

Polimorfismos do Gene da Paraoxonase Humana e Risco de Doença Coronária [109]

M. ISABEL MENDONÇA, R. PALMA DOS REIS, ANA I. FREITAS, ANA C. SOUSA, ANDREIA PEREIRA, PAULA FARIA, SUSANA GOMES, BRUNO SILVA, NUNO SANTOS, MARCO SERRÃO, ILÍDIO ORNELAS, SÓNIA FREITAS, JOSÉ J. ARAÚJO, ANTÓNIO BREHM, A. ALMADA CARDOSO

Unidade de Investigação do Hospital Central do Funchal, Madeira, Portugal; Serviço de Cardiologia do HCF, Funchal, Madeira, Lisboa; Laboratório de Genética Humana da Universidade da Madeira; Faculdade de Medicina da Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal

Rev Port Cardiol 2008; 27 (12): 1539-1555

RESUMO

Introdução: As doenças complexas como a doença das artérias coronárias (DAC), a hipertensão e a diabetes, são usualmente causadas pela susceptibilidade individual a múltiplos genes, factores ambientais e pela interacção entre eles. As enzimas da paraoxonase humana (PON), particularmente a PON1, têm sido implicadas na patogenia da aterosclerose e da DAC. Dois polimorfismos comuns na região codificante do gene, com substituição Glutamina (Q) /Arginina (R) na posição 192 e Leucina /Metionina na posição 55 influenciam a actividade da PON1. Vários estudos têm investigado a associação entre os polimorfismos da PON1 e a DAC, com resultados contraditórios.

Objectivo: 1- Avaliar a associação dos polimorfismos da PON1 com o risco de DAC. 2-Estudar a interacção destes polimorfismos com outros situados em genes candidatos diferentes, na susceptibilidade para o aparecimento da DAC.

Material e Métodos: Estudámos em 298 doentes coronários e 298 controlos saudáveis, através de um estudo caso/controlo, o risco de DAC associado aos polimorfismos da PON1, 192Q/R e 55L/M. Numa segunda fase avaliámos o risco das interacções polimórficas PON1 192 RR + MTHFR 1298 AA; PON1 192 R/R + ECA DD; PON1 192 R/R + ECA 8 GG. Finalmente construímos um modelo de regressão logística (no qual entraram todas as variáveis genéticas, ambientais e bioquímicas, que tinham mostrado significância estatística na análise univariada), para determinar quais as que se relacionavam de forma significativa e independente com DAC.

Resultados: Verificámos que o genótipo PON1

ABSTRACT

Human Paraoxonase Gene Polymorphisms and Coronary Artery Disease Risk

Background: Complex diseases such as coronary artery disease (CAD), hypertension and diabetes are usually caused by individual susceptibility to multiple genes, environmental factors, and the interaction between them. The paraoxonase 1 (PON1) enzyme has been implicated in the pathogenesis of atherosclerosis and CAD. Two common polymorphisms in the coding region of the PON1 gene, which lead to a glutamine (Q)/arginine (R) substitution at position 192 and a leucine (L)/methionine (M) substitution at position 55, influence PON1 activity. Studies have investigated the association between these polymorphisms and CAD, but with conflicting results.

Aims: 1) To evaluate the association between PON1 polymorphisms and CAD risk; and 2) to study the interaction between PON1 polymorphisms and others in different candidate genes.

Methods: We evaluated the risk of CAD associated with PON1 Q192R and L55M polymorphisms in 298 CAD patients and 298 healthy individuals. We then evaluated the risk associated with the interaction of the PON1 polymorphisms with ACE DD, ACE 8 GG and MTHFR 1298AA. Finally, using a logistic regression model, we evaluated which variables (genetic, biochemical and environmental) were linked significantly and independently with CAD.

Results: We found that the PON1 55MM genotype was more common in the CAD

55 MM tinha uma distribuição superior na população doente mas não atingia significância estatística como factor de risco para DAC. O PON1 199 RR apresentou um risco relativo 80% superior relativamente à população que o não possuía ($p=0,04$). A interacção da PON1 192 RR e da MTHFR 1298 AA, polimorfismos sedeados em genes diferentes, apresentou um risco relativo de DAC de 2,76 ($OR=2,76; IC=1,20-6,47; P=0,009$), bastante superior ao risco de cada polimorfismo isolado, assim como a associação da PON1 RR + ECA DD (com polimorfismos também sedeados em genes diferentes), que apresentou um risco 337% superior relativamente aos que não possuíam esta associação ($OR=4,37; IC=1,47-13,87; P=0,002$). Da mesma forma a associação entre a PON1 RR e ECA 8 GG, revelou um risco ainda mais elevado ($OR=6,23; IC=1,67-27,37; P<0,001$). Após modelo de Regressão Logística as variáveis que ficaram na equação representando factores de risco significativos e independentes para DAC, foram os hábitos tabágicos, doença familiar, diabetes, fibrinogénio, Lp (a) e a associação PON1 192 RR + ECA 8 GG. Esta última associação apresentou, na regressão logística, um $OR=14,113; p=0,018$

Conclusões: O genótipo PON1 192 RR apresentou, se avaliado isoladamente, um risco relativo de DAC 80% superior relativamente à população que não possuía este genótipo. A associação deste polimorfismo com outros polimorfismos sedeados em genes diferentes, codificando para diferentes enzimas e pertencendo a sistemas fisiopatológicos distintos (MTHFR1298 AA, ECA DD e ECA 8 GG), aumentou sempre o risco de eclosão da DAC. Após correcção para os outros factores de risco clássicos e bioquímicos, a associação PON1 192 RR + ECA 8 GG, continuou a ser um factor de risco significativo e independente para CAD.

Palavras-Chave

Paraoxonase I; Polimorfismos; Interação;
Doença coronária.

population, but this did not reach statistical significance as a risk factor for CAD, while PON1 192RR presented an 80% higher relative risk compared to the population without this polymorphism. The interaction between PON1 192RR and MTHFR 1298AA, sited in different genes, increased the risk for CAD, compared with the polymorphisms in isolation ($OR=2.76; 95\% CI=1.20-6.47; p=0.009$), as did the association of PON1 192RR with ACE DD, which presented a 337% higher risk compared to the population without this polymorphic association ($OR=4.37; 95\% CI=1.47-13.87; p=0.002$). Similarly, the association between PON1 192RR and ACE 8 GG was linked to an even higher risk ($OR=6.23; 95\% CI=1.67-27.37; p<0.001$). After logistic regression, smoking, family history, fibrinogen, diabetes, Lp(a) and the association of PON1 192RR + ACE 8 GG remained in the regression model and proved to be significant and independent risk factors for CAD. In the regression model the latter association had $OR=14.113; p=0.018$.

Conclusion: When analyzed separately, the PON1 192RR genotype presented a relative risk for CAD 80% higher than in the population without this genotype. Its association with other genetic polymorphisms sited in different genes, coding for different enzymes and belonging to different physiological systems, always increased the risk for CAD. After correction for other conventional and biochemical risk factors, the PON1 192RR + ACE 8 GG association remained a significant and independent risk factor for CAD.

Key words

Paraoxonase I; Polymorphisms; Interaction;
Coronary disease

INTRODUÇÃO

A doença das artérias coronárias (DAC) é uma doença multifactorial na qual os factores genéticos e ambientais desempenham um papel importante na sua etiologia. A tendência familiar está longe de seguir as leis de Mendel. Os dados acumulados na literatura e resultantes da investigação científica dos últimos anos, sobre a fisiopatologia e genética destas doenças complexas, levam-nos a concluir ser pouco provável a existência de um gene “major”, único responsável pelo contributo genético nesta afecção.^(1,2)

Paraoxonase 1 (PON1) é uma enzima anti-oxidante, uma esterase sintetizada no fígado, que circula no plasma exclusivamente ligada às lipoproteínas das HDL, nomeadamente (AI e J). Evidências recentes sugerem a intervenção das HDL na inibição da oxidação das LDL, sendo este processo o resultado da acção de algumas enzimas que lhe estão associadas (incluindo a PON1), que, ao hidrolisarem os peróxidos lipídicos, podem prevenir as partículas LDL de sofrer modificação oxidativa.⁽³⁾ Na maioria dos estudos a actividade anti-oxidante da paraoxonase sérica é determinada pela sua capacidade de hidrolizar organofosfatos como o paroxon, usado como pesticida.

