paraoxonase 1 and atherosclerosis: is the gene or the protein more important? *Free Rad Biol & Med* vol. 37; 9:1317-1323.
- Malin R, Laaksonen R, Knuuti J, et al. (2001) Paraoxonase genotype modifies the effect of pravastatin on high-density lipoprotein cholesterol. *Pharmacogenetics* 11:625-33 .
- Miller GJ, Miller NE (1975) Plasma high-density lipoprotein concentration and the development of ischaemic heart disease. *Lancet* 1: 16-19.
- Mirdamadi HZ, Sztanek F, Derdak Z, Seres I, Harangi M, Paragh G (2008) The human paraoxonase-1 phenotype modifies the effect of statins on paraoxonase activity and lipid parameters. *Br J Clin Pharmacol* 66:366–73.
- Mueller RF, Hornung S, Furlong CE, Anderson J, Giblett ER, Motulsky AG (1983) Plasma paraoxonase polymorphism: a new enzyme assay, population, family, biochemical and linkage studies. *Am J Hum Genet* 35:393–408.
- Navab M, Hama SY, Cooke CJ, Anantharamaiah GM, Chaddha M, Jin L, Subbanagounder G, Faull KF, Reddy ST, Miller NE, Fogelman AM (2000) Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: step 1. *J Lipid Res.* 41:1481– 1494.
- Navab M, Hama SY, Anantharamaiah GM, Hassan K, Hough GP, Watson AD, Reddy ST, Sevanian A, Fonarow GC, Fogelman AM (2000) Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: steps 2 and 3. *J Lipid Res* 41:1495–1508.
- Navab M, Anantharamaiah GM, Reddy ST, Van Lenten BJ, Ansell BJ, Fonarow GC, Vahabzadeh K, Hama S, Hough G, Kamranpour N, Berliner JA, Lusis AJ, Fogelman AM (2004) Thematic review series: the pathogenesis of atherosclerosis: the oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL. *J Lipid Res* 45:993– 1007.
- Ng CJ, Wadleigh DJ, Gangopadhyay A, Hama S, Grijalva VR, Navab M, Fogelman AM, Reddy ST (2001) Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *J Biol Chem* 276:44444–44449.
- Oda MN, Bielicki JK, Ho TT, Berger T, Rubin EM, Forte TM (2002) Paraoxonase 1 overexpression in mice and its effect on high-density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun* 290:921–927.
- Paragh G, Seres I, Harangi M, Balogh Z, Illyes L, Boda J, et al. (2003) The effects of micronized fenofibrate on paraoxonase activity in patients with coronary heart disease. *Diabetes Metab* 29:613–8.
- Paragh G, Törocsik D, Seres I, Harangi M, Illyés L, Balogh Z, Kovács P (2004) Effect of short term treatment with simvastatin and atorvastatin on lipids and paraoxonase activity in patients with hyperlipoproteinaemia. *Curr Med Res Opin* 20(8):1321-7.