Vários estudos evidenciam que existe uma determinante genética responsável pela actividade antioxidante da PON 1 que, por sua vez, é responsável pela função ateroprotectora da mesma. Se os níveis de actividade da PON1 estão reduzidos, aumenta o stress oxidativo e o risco de DAC.⁽⁴⁾

Dois polimorfismos comuns na região codificante do gene, com substituição de aminoácidos: a substituição de Glutamina (Q) por Arginina (R) na posição 192 (codão 192) e a de Leucina (L) por Metionina (M) na posição 55. Estas substituições influenciam a actividade da PON1, tendo sido os alelos R e M associados com actividade PON mais baixa e níveis de mRNA inferiores, podendo representar um factor de risco para DAC.⁽⁵⁾ Outros investigadores encontraram actividade enzimática da PON1 mais elevada nos indivíduos PON1 192 RR e PON1 55 LL, em relação aos indivíduos PON1 192 QQ e PON1 55 MM, levando-nos a admitir a existência nos primeiros de uma menor predisposição para doença coronária.⁽⁶⁾ No entanto, o substrato em

INTRODUCTION

Coronary artery disease (CAD) is a multifactorial disease, with genetic and environmental factors playing an important role in its etiology. Familial aspects of the disease do not follow simple Mendelian laws, and the scientific evidence accumulated over recent years on the pathophysiology and genetics of this complex disease indicates that there is unlikely to be a single gene that is responsible for its genetic component^(1,2).

Paraoxonase 1 (PON1) is an antioxidant esterase synthesized in the liver that circulates in the plasma, bound exclusively to high-density lipoproteins (HDL), particularly apolipoprotein A-I and J. Evidence has recently been found that HDL interferes with the oxidation of low-density lipoproteins (LDL) through the action of enzymes associated with HDL, including PON1, which prevent LDL particles from undergoing oxidative modification by hydrolyzing lipid peroxides⁽³⁾. In most studies, paraoxonase's antioxidant activity is measured by its ability to hydrolyze organophosphates such as the pesticide paraoxon.

Studies have shown that the antioxidant properties of PON1, which confer its atheroprotective effect, are determined genetically; reduced PON1 activity increases oxidative stress and CAD risk⁽⁴⁾.

Two common polymorphisms in the coding region of the PON1 gene, which lead to a glutamine (Q)/arginine (R) substitution at position 192 and a leucine (L)/methionine (M) substitution at position 55, influence PON1 activity. The R and M alleles are associated with reduced PON1 activity and lower mRNA levels and hence may be a risk factor for CAD⁽⁵⁾. Increased PON1 activity has been observed in individuals with the PON1 192RR and 55LL genotypes compared to those with PON1 192QQ and 55MM by other investigators, suggesting that the former have a lower risk for CAD⁽⁶⁾. PON1 can act on different substrates (paraoxon, diazoxon, soman, etc.); however, its hydrolytic activity on these substrates can vary. According to Mackness et al., paraoxonase's protective effect against LDL oxidation is inversely proportional to its ability to hydrolyze paraoxon⁽⁷⁾. Various studies have set out to determine whether individuals with the PON1 192RR or 55MM genotypes have greater susceptibility for CAD

que a PON1 actua pode variar, assim como a sua actividade hidrolítica em relação a esse substrato (paraoxon, diazoxon, soman, etc). Segundo Mackness, a capacidade de protecção efectuada pela enzima paraoxonase em relação à oxidação das LDL é oposta à sua actividade hidrolítica em relação ao paraoxon. Assim, a enzima pode ser mais activa ao hidrolizar o paraoxon e menos activa na protecção da oxidação das LDL.⁽⁷⁾ Numerosos estudos têm sido conduzidos no sentido de investigar se os indivíduos com o genótipo PON1 192 RR da paraoxonase ou PON1 55 MM, apresentam uma maior susceptibilidade para DAC, em relação aos que possuem o alelo Q ou L. No entanto os resultados têm sido contraditórios.⁽⁸⁻¹¹⁾

Acresce que os polimorfismos não actuam isolados, e há que entendê-los na realidade clínica, no contexto dos factores de risco convencionais e até da presença de outros polimorfismos que podem agravar ou atenuar os seus efeitos, quer lesivos quer protectores.

Nestas circunstâncias, o objectivo deste estudo foi: 1- Avaliar a associação dos polimorfismos da PON1 com o risco de DAC. 2- Estudar a interacção destes polimorfismos com outros situados em genes candidatos diferentes, na susceptibilidade para o aparecimento da DAC.

MÉTODOS

Estudo caso-controlo, incluindo um total de 596 indivíduos, com idade média $55,5 \pm 9,3$ anos sendo 78,9% do sexo masculino. Os casos ($n=298$) com idade média $55,0 \pm 10,3$ anos, 78,0% do sexo masculino, foram seleccionados de forma consecutiva, entre 2003 e 2005 após alta hospitalar, de entre os doentes com internamento por Enfarte do Miocárdio ou Doença Coronária, confirmada por coronariografia com pelo menos 75% de obstrução de um dos vasos coronários. Os controlos ($n=298$), idade média $55,5 \pm 8,0$ anos, 73,5% do sexo masculino, foram seleccionados aleatoriamente dos cadernos eleitorais de entre os indivíduos sem antecedentes ou história sugestiva de doença coronária. A selecção dos controlos a partir dos cadernos eleitorais pretendeu que estes não fossem significativamente diferentes dos casos, em termos de sexo e idade.

than those with the Q or L allele, with conflicting results⁽⁸⁻¹¹⁾.

Furthermore, these polymorphisms do not act in isolation; they must be considered in the clinical context in which conventional risk factors, as well as other polymorphisms, can strengthen or weaken both their harmful and protective effects.

Against this background, the aims of this study were: 1) to evaluate the association between PON1 polymorphisms and CAD risk; and 2) to study the interaction between PON1 polymorphisms and others in different candidate genes.

METHODS

This was a case-control study with a total of 596 subjects, mean age 55.5 ± 9.3 years, 78.9% male. The cases ($n=298$), mean age 55.0 ± 10.3 years and 78.0% male, were selected consecutively between 2003 and 2005 following hospital discharge from patients admitted with myocardial infarction or coronary artery disease confirmed by coronary angiography that showed at least 75% obstruction of at least one coronary artery. The controls ($n=298$), mean age 55.5 ± 8.0 years and 73.5% male, were selected randomly from the electoral register from individuals with no history or suggestion of CAD. The use of the electoral register to select the controls was intended to ensure that they did not differ significantly from the cases in terms of gender and age.

In the control group, the presence of cardiovascular disease was an exclusion criterion, and so all underwent physical examination and, if necessary, complementary exams. All subjects completed a questionnaire giving demographic and other data including age, place of birth and residence, history of hypertension or diabetes, smoking habits, alcohol intake, and quantity and type of physical exercise. Their weight, height, waist and hip circumference, heart rate and blood pressure (BP) were measured.

Subjects were classified as having arterial hypertension (AH) if they reported the fact, were taking antihypertensive medication or had systolic BP of ≥ 140 mmHg and/or diastolic BP of >90 mmHg, based on the mean of three

No grupo controlo, a presença de doença cardiovascular era critério de exclusão do estudo, pelo que eram todos submetidos a um exame clínico e, se necessário, a exames complementares. Todos os indivíduos completavam um questionário que incluía dados demográficos: idade, local de nascimento e residência, existência prévia de hipertensão arterial (HTA), diabetes mellitus, hábito de fumar, ingestão de álcool, quantidade e tipo de actividade física. Procedia-se também ao registo do peso, altura, perímetro da cintura e anca. A todos era efectuada a determinação da frequência cardíaca (FC) e da pressão arterial (PA).

Os doentes eram classificados como tendo Hipertensão Arterial (HTA) se referiam este antecedente, cumpriam medicação antihipertensora ou apresentavam uma pressão arterial sistólica ≥ 140 mmHg e / ou uma pressão diastólica ≥ 90 mmHg, na média de três medições.⁽¹²⁾ Considerava-se existir diabetes caso fossem utilizados antidiabéticos orais, ou insulina, ou o valor da glicémia basal fosse superior a 7,0 mmol/l ou 126 mg/dl.⁽¹³⁾

O Índice de Massa Corporal (IMC) foi calculado pela fórmula peso/altura², sendo a obesidade definida como um índice de massa corporal superior a 30 Kg/m².⁽¹⁴⁾

O indivíduo foi considerado fumador se fumava ou tinha menos de 5 anos de abstenção tabágica. A dislipidémico foi considerada se o seu nível de colesterol total em jejum era $> 5,2$ mmol/L ou 200 mg/dL, o colesterol de LDL $\geq 3,4$ mmol/L ou 130 mg/dL, HDL ≤ 40 mg/dL com uma relação colesterol total / colesterol HDL $\geq 5,0$ e os triglicéridos $\geq 1,5$ mmol/L ou 150 mg/dL, ou se o indivíduo cumpria medicação anti-dislipidémica.⁽¹⁵⁾

Estudamos em todos (casos e controlos) os polimorfismos da PON1, 192Q/R e 55L/M e, numa segunda fase, avaliámos o risco das interacções polimórficas com outros polimorfismos que na análise univariada se associaram ao aumento de risco de DAC: PON1 192 RR + MTHFR 1298 AA; PON1 192 R/R + ECA DD; PON1 192 R/R + ECA 8 GG.

Casos e controlos colheram sangue para determinações bioquímicas e genéticas e todos os participantes deram o seu consentimento informado, tendo o protocolo do estudo tido a aprovação prévia da Comissão de Ética do Hospital.

measurements⁽¹²⁾. They were classified as having diabetes if they were taking oral antidiabetics or insulin or if their fasting plasma glucose was higher than 7.0 mmol/l or 126 mg/dl⁽¹³⁾.

Body mass index (BMI) was calculated as weight in kilograms divided by height in meters squared, with obesity defined as a BMI of >30 ⁽¹⁴⁾.

Subjects were considered to be smokers if they smoked or had ceased less than five years previously. Dyslipidemia was defined as total fasting cholesterol of >5.2 mmol/l or 200 mg/dl, LDL cholesterol of ≥ 3.4 mmol/l or 130 mg/dl, HDL cholesterol of ≤ 40 mg/dl with a total cholesterol/HDL cholesterol ratio of ≥ 5.0 , and triglycerides of ≥ 1.5 mmol/l or 150 mg/dl, as well as being considered present in individuals taking lipid-lowering medication⁽¹⁵⁾.

In all subjects (cases and controls) we evaluated the PON1 Q192R and L55M polymorphisms and then evaluated the interaction between these polymorphisms and others that univariate analysis showed to be associated with increased risk of CAD: PON1 192RR + MTHFR 1298AA; PON1 192RR + ACE DD; and PON1 192RR + ACE 8 GG.

Blood samples were collected from cases and controls for biochemical and genetic analysis. The study protocol was approved by the hospital's Ethics Committee and all participants gave their informed consent.

Biochemical analysis

To determine serum glucose, total, HDL and LDL cholesterol and triglycerides, blood samples were extracted after 14-16 hours' fasting, placed in dry tubes and centrifuged half an hour later at 3500 g. Serum levels of total, LDL, HDL cholesterol and triglycerides were quantified by an enzymatic technique using a Hitachi 911 auto-analyzer. A direct enzymatic technique was used for HDL and LDL cholesterol. Biochemical risk markers (lipoprotein(a), apolipoprotein B100, and high-sensitivity C-reactive protein [hs-CRP]) were quantified by nephelometry using a Behring BN 100 automatic system. Homocysteine was measured by fluorescence polarized immunoassay using an Abbot IMX automatic device.

To measure fibrinogen, samples were also taken with the patient fasting and placed in a tube containing sodium citrate, and measurements were taken with a Behring BCS automatic analyzer.

Análises Bioquímicas:

Para determinar as concentrações séricas de glucose, colesterol total, triglicérides, colesterol HDL e colesterol LDL, o sangue era extraído após 14 a 16 horas de jejum, em tubo seco e era centrifugado meia hora depois a 3.500 g. Os valores de colesterol total, colesterol LDL, HDL e triglicéridos eram quantificados no soro, com um auto analisador "Hitachi 911" através de uma técnica enzimática. Para o colesterol HDL e LDL usamos uma técnica enzimática directa. Os marcadores bioquímicos de risco: Lp (a), apolipoproteína B100, e proteína C reactiva de alta sensibilidade (PCRs) eram quantificados por um aparelho automático "Behring" BN 100, pela técnica de Nefelometria. A homocisteína era determinada pela técnica de Imunoensaio de Fluorescência Polarizada (FPIA), num aparelho automático IMX (Abbot).

Em relação ao fibrinogénio a colheita era também feita com o doente em jejum, para tubo com citrato de sódio, utilizando-se um analisador automático "Behring BCS".

Análise Genética:

O DNA genómico foi extraído a partir de 80 µl de sangue periférico usando um método *standard* fenol-clorofórmio com precipitação por acção do etanol. Todos os polimorfismos estudados foram genotipados pela reacção de polimerização em cadeia (PCR) num termociclador Hybaid.

PON 55 L/M

A mutação L55M do gene PON foi tipada por amplificação com os primers: forward 5' - GAA GAG TGA TGT ATA GCC CCA G -3' e reverse 5' - TTT AAT CCA GAG CTA ATG AAA GCC -3'. As condições de reacção foram 40 ciclos de 1 minuto a 95°C, 30 segundos a 61°C e 45 segundos a 72°C. Os produtos de PCR foram digeridos com a enzima de restrição NlaIII (New England Biolabs) durante 6 horas e os produtos de restrição visualizados em gel de poliacrilamida T9C5. O alelo L apresentava um fragmento de 170 pb e o alelo mutado M apresentava dois fragmentos, 126 e 44 pb. (*Figura 2*).

PON 192 Q/R

A mutação Q192R do gene PON foi determinada por amplificação com os primers: forward 5' - TAT TGT TGC TGT GGG ACC TGA G - 3' e reverse 5' - CAC GCT AAA CCC AAA

Genetic analysis

Genomic DNA was extracted from 80 µl of peripheral blood using a standard phenol-chloroform method and ethanol precipitation. All the polymorphisms under study were genotyped by the polymerase chain reaction (PCR) in a Hybaid thermocycler.

PON1 L55M

The L55M mutation of the PON1 gene was genotyped using the forward primer 5'-GAA GAG TGA TGT ATA GCC CCA G-3' and reverse primer 5'-TTT AAT CCA GAG CTA ATG AAA GCC-3'. PCR was performed for 40 cycles of one min at 95 °C, 30 sec at 61 °C and 45 sec at 72 °C. The PCR products were digested using the restriction enzyme NlaIII (New England Biolabs) for 6 hours and the restriction products were visualized on T9C5 polyacrylamide gel. The L allele consisted of a 170-bp fragment and the mutated M allele consisted of two fragments, of 126 and 44 bp (*Figure. 2*).

PON1 Q192R

The Q192R mutation of the PON1 gene was identified by amplification with the forward primer 5'-TAT TGT TGC TGT GGG ACC TGA G-3' and reverse primer 5'-CAC GCT AAA CCC AAA TAC ATC CTC-3'. The reaction conditions were 40 cycles of one min at 94 °C, 30 sec at 61 °C and 1 min at 72 °C. The resulting PCR products were digested with *AluI* restriction enzyme (New England Biolabs) for 6 hours and the restriction products visualized on T9C5 polyacrylamide gel. The Q allele consisted of a 99-bp fragment and the mutated R allele consisted of two fragments, of 66 and 33 bp (*Figure. 2*).

ACE I/D

The following primers were used: forward 5'-GCC CTG CAG GTG TCT GCA GCA TGT-3' and reverse 5'-GGA TGG CTCTCC CCG CCT TGT CTC-3'. Around 100 ng of DNA from each individual was subjected to 40 cycles of one min at 94 °C, one min at 62 °C and one min at 72 °C. The amplification products, 597 bp in the case of the I (insertion) allele and 319 bp in the case of the D (deletion) allele, were identified by T9C5 polyacrylamide gel electrophoresis. Due to the preferential amplification of the D allele, all the samples presenting the DD genotype were re-

TAC ATC CTC - 3'. As condições de reacção foram de 40 ciclos de 1 minuto a 94°C, 30 segundos a 61°C e 1 minuto a 72°C. Os produtos de PCR assim obtidos foram digeridos com a enzima de restrição AlwI (New England Biolabs) durante 6 horas e os produtos de restrição visualizados em gel de poliacrilamida T9C5. O alelo Q apresentava um fragmento de 99 pb e o alelo mutado R apresentava dois fragmentos, com 66 e 33 pb. (Figura 2)

ECA I/D

Para o estudo do polimorfismo I/D no intrão 16 do gene da ECA foram utilizados os seguintes primers: forward 5' - GCC CTG CAG GTG TCT GCA GCA TGT -3' e reverse 5' - GGA TGG CTCTCC CCG CCT TGT CTC -3'. Cerca de 100 ng de DNA de cada indivíduo foram submetidas a 40 ciclos de 1 min a 94°C, 1 minuto a 62°C e 1 minuto a 72°C. Os produtos de amplificação, 597 pb no caso do alelo I (inserção) e 319 pb no caso do alelo D (delecção), foram identificados por electroforese em gel de poliacrilamida T9C5. Devido à preferencial amplificação do alelo D, todas as amostras que apresentavam o genótipo DD foram re-amplificadas com primers específicos para a inserção: forward 5' - TGG GAC CAC AGC GCC CGC CAC TAC -3 e reverse 5' - TCG CCA GCC CTC CCA TGC CCA TAA -3'.⁽¹⁶⁾ (Figura 1)

ECA 11860 A/G (ECA 8)

Localizado no exão 17, pode estar associado a níveis elevados de ECA circulante. O polimorfismo A/G do gene do ECA (ECA 8), foi tipado por amplificação por PCR, seguida de restrição com a enzima BstUI (New England Biolabs), sendo que para tal foi necessário introduzir um sítio de restrição artificial por primer mismatch: forward 5'-CTG ACG AAT GTG ATG GCC GC-3' e reverse 5-TTG ATG AGT TCC ACG TAT TTC G-3. As condições de amplificação foram de 40 ciclos de 30 segundos a 95°C, 45 segundos a 62°C e 45 segundos a 72°C. Um fragmento de 126 pb era indicativo da presença do alelo A e dois fragmentos de 21 e 105 pb indicavam a presença do alelo G. (Figura 1)

Metiltetrahidrofolato Reductase (MTHFR)

Quando necessária a sequenciação na detecção dos polimorfismos (MTHFR A1298C), o fragmento de 163 pb amplificado e purificado em

amplified using primers specific for insertion: forward 5'-TGG GAC CAC AGC GCC CGC CAC TAC-3' and reverse 5'-TCG CCA GCC CTC CCA TGC CCA TAA-3'⁽¹⁶⁾ (Figure. 1).