- Poulakou MV, Paraskevas KI, Vlachos IS, Karabina SA, Wilson MR, Iliopoulos DC, Tsitsilonis SI, Mikhailidis DP, Perrea DN (2008) Effect of statins on serum apolipoprotein j and paraoxonase-1 levels in patients with ischemic heart disease undergoing coronary angiography. *Angiology* 59(2):137-44.
- Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, La Du BN (1996) The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics* 33:498–507.
- Rea IM, McKeown PP, McMaster D, et al. (2004) Paraoxonase polymorphism PON1 192 and 55 longevity in Italian centenarians and Irish nonagenarians: a pooled analysis. *Exp Gerontol* 39: 629–635.
- Reddy ST, Wadleigh DJ, Grijalva V, Ng C, Hama S, Gangopadhyay A, Shih DM, Lusic AJ, Navab M, Fogelman AM (2001) Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:542–547.
- Richter RJ, Furlong CE (1999) Determination of paraoxonase (PON1) status requires more than genotyping. *Pharmacogenetics* 9:745–53.
- Richter RJ, Jarvik GP, Furlong CE (2010) Paraoxonase 1 status as a risk factor for disease or exposure. *Adv Exp Med Biol* 660:29-35.
- Robertson KS, Hawe E, Miller GJ, et al. (2003) Human paraoxonase gene cluster polymorphisms as predictors of coronary heart disease risk in the prospective Northwick Park Heart Study II. *Biochim Biophys Acta* 1639:203–212.
- Rozenberg O, Rosenblat M, Coleman R, et al. (2003) Paraoxonase (PON1) deficiency is associated with increased macrophage oxidative stress: studies in PON1-knockout mice. *Free Radic Biol Med* 34:774–784.
- Salonen JT, Malin R, Toumaineu T-P, et al. (1999) Polymorphism in high density lipoprotein gene and risk of acute myocardial infarction in men: prospective nested case-control study. *BMJ* 319:487-488.
- Sanghera DK, Saha N, Kamboh MI (1998) The codon 55 polymorphism of the paraoxonase 1 gene is not associated with risk of coronary heart disease in Asian Indians and Chinese. *Atherosclerosis* 136:217-223.
- Sardo MA, Campo S, Bonaiuto M, Bonaiuto A, Saitta C, Trimarchi G, et al. (2005) Antioxidant effect of atorvastatin is independent of PON1 gene T(107)C, Q192R and L55M polymorphisms in hypercholesterolemic patients. *Curr Med Res Opin* 21:777–84.
- Shih DM, Gu L, Xia YR, Navab M, Li WF, Hama S, Castellani LW, Furlong CE, Costa LG, Fogelman AM, Lusic AJ (1998) Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature* 394:284–287.
- Suehiro T, Nakamura T, Inoue M, et al. (2000) A polymorphism upstream from the human paraoxonase (PON1) gene and its association with PON1 expression. *Atherosclerosis* 150:295-298.
- Tanne D, Yaari S, Goldbourt U (1997) High-density lipoprotein cholesterol and risk of ischaemic stroke mortality: a 21 year follow-up of 8586 men from the Israeli Ischaemic Heart Disease Study. *Stroke* 21:83-87.

- Turay J, Grniakova V, Valka J (2000) Changes in paraoxonase and apolipoprotein A-I, B, B-III and E in subjects with combined familiar hyperlipoproteinemia treated with ciprofibrate. *Drugs Exp Clin Res* 26:83–8.
- Turban S, Fuentes F, Ferlic L, Brugada R, Gotto AM, Ballantyme CM, Marian AJ (2001) A prospective study of paraoxonase gene Q\R192 polymorphism and severity, progression and regression of coronary atherosclerosis, plasma lipid levels, clinical events and response to fluvastatin. *Atherosclerosis* 154:633–640.
- Tward A, Xia YR, Wang XP, Shi YS, Park C, Castellani LW, Lusis AJ, Shih DM (2002) Decreased atherosclerotic lesion formation in human serum paraoxonase transgenic mice. *Circulation* 106:484–490.
- Van Himbergen TM, van Tits LJ, Voorbij HA, de Graaf J, Stalenhoef AF, Roest M (2005) The effect of statin therapy on plasma high-density lipoprotein cholesterol levels is modified by paraoxonase-1 in patients with familial hypercholesterolaemia. *J Intern Med* 258:442–9.
- Wheeler JG, Keavney B, Watkins H, et al. (2004) Four paraoxonase gene polymorphisms in 11,000 cases of coronary heart disease and 13,000 controls: meta-analysis of 43 studies. *Lancet* 363:689–695.
- Watson AD, Berliner JA, Hama SY, La Du BN, Faull KF, Fogelman AM, Navab M (1995) Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase: inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J. Clin. Invest.* 96:2882–2891.
- Yesilbursa D, Serdar A, Saltan Y, Serdar Z, Heper Y, Guclu S, Cordan J (2005) The effect of fenofibrate on serum paraoxonase activity and inflammatory markers in patients with combined hyperlipidemia. *Kardiol Pol* 62(6):526–30.