ACE 8 A/G

The A/G polymorphism of the angiotensin-converting enzyme (ACE) gene (ACE 8), located on exon 17, has been linked to high levels of circulating ACE. The polymorphism was genotyped by PCR followed by digestion using the restriction enzyme BstUI (New England Biolabs), and an artificial restriction site was introduced by primer mismatch: forward 5'-CTG ACG AAT GTG ATG GCC GC-3' and reverse 5'-TTG ATG AGT TCC ACG TAT TTC G-3'. The reaction conditions were 40 cycles of 30 sec at 95 °C, 45 sec at 62 °C and 45 sec at 72 °C. A 126-bp fragment was indicative of the A allele and two fragments of 21 and 105 bp indicated the presence of the G allele (Figure. 1).

Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)

When sequencing was required to detect the MTHFR A1298C polymorphism, the 163-bp fragment, following amplification and purification in Sephadex columns (Sigma), was subjected to asymmetrical amplification using a BigDye kit in a Trio Thermoblock thermocycler (Biometra). Sample processing and PCR procedures were as recommended by the manufacturer with slight modifications. Each sequencing reaction used 1-3 µl DNA, depending on the quantity obtained after purification of the PCR product, 1.4 µl BigDye 3.1 (Applied Biosystems), and 1.5 µl (5 pmol) primer, plus sterile distilled water, to make up a final volume of 10 µl. The samples then underwent 5 min of denaturation at 96 °C, 30 cycles at 96 °C for 10 sec, 50 °C for 5 sec and 60 °C for 4 min, ending with a final extension step of 10 min at 60 °C. The sequences were read in an ABI Prism 310 genetic analyzer (Applied Biosystems) (Figure. 1).

Statistical analysis

The Student's t test and one-way ANOVA were used to compare means between groups. Multiple comparisons were performed using Tukey's post hoc test. The chi-square test was used to compare frequencies of genotypes and alleles in cases and controls. Allele frequencies were deduced from

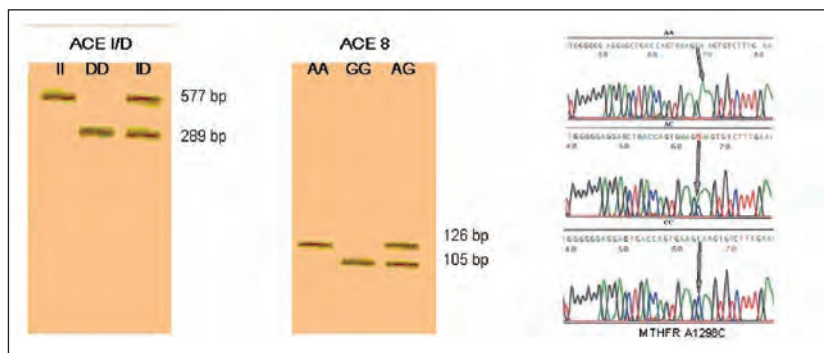


Figura 1. Polimorfismos da Paraoxonase 1 (PON1 55L/M e PON1 192 Q/R)

Figure 1. Polymorphisms of paraoxonase 1 (PON1) (L55M and Q192R)

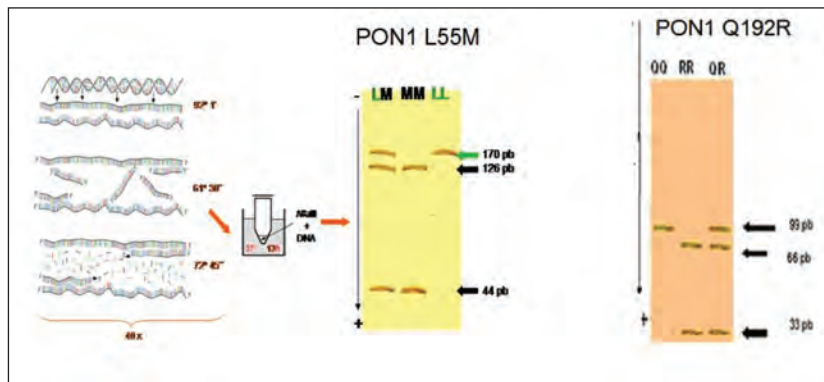


Figura 2. Polimorfismos da Enzima de Conversão da Angiotensina (ECA) I/D, ECA 8 A/G e MTHFR A1298C

Figure 2. Polymorphisms of angiotensin-converting enzyme (ACE) (I/D, ACE 8 A/G) and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) (A1298C)

colunas de Sephadex *Sigma*, foi submetido a amplificação assimétrica das cadeias usando o kit Big Dye, num termociclador TRIO-Thermoblock *Biometra*. Os protocolos utilizados para o processamento das amostras e as condições de PCR para a sequenciação foram os recomendados pelos fornecedores, com ligeiras modificações. Assim sendo, cada reacção de sequenciação continha 1-3 μ l de ADN (dependente da quantidade em ng obtida após a purificação do produto da amplificação), 1,4 μ l de Big Dye 3.1 Applied Biosystems, 1,5 μ l de primer (5 mmol) e sdw para perfazer um volume final de 10 μ l. As amostras eram então submetidas a 5 min de desnaturação a 96°C, 30 ciclos de 96°C por 10 s, 50°C por 5 s e 60°C por 4 min, finalizando com uma extensão final de 10 min a 60°C. As sequências foram lidas num sequenciador ABI Prism 310 Genetic Analyser *Applied Biosystems* (Figura 1).

Análise Estatística

O teste T de Student e *one way* ANOVA foram usados para comparar médias entre grupos. As comparações múltiplas foram efectuadas pelo teste post hoc (Tukey). O teste do χ^2 foi usado para comparações entre frequências genotípicas e

genotype distribution and tested for Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) using Pearson's chi-square test to compare the genotype frequencies observed and those expected from HWE^(17,18). The risk associated with the two PON1 polymorphisms was expressed as odds ratios and 95% confidence intervals.

To determine possible interactions between the two PON1 genotypes and between the PON1 RR192 genotype and the MTHFR 1298 AA, ACE 8 GG and ACE DD genotypes, a 4x2 table was constructed and additive and multiplicative models used to assess synergy and antagonism^(19,20).

Finally, a backward Wald logistic regression model was constructed, adjusted for age, gender, conventional risk factors, biochemical markers and the genotypes under study, in order to evaluate which variables were linked significantly and independently with CAD. The level of significance was taken as $p=0.05$. All continuous variables were expressed as means \pm standard deviation (SD). All calculations were made using SPSS for Windows version 14.0.

alélicas (casos e controlos). As frequências alélicas foram deduzidas da distribuição genotípica e para testar o equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), usámos o teste de Pearson do χ^2 (com as frequências genotípicas observadas e as frequências genotípicas esperadas obtidas pelo EHW).^(17,18) Para avaliar o risco associado aos genótipos dos 2 polimorfismos PON1 foi calculado o Odds Ratio e os seus respectivos intervalos de confiança de 95%.

Para determinar possíveis interações sinérgicas/antagónicas entre os dois genótipos da PON1 e entre o genótipo RR da PON 192 com os genótipos AA da MTHFR 1296, GG da ECA 11860 A/G e DD da ECA I/D, foi elaborada uma tabela 4x2 e efectuadas as medidas de sinergismo ou antagonismo no modelo aditivo e multiplicativo.^(19,20)

Finalmente foi construído um modelo de regressão logística *backward wald* ajustado para a idade, sexo, factores de risco clássicos, marcadores bioquímicos e genótipos estudados para determinar quais as variáveis que estavam associadas de forma independente e significativa com a DAC. Foi aceite um limiar de significância de $p=0,05$. Todas as variáveis contínuas foram expressas em média \pm desvio padrão (SD). Para todos os cálculos foi usado o *software* para *Windows*, SPSS versão 14.0.

RESULTS

As expected, the cases included a higher proportion with a family history of CAD, diabetes and dyslipidemia; they were more likely to be smokers, had a higher alcohol intake, and had higher values for pulse wave velocity (PWV), fibrinogen, high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) and lipoprotein(a) (*Table I*).

With regard to PON1 polymorphisms, the Q192 and L55 alleles were more frequent in our population than 192R and 55M (*Table II*).

The LM genotype on codon 55 was the most common (0.49), followed by LL (0.33); the least common was MM (0.17). The most common genotype for codon 192 was QR, followed by QQ and RR (*Table III*). The Pearson's chi-square test for the L55M polymorphism showed:

$$\chi^2 = \sum \frac{(O-E)^2}{E} = 0,098 \quad \text{the 5\% level of signifi-}$$

cance for one degree of freedom is 3.84 and the value obtained was lower, the null hypothesis (H_0) was not rejected, hence the polymorphism in our population was in Hardy-Weinberg equilibrium.

For the Q192R polymorphism, our population was not in HWE, as the Pearson's chi-square test value was greater than 3.84:

$$\chi^2 = \sum \frac{(O-E)^2}{E} = 10,08$$

Quadro I. Características basais da população estudada

Table I. Baseline characteristics of the study population

Variáveis	Variables	Casos (n=298) Cases (n=298)	Controlos (n=298) Controls (n=298)	Valor de P P
Idade (anos)	Age (years)	55,0 \pm 10,3	55,5 \pm 8,0	NS
Sexo Masculino (%)	Male (%)	235 (78,9%)	219 (73,5%)	NS
DAC Familiar (%)	Family history of CAD (%)	114 (38,3%)	52 (17,4%)	<0,0001
Hábitos tabágicos	Smokers	115 (38,6%)	63 (21,1%)	<0,0001
HTA (%)	AH (%)	114 (38,4%)	101 (33,9%)	NS
Diabetes Mellitus (%)	Diabetes (%)	69 (23,2%)	31 (10,4%)	<0,0001
Dislipidémia (%)	Dyslipidemia (%)	111 (37,2%)	90 (30,3%)	0,073
Álcool (gr/dia)	Alcohol intake (g/day)	55,6 \pm 83,2	38,7 \pm 54,6	0,003
IMC (Kg/m ²)	BMI	27,9 \pm 4,0	27,4 \pm 4,1	NS
Fibrinogénio (mg/dl)	Fibrinogen (mg/dl)	335,5 \pm 96,0	276,9 \pm 65,5	<0,0001
PCR-as (mg/dl)	hs-CRP (mg/dl)	5,36 \pm 7,1	3,1 \pm 4,7	<0,0001
Lipoproteína (a) (mg/dl)	Lipoprotein(a) (mg/dl)	36,9 \pm 36,6	27,8 \pm 31,7	0,001

Legenda: DAC familiar - antecedentes familiares de DAC; HTA - hipertensão arterial; IMC - Índice de massa corporal; VOP - velocidade da onda de pulso; CAD: coronary artery disease; HT: hypertension; BMI: body mass index; PWV: pulse wave velocity; hs-CRP: high-sensitivity C-reactive protein

Quadro II. Frequência alélica

PON L55M	População total
Alelo L	692 (0,58)
Alelo M	500 (0,42)
PON Q192R	População total
Alelo Q	764 (0,64)
Alelo R	428 (0,36)

Quadro III. Frequência genotípica

PON L55M	População total
LL	199 (0,33)
LM	294 (0,49)
MM	103 (0,17)
PON Q192 R	População total
QQ	227(0,38)
QR	310 (0,52)
RR	59 (0,1)

RESULTADOS

Olhando a população em estudo verificamos que os casos, como era de esperar, apresentam uma percentagem mais elevada de história de antecedentes familiares, fumam mais, têm uma maior percentagem de diabetes, de dislipidemia, consomem mais álcool, apresentam valores mais elevadas, de fibrinogénio, PCR-as e de lipoproteína (a) (*Quadro 1*).

Na nossa população e em relação aos polimorfismos da PON 1, a frequência dos alelos Q 192 e L 55 é superior em relação à do R 192 e M 55 (*Quadro 2*).

O genótipo LM da PON1 no codão 55 é o mais comum (0,49), seguido do LL (0,33) e depois do MM (0,17), o menos comum. Em relação ao PON 1 codão 192, na nossa população o genótipo QR é o mais frequente, seguido do QQ e por fim do RR (*Quadro 3*).

O polimorfismo da PON 55 L/M encontrava-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), na nossa população tendo sido efectuado o teste de Pearson do $\chi^2 = \sum \frac{(O-E)^2}{E} = 0,098$

Sendo o nível de significância de 5% para 1 grau de liberdade = 3,84 e como o valor obtido é inferior a 3,84, não rejeitamos a hipótese nula (H0) logo a população está em equilíbrio de

Table II. Allele frequency

PON1 L55M	Total population
L allele	692 (0.58)
M allele	500 (0.42)
PON1 Q192R	Total population
Q allele	764 (0.64)
R allele	428 (0.36)

Table III. Genotype frequency

PON1 L55M	Total population
LL	199 (0.33)
LM	294 (0.49)
MM	103 (0.17)
PON1 Q192 R	Total population
QQ	227 (0.38)
QR	310 (0.52)
RR	59 (0.1)

It can be seen from *Table IV* that the homozygotic PON1 55MM mutation was found in a higher proportion of cases (19.1%) than controls (15.4%), although this did not reach statistical significance. The homozygotic 192RR mutation was more common in the cases (12.4%) than in the controls (7.4%), with statistically significant difference, and the CAD risk was 78% higher for this genotype when compared to individuals without it. (*Table IV*). Of the other homozygous mutations in genes considered risk factors for CAD, the ACE DD genotype has an 85% higher risk of CAD than other genotypes; for the ACE 8 GG genotype the risk is 49% higher, while for the MTHFR 1298AA genotype it is 36% higher (*Table V*).

Table VI, a 4x2 table, shows that associating the two homozygous PON1 mutations that previous studies have demonstrated represent greater CAD risk (55MM and 192RR), the risk increases slightly. The association of two mutations affecting different physiological systems, PON1 192RR and MTHFR 1928, increases the risk 2.76 times; the indices of synergy in the additive model show that risk of CAD is 2.55 times higher, while in the multiplicative model it is 1.53 times higher.

The association of PON1 192RR and ACE 8 GG leads to a considerable increase in risk (6.23

Quadro IV. Possibilidade de risco de DAC dos polimorfismos PON155 MM e 192RR

Table IV. CAD risk of PON1 55MM and 192RR polymorphisms

Polimorfismo <i>Polymorphism</i>	Casos <i>Cases (n=298) (%)</i>	Controlos <i>Controls (n=298) (%)</i>	OR (IC -95%) <i>OR (95% CI)</i>	Valor- p <i>p</i>
PON1 55MM	57 (19.1)	46 (15.4)	1.30 (0.85-1.99)	NS
PON1 192RR	37 (12.4)	22 (7.4)	1.78 (1.02-3.10)	0.040

OR: odds ratio; CI: confidence interval

Quadro V. Possibilidade de risco de DAC dos polimorfismos genéticos ECA DD, ECA 8 GG e MTHFR 1298 AA

Table V. CAD risk of ACE DD, ACE 8GG and MTHFR 1298AA polymorphisms

Polimorfismo	<i>Polymorphism</i>	Casos (n=298) <i>Cases (n=298) (%)</i>	Controlos (n=298) <i>Controls (n=298) (%)</i>	Odds Ratio (IC 95%) <i>OR (95% CI)</i>	Valor- p <i>p</i>
ECA DD	ACE DD	124 (41,6%)	83 (27,9%)	1,85 (1,31-2,60)	<0,0001
ECA 8 GG	ACE 8 GG	110 (36,9%)	84 (28,2%)	1,49 (1,06-2,11)	0,02
MTHFR 1298 AA	MTHFR 1298AA	158 (53,0%)	135 (45,3%)	1,36 (0,99-1,88)	0,05

OR: odds ratio; CI: confidence interval

Hardy Weinberg.