Lista de figuras

Figura 1. Distribuição por tecidos da família de genes humanos PON. Análise northern de fragmentos de tecidos humanos que contêm 2 µg de RNA poli(A)+ por linha. (Origene Technologies, Rockville, MD,USA) Retirado de **Ng et al., 2001.**

Figura 2. Localização da PON1 (A) e da PON3 (B) nas HDL mas não nas LDL por análise western. A PON2 não foi detectada nas HDL e LDL isoladas por centrifugação e nos sobrenadantes de células endoteliais microcirculatórias humanas (HMEC), mas foi encontrada em fracções da membrana plasmática das HMEC. HEK 293, linha de células embrionárias do rim humanas. Retirado de **Ng et al., 2001.**

Figura 3. Ratos transgênicos para PON1 são mais resistentes à aterosclerose. (A) Ratos macho e fêmea C57BL/6J transgênicos para a PON1 humana (Tg) (n=24) e *wild-type* (n=25) foram submetidos a dieta aterogénica durante 15 semanas antes de serem determinadas as áreas das lesões na raiz da aorta. (B) Ratos knock out para ApoE (n=21) e transgênicos para hPON1 e knock out para ApoE (n=18) foram submetidos a dieta normal até aos 6,5 meses de idade antes de serem determinadas as áreas das lesões na raiz da aorta. ApoE, apolipoproteína E. Retirado de **Tward et al., 2002.**

Figura 4. Esquema proposto do mecanismo de acção da PON1 na hidrólise de hidroperóxidos lipídicos. Elaborado por Mackness et al. a partir de várias fontes. Retirado de **Mackness et al., 2004.**

Figura 5. Actividades relativas da PON1 em populações com risco aumentado de desenvolver aterosclerose em comparação com um grupo controlo saudável e um grupo de doentes coronários isquémicos (CHD). Todas as populações são significativamente diferentes do grupo controlo, $p \leq 0,05$. Dados estatísticos adaptados de Mackness et al., 1991; Mackness et al., 1998; Hasselwander et al., 1999; Mackness et al. 2000; Boemi et al., 2001; Mackness et al., 2002. CHD, coronary heart disease. Retirado de **Mackness e Mackness, 2004.**

Figura 6. Os polimorfismos do gene humano PON1 e as suas frequências. A extremidade 5' do gene está à esquerda. (Seattle SNPs, <http://pga.gs.washington.edu/>). Retirado de **Furlong et al., 2008.**

Figura 7. Meta-análise de estudos da associação entre o polimorfismo Q192R da PON1 e a doença coronária isquémica. Segundo os autores, a não publicação de pequenos estudos não conclusivos afecta os resultados da meta-análise. O tamanho dos quadrados relaciona-se com o número de doentes em cada estudo. O eixo horizontal tem uma escala logarítmica dupla. O número total de casos refere-se à soma dos doentes com enfarte do miocárdio e doentes com estenose aórtica, uma vez que nenhum doente manifestou ambos os episódios. Retirado de **Wheeler et al., 2004.**

Figura 8. Comparação de dois protocolos para a determinação do *status* da PON1. Estes protocolos *dual-subtract* permitem inferir o genótipo para o polimorfismo Q192R. Em cima: protocolo que utiliza os substratos organofosforados altamente tóxicos diazoxão e paraoxão. Em baixo: protocolo que utiliza os substratos não organofosforados fenilacetato e CMPA. 183 amostras de plasma incluem 86 homocigóticos 192Q (círculos), 79 heterocigóticos (quadrados) e 18 homocigóticos 192R (triângulos) com os genótipos confirmados por PCR. Retirado de **Richter et al., 2010.**

Figura 9. Odds ratio da ocorrência de um novo evento coronário agudo para os quintis de actividade sérica da PON1, em 1353 homens (o quintil 1 tem a actividade enzimática mais baixa). Os valores de odds ratio foram ajustados para: idade, história familiar, hábitos tabágicos, IMC, história de doença coronária isquémica, diabetes, pressão arterial, colesterol total, triglicéridos e colesterol HDL. Os valores não ajustados estão dispostos no gráfico a tracejado. Retirado de **Mackness et al., 2003.**

Figura 10. Diminuição da actividade da PON1 em células HuH7 pelas estatinas pravastatina, simvastatina e fluvastatina. O efeito é revertido pelo mevalonato. Retirado de **Gouedard et al., 2003.**

Figura 11. Respostas individuais da actividade de arilesterase (A) e da concentração da PON1 (B) ao tratamento com 20 mg de simvastatina por dia (se tratamento prévio), em pacientes não diabéticos com hipercolesterolemia e doença coronária isquémica. *Before*, início do tratamento. *After*, 6,7 semanas depois, em média. Retirado de **Deakin et al., 2003.**