No respeitante ao PON 192 Q/R, a nossa população não está em equilíbrio de Hardy Weinberg, pois o valor do teste de Pearson do χ^2 é igual a 10,08 e portanto superior a 3,84.

$$\chi^2 = \sum \frac{(O-E)^2}{E} = 10,08$$

Ao observar o *quadro 4*, verificamos que, o polimorfismo mutado em homozigotia PON1 55 MM apresenta uma percentagem mais elevada nos casos (19,1%) em relação aos controlos (15,4%), mas não atinge significância estatística. O polimorfismo mutado em homozigotia PON 192 RR tem percentagem mais elevada nos casos (12,4%) em relação aos controlos (7,4%), com significância estatística. A possibilidade de risco de DAC (OR), com intervalos de confiança a 95%, é cerca de 78% mais elevada nos indivíduos portadores do genótipo PON 192 RR em relação aqueles que não têm este genótipo. (*Quadro 4*)

Estudando os outros genótipos, mutados em homozigotia, dos genes considerados factores de risco para DAC, os indivíduos portadores do ECA DD, têm uma possibilidade cerca de 85% maior de sofrer de DAC, relativamente aos que não possuem este genótipo. Os portadores do genótipo GG do ECA 8 apresentam uma

times) compared to the PON1 polymorphism in isolation, with additive synergy of 8.05 times and multiplicative synergy of 3.55 times. In the case of association between PON1 192RR and ACE DD, the CAD risk was 4.37 times higher, with additive (2.65) and multiplicative (1.64) synergy (*Table VI*).

Finally, a backward Wald logistic regression model was constructed that included all the variables that had shown significance in multivariate analysis: family history, smoking, diabetes, dyslipidemia, alcohol intake, fibrinogen, high-sensitivity C-reactive protein, carotid-femoral pulse wave velocity, lipoprotein(a), PON1 Q192R, ACE I/D, ACE 8 A/G, PON1 L55M, MTHFR A1298C, MTHFR 1298AA + PON1 192RR, ACE 8 GG + PON1 192RR, ACE DD + PON1 192RR, and PON1 55MM + PON1 192RR.

From *Table VII* it can be seen that family history of CAD, smoking, diabetes, fibrinogen, Lp(a), ACE DD and the association of ACE 8 GG and PON1 192RR remain in the regression model as independent predictors of CAD risk.

Quadro VI. Interações, sinergismos/antagonismos, entre a associação dos dois genótipos da PON1 sedeados no mesmo gene e outros polimorfismos sedeados em genes diferentes, no risco de DAC

Table VI. Interactions (synergistic or antagonistic) between the association of two PON1 polymorphisms and polymorphisms in different genes affecting CAD risk

PON1 55 MM	PON1 55MM	PON1 192 RR	PON1 192RR	CASOS (298) Cases (n=298)(%)	CONTROLOS (298) Controls (n=298) (%)	OR (IC 95%) OR (95% CI)	VALOR - p p
-	-	-	-	236 (79,2)	249 (83,6)	Referência / Reference	0,936
-	-	+	+	25 (8,4)	27 (9,1)	0,98 (0,53-1,80)	0,437
+	+	-	-	5 (1,7)	3 (1,0)	1,76 (0,36-9,38)	0,056
+	+	+	+	32 (10,7)	19 (6,4)	1,78 (0,94-3,36)	
PON1 192 RR	PON1 192RR	MTHFR 1298 AA	MTHFR 1298AA				
-	-	-	-	126 (42,3)	151 (50,7)	Referência / Reference	0,136
-	-	+	+	135 (45,3)	125 (41,9)	1,29 (0,91-1,84)	0,414
+	+	-	-	14 (4,7)	12 (4,0)	1,40 (0,58-3,36)	0,009
+	+	+	+	23 (7,7)	10 (3,4)	2,76 (1,20-6,47)	
PON1 192 RR	PON1 192RR	ECA 8 GG	ACE 8 GG				
-	-	-	-	167 (56,0)	195 (65,4)	Referência / Reference	0,099
-	-	+	+	94 (31,5)	81 (27,2)	1,36 (0,93-1,98)	0,444
+	+	-	-	21 (7,0)	19 (6,4)	1,29 (0,64-2,60)	0,001
+	+	+	+	16 (5,4)	3 (1,0)	6,23 (1,67-27,37)	
PON1 192 RR	PON1 192RR	ECA DD	ACE DD				
-	-	-	-	154 (51,7)	198 (66,4)	Referência / Reference	0,002
-	-	+	+	107 (35,9)	78 (26,2)	1,76 (1,21-2,57)	0,230
+	+	-	-	20 (6,7)	17 (5,7)	1,51 (0,73-3,15)	0,002
+	+	+	+	17 (5,7)	5 (1,7)	4,37 (1,47-13,87)	

OR: odds ratio; CI: confidence interval

Cálculo dos Índices de Sinergia /Antagonismo:

S=1 não existem interações na exposição a ambos os factores; S<1- diminuição no efeito da exposição a ambos os factores. S> 1 aumento no efeito da exposição a ambos os factores.

Calculation of indices of synergy/antagonism:

S=1: no interaction in exposure to both factors; S<1: reduction in effect of exposure to both factors; S> 1: increase in effect of exposure to both factors

SI (MM + RR) = 0,78 / (-0,02 + 0,76) = 1,05	SIM = 1,78 / 0,98 X 1,76 = 1,03
SI (RR + AA) = 1,76 / (0,29 + 0,40) = 2,55	SIM = 2,76 / 1,29 X 1,40 = 1,53
SI (RR + DD) = 3,37 / (0,76 + 0,51) = 2,65	SIM = 4,37 / 1,76 X 1,51 = 1,64
SI (RR + GG) = 5,23 / (0,36 + 0,29) = 8,05	SIM = 6,23 / 1,36 X 1,29 = 3,55

SI: Índice sinérgico aditivo; SIM: Índice sinérgico multiplicativo
SI: additive synergistic index; SIM: multiplicative synergistic index

possibilidade cerca de 49% superior de vir a sofrer de DAC, relativamente aos que não possuem este genótipo e os que possuem o genótipo da metiltetrahidrofolato Reductase (MTHFR) 1298 AA, têm uma possibilidade de contrair DAC cerca de 36% superior em relação aos que não possuem este genótipo. (Quadro 5)

Se observarmos o quadro 6 (tabela 4X2) verificamos que ao associarmos os dois genótipos mutados em homozigotia que, em estudos anteriores têm representado risco para as populações estudadas e se encontram sediados no

DISCUSSION

Despite its moderate sample size, this case-control study has the merit of enabling assessment of the risk associated with two polymorphisms of the PON1 gene, showing that the PON1 55MM polymorphism does not present significant CAD risk but that the 192RR variant is associated with a risk with borderline significance.

However, while the increased CAD risk from isolated polymorphisms is slight, it becomes

Quadro VII. Variáveis que de forma independente se associaram com DAC

Table VII. Variables independently associated with CAD risk

Variáveis	Variables	B	SE.	Wald	df	Sig.	Exp(B)
Antecedentes de doença familiar	Family history of CAD (%)	1,200	0,228	27,606	1	<0,0001	3,319
Hábito de Fumar	Smoking	0,894	0,219	16,602	1	<0,0001	2,444
Diabetes	Diabetes	1,010	0,275	13,464	1	<0,0001	2,747
Ingestão de álcool (g/dia)	Alcohol intake	0,002	0,001	2,034	1	0,154	1,002
Fibrinogénio	Fibrinogen	0,009	0,001	47,491	1	<0,0001	1,010
Lp(a)	Lipoprotein(a)	0,007	0,003	4,722	1	0,030	1,007
ECA I/D	ACE I/D			5,981	2	0,050	
DD	ACE DD	0,661	0,308	4,616	1	0,032	1,937
ID	ACE ID	0,237	0,293	0,657	1	0,418	1,268
MTHFR 1298 A/C	MTHFR A1298C			5,882	2	0,053	
AA	MTHFR 1298AA	0,339	0,450	0,569	1	0,451	1,404
AC	MTHFR 1298AC	-0,149	0,450	0,110	1	0,740	0,861
ECA 11860 GG (ECA 8) * PON192 RR	ACE 8 GG + PON1 92RR	2,647	1,119	5,596	1	0,018	14,113
Constante	Constant	-4,344	0,675	41,373	1	<0,0001	0,013

Legenda: B – Coeficiente estimado com erro padrão SE.; df – Graus de liberdade; Sig. – Significância estatística; Exp (B)- OR

B: coefficient estimated with standard error; SE: standard error; df: degrees of freedom; Sig.: statistical significance; Exp(B): odds ratio

mesmo gene (PON 55 MM e PON 192 RR), o risco aumenta ligeiramente.

Se associarmos dois genótipos pertencentes a sistemas fisiopatológicos diferentes PON 192 RR+ MTHFR 1298 AA o risco aumenta cerca de 2,76 vezes em relação aos que não possuem essa associação. Os índices de sinergismo mostram no modelo aditivo que o risco de DAC é cerca de 2,55 vezes superior nos possuidores desta associação e em relação ao multiplicativo, o risco de DAC é cerca de 1,53 vezes superior em relação aos que não possuem esta associação.

Nas associações PON 192 RR+ ECA 8 GG, o risco aumenta muito em relação ao polimorfismo isolado, sendo o risco de DAC cerca de 6,23 vezes superior em relação aos que não possuem esta associação. Verificou-se haver sinergismo aditivo, 8,05 vezes maior e sinergismo multiplicativo cerca de 3,55 vezes superior aos que não possuíam esta associação. No caso da associação PON 192 RR + ECA DD o risco de DAC foi cerca de 4,37 vezes superior relativamente aos que não possuíam esta associação que também mostrou sinergismo aditivo (SI=2,65) e multiplicativo (SIM=1,64). (Quadro 6)

Finalmente construímos um modelo de regressão logística *backward wald*, no qual entraram todas as variáveis que tinham apresentado significância na análise multivariada: Antecedentes familiares, hábito de fumar, diabetes, dislipidemia, álcool, fibri-

much more significant when associated with other harmful polymorphisms. The result is a multiplicative risk model similar to that seen with associations of conventional risk factors.

Another important aspect of the model used is that in multivariate analysis, using logistic regression in a fixed-decision automatic model, where various conventional and genetic risk factors for CAD were selected. The fact that conventional risk factors remained with a high degree of significance helps validate the model and confirms the value of the polymorphisms selected by the same method.

We found that alcohol intake was higher in the coronary patients (mean of 55.6±83.2 g/day) than in the controls (38.7±54.6 g/day) (p=0.003). This level of intake, when corrected for all other CAD risk factors by multivariate analysis (logistic regression), did not significantly increase CAD risk (OR=1.002; 95% CI 0.99-1.00; p=0.154), despite remaining in the regression model.

By contrast, after multivariate analysis, smokers presented a risk of CAD 150% higher than non-smokers, and diabetes was also an independent and highly significant risk factor in our population (OR=2.747; 95% CI 1.60-4.71; p<0.0001).

The results of our study on the allele frequency of PON1 polymorphisms are in agreement with other studies in white European populations, which show predominance of the Q allele in PON1 192 and the L allele in PON1 55.

nogénio, PCR (as) PON 192 Q/R,

ECA I/D, ECA 11860 A/G (ECA 8), PON 55 L/M, MTHFR A1298C, MTHFR1298 AA *

PON 192 RR, ECA11860 GG (ECA8) * PON 192 RR, ECA DD * PON 192 RR, PON 55 MM * PON 192 RR.

No *quadro 7* verificamos que ficaram na equação, como variáveis independentes de DAC, os antecedentes de doença familiar, hábito de fumar, diabetes, fibrinogénio, Lp (a), ECA DD, MTHFR AA e a associação ECA 11860 GG (ECA 8) + PON 192 RR.

DISCUSSÃO

Apesar da dimensão moderada da amostra este estudo de caso / controlo apresenta algumas virtualidades, pois permite avaliar o risco ligado às duas variantes polimórficas da PON1, rejeitando que a PON55 MM apresente risco significativo de DAC e mostrando um risco com significância marginal com a variante RR da PON192.

Mas, se em relação aos polimorfismos isolados o risco acrescido de DAC é moderado, de acordo com o presente estudo, este risco ganha uma muito maior importância quando os polimorfismos negativos se associam, surgindo um modelo de risco multiplicativo, semelhante ao observado na associação dos factores de risco tradicionais.

Destacamos também um aspecto relevante no modelo utilizado: no estudo multivariado, recorrendo à regressão logística, por um método matemático automático de decisão fixa, foram seleccionados, como factores conducentes ao aparecimento de DAC, vários factores de risco tradicionais e alguns factores genéticos. A entrada dos factores de risco tradicionais com elevados graus de significância sugere-nos a correcção do modelo, valorizando assim os polimorfismos seleccionados pelo mesmo método.

Verificamos, no presente estudo, que o consumo médio de álcool na nossa população de doentes coronários é mais elevado ($55,6 \pm 83,2$ g/dia) do que na população controlo ($38,7 \pm 54,6$ g/dia) com um valor de $p=0,003$. No presente trabalho, a média do valor do consumo alcoólico ($55,6 \pm 83,2$ g/dia), quando corrigida para todos os outros factores de risco de DAC, através de análise multivariada (regressão logística), não

Similar frequencies have been found in Italy, Spain, Denmark and the United Kingdom, but in Asian populations the M allele is rare and the MM genotype may be non-existent, while the LM genotype is uncommon and LL is the most frequent in Japan, Thailand, China and Malaysia. The genotype distribution in our population is also similar to that of Europeans and white Americans, in whom the PON1 55LM genotype is the most common, followed by LL, with MM the least common. For codon 192 of the PON1 gene, the QR genotype was the most common in our population, followed by QQ and then RR. In Asian populations the RR genotype is most frequent, followed by QR, with QQ the rarest. This ethnic variability in allele frequency may explain variations in the activity of paraoxonase in different populations, resulting in differences in the toxicity of organophosphates such as paraoxon, diazoxon, and sarin, and hence in morbidity and mortality, as well as in susceptibility to CAD^(21, 22).

The PON1 L55M polymorphism was in Hardy-Weinberg equilibrium in our population, unlike PON1 Q192R, which did not present the expected equilibrium, possibly due to a higher proportion of heterozygotes in the control group. This would appear to confirm the increased CAD risk presented by the homozygous mutation PON1 192RR in our study (OR=1.778; 95% CI 1.022-3.095; $p=0.04$).

After multivariate analysis, none of the PON1 L55M or Q192R genotypes in isolation was an independent risk factor for CAD. Our results confirm previous studies in which the homozygous RR genotype of the PON1 192 codon was always a weak risk factor for CAD when analyzed separately⁽²³⁾. It may, however, have a much stronger effect if it interacts with harmful environmental factors or other genetic factors that increase CAD risk.

A synergistic association between two genes belonging to the same physiological system (the renin-angiotensin system) has been found in some studies⁽²⁴⁾. Genetic predisposition to CAD appears to be the result of cumulative effects of various polymorphisms, which increase risk only slightly when present in isolation.

Genetic risk may be amplified or modulated by various gene/gene and gene/environment interactions⁽²⁵⁾. The concept of gene/gene interactions may be extended to include genetic

aumentou o risco de DAC de forma significativa (OR=1,002; IC 0,99-1,00; p=0,154), apesar de ter permanecido na equação.

Pelo contrário, após análise multivariada, os fumadores apresentaram uma possibilidade de risco de DAC cerca de 150% superior, em relação aos não fumadores. Também a diabetes mostrou ser um factor de risco independente e muito significativo na nossa população (OR = 2,747; IC 1,60-4,71; p <0,0001).

Quanto à frequência alélica dos polimorfismos genéticos da PON 1, na nossa população, os nossos resultados estão de acordo com os dados reportados previamente para a população Europeia, que mostram uma predominância do alelo Q da PON1 192 e do L da PON1 55. Frequências semelhantes são encontradas em grande parte da população caucasiana Europeia (Itália, Espanha, Dinamarca, Reino Unido), mas na população asiática o alelo M é muito raro e o genótipo MM pode ser inexistente, seguido do LM também com uma frequência baixa, sendo o LL o mais frequente (Japão, Tailândia, China, Malásia). A frequência genotípica da nossa população tem também uma distribuição semelhante à da população Europeia e dos EUA (população caucasiana) na qual o genótipo LM da PON1 no codão 55 é o mais comum, seguido do LL, sendo o MM o menos comum. Em relação ao PON 1, codão 192, na nossa população, o genótipo QR é o mais frequente, seguido do QQ e por fim do RR. Na população asiática o genótipo RR é o mais frequente seguido do QR e por último do QQ, o menos frequente. Esta variabilidade alélica e genotípica segundo a etnia, pode explicar a variabilidade na actividade enzimática da paraoxonase, nas diferentes populações, com manifestações diferentes de toxicidade, de morbidade e mortalidade em relação aos vários pesticidas organofosforados (paraoxon, diazoxon, sarin etc), assim como diferenças na susceptibilidade à DAC.^(21, 22)

O polimorfismo PON L55M estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg, na nossa população, mas o PON Q192R não estava no equilíbrio esperado. Este desequilíbrio foi possivelmente devido a um excesso de heterozigotos na população controlo, que parece confirmar o aumento do risco, que os homozigóticos PON 192 RR apresentaram no desenvolvimento da DAC no presente estudo caso-controlo (OR=1,778; IC 1,022-3,095;

variants in the human genome that have protective and/or suppressive effects. It is important to identify such variants, since they can influence disease manifestation and pathophysiology⁽²⁶⁾. In the present study, the interaction between the PON1 192RR polymorphism and the ACE 8 GG polymorphism (Table VI) showed a strong synergistic effect, increasing risk for CAD from 36% (GG genotype in isolation) to 523% (association of ACE 8 GG and PON1 192RR). This association remained in the logistic regression multivariate analysis and is therefore an independent risk factor for CAD (OR=14.1; 95% CI 1.6-126.5; p=0.018).

CONCLUSIONS

In this case-control study, when analyzed separately, the PON1 192RR genotype presented a relative risk for CAD 80% higher than in the population without this genotype (p=0.04).

Its association with other genetic polymorphisms sited in different genes, coding for different enzymes and belonging to different physiological systems, always markedly increased the risk for CAD.

After correction for other conventional and biochemical risk factors, the PON1 192RR + ACE 8 GG association remained a significant and independent risk factor for CAD, which proves that genetic factors and their interactions play an important role in its development.

We can thus conclude that multiple polymorphisms and conventional risk factors including environmental factors interact in the genesis of this complex pathology.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Dr. Richard Maul for his help with translations.

p=0,04).

Em relação aos polimorfismos estudados e após análise multivariada, nenhum dos génotipos da PON 1 55L/M ou 192 Q/R, isoladamente, representou ser factor de risco independente para DAC. Os nossos resultados confirmam trabalhos prévios em que o génotipo em homozigotia RR da PON 1 Q/R foi sempre um débil factor de risco para DAC, quando analisado isoladamente.⁽²³⁾ Pode, no entanto, apresentar um efeito muito mais acentuado se interagir com factores ambientais nocivos ou outros genes considerados de risco para DAC.

Uma associação sinérgica, entre dois genes diferentes mas pertencentes ao mesmo sistema fisiopatológico (SRA), foi confirmada em alguns estudos.⁽²⁴⁾ A predisposição genética para DAC, parece ser a resultante final dos efeitos cumulativos de vários polimorfismos genéticos, que conferem um risco moderadamente aumentado se presentes como único factor de risco.

O risco genético poderá ser ampliado e modulado através de várias interacções gene/gene e gene/ ambiente.⁽²⁵⁾ O conceito de interacção gene-gene pode estender-se à identificação de variantes genéticas protectoras/supressoras, no nosso genoma, sendo a sua identificação importante, na medida em que a sua existência pode modular a manifestação da doença e alterar a sua fisiopatologia.⁽²⁶⁾ Também no presente estudo (*Quadro 6*) a interacção entre o génotipo RR da PON 1 Q/R e o génotipo GG da ECA 8 A/G, mostrou um elevado efeito sinérgico ao aumentar a possibilidade de risco de DAC de 36% (génotipo GG isolado) para 523% (associação ECA GG + PON 1 RR). Esta associação ficou na equação da regressão logística multivariada mostrando ser um factor de risco independente para DAC (OR=14,1; IC 1,6-126,5; p=0,018).

CONCLUSÕES

O génotipo PON1 192 RR apresentou, se avaliado isoladamente, neste estudo caso-controlo, um risco de DAC cerca de 80% superior relativamente à população que não possuía este génotipo (p=0,04).

A associação com outros polimorfismos sedeados em genes diferentes, codificando para

diferentes enzimas e pertencendo a sistemas fisiopatológicos distintos, aumentou sempre de forma marcada o risco de eclosão da DAC.

Após correcção para os outros factores de risco clássicos e bioquímicos, a associação PON1 192 RR + ECA 8 GG, continuou a ser um factor de risco significativo e independente para DAC, o que comprova que os factores genéticos são importantes assim como a sua interacção, para o aparecimento da Doença Coronária.

Podemos portanto concluir que múltiplas pequenas deficiências genéticas (polimorfismos) e factores ambientais (factores de risco convencionais) interagem para o aparecimento desta complexa patologia.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Sr. Dr. Richard Maul todo o apoio e colaboração prestado nas traduções.

Pedidos de separatas para:

Address for reprints:

MARIA ISABEL MENDONÇA

Unidade de Investigação do Hospital Central do Funchal

Hospital Central do Funchal

9000 Funchal, PORTUGAL

Tel: +351.291.744312

Fax: +351.291.744312

e-mail: dep.card@srs.pt

REFERÊNCIAS / REFERENCES

1. Cheng S, Grow MA, Pallaud C, Klitz W, Erlich HA, Visvikis S, Chen JJ, Pullinger CR, Malloy MJ, Siest G, Kane JP. A Multilocus Genotyping Assay for Candidate Markers of Cardiovascular Disease Risk. *Genome Research*.1999; 9:936-949.
2. Crisan D and Carr J. Angiotensin I-Converting Enzyme Genotype and Disease Associations. *J Mol Diagn* 2000; 2(3): 105-112
3. Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. Paraoxonase and Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:473-80
4. Bhattacharyya T, Nicholls S J, Topol E J, Zhang R, Yang Xia, Schmitt BA, Xiaoming David F, Shao M, Brennan Danielle M, Ellis SG, Brennan ML, Allayee H, Lusis AJ, Hazen SL. Relationship of Paraoxonase 1 (PON1) Gene Polymorphisms and Functional Activity with Systemic Oxidative Stress and Cardiovascular Risk. *JAMA* 2008; 299(11):1265-1276.
5. Mackness MI, Mackness B, Durrington PN, Fogelman AM, Berliner JXLA, Navab M, Shih D & Fonarow GC. Paraoxonase and coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol* 1998; 9:319-324.
6. Lawlor DA, Day I NM, Gaunt TR, Hinks LJ, Briggs PJ, Kiessling, Timpson MN, Smith GD, Ebrahim S. The association of the PON1 Q192R polymorphism with coronary heart disease: findings from the British Women's Heart and Health cohort study. *BMC Genetics*. 2004; 5:17.
7. Mackness MI, Arrol S, Mackness B, Durrington PN. The alloenzymes of paraoxonase determine the effectiveness of high density lipoprotein in protecting low density lipoprotein against lipid peroxidation. *Lancet*.1997; 349:851-852.
8. Agachan Bedia , Isbir C. Selim , Ergen H. Arzu, Yilmaz Hulya, Yaylim Ilhan, Zeybek Umit, Ozturk Oguz, Isbi Turgay No association between paraoxonase 192 and 55 polymorphism and increasing risk of coronary artery disease in Turkish patients. *Adv Mol Med* 2005; 1(2): 92-96.
9. Sanghera DK, Saha N, Kamboh MI. The codon 55 polymorphism of the paraoxonase 1 gene is not associated with risk of coronary heart disease in Asian Indian and Chinese. *Atherosclerosis* 1998; 136:217-23.
10. Esparragón FR, Rodríguez-Pérez JC., Trujillo Y H, Reyes AM, Medina A, Caballero A, and Ferrario C M. Allelic Variants of the Human Scavenger Receptor Class B Type 1 and Paraoxonase 1 on Coronary Heart Disease: Genotype-Phenotype Correlations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:854-860
11. Aubó C, Sent M, Marrugat J, Tomás M, Vila J, Sala J, Masiá R. Risk of myocardial infarction associated with Gln/Arg 192 polymorphism in the human paraoxonase gene and diabetes mellitus. *Eur Heart J*. 2000; 21:33-38
12. Chobanian AV et al. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure (JNC 7). *JAMA*, May 21, 2003; 289:2560-2572.
13. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1997, 1183-1197.
14. De Backer G, Ambrosioni E, Borch-Johnsen K, Brotons C, Cifkova R, Dallongeville J, Ebrahim S, Faergeman O, Graham I, Mancia G, Cats VM, Orth-Gomer K, Perk J, Pyorala K, Rodicio JL, Sans S, Sansoy V, Sechtem U, Silber S, Thomsen T, Wood D. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. Third Joint Task Force of European and other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of eight societies and by invited experts). *Atherosclerosis* 2004; 173:381-391.
15. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001, 285:2486-2497
16. Hernández D, Lacalzada J, Salido E, Linares J, Barragán A, Lorenzo V. Regression of left ventricular hypertrophy by lisinopril after renal transplantation: Role of ACE gene polymorphism. *Kidney Int*. 2000;58:889-897
17. Guo S.W., Thompson, E.A. (1992). Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48: 361-372.
18. Wigginton J.E., Cutler, D.J., Agbecasis, G.R. (2005). A note on exact tests of Hardy-Weinberg equilibrium. *American Journal of Human Genetics*; 76: 887-893.
19. Rothman KJ (1974) Synergy and antagonism in cause-effect relationships. *Am J Epidemiol*; 99:385-388.
20. Khoury MJ, Flanders WD (1996) Nontraditional epidemiologic approaches in the analysis of gene-environment interaction: case-control studies with no controls! *Am J Epidemiol*.1996; 144:207-213.
21. MOHAMED ALI Safiyy and Sin Eng CHIA. Interethnic Variability of Plasma Paraoxonase (PON1) Activity towards Organophosphates and PON1 Polymorphisms among Asian Populations-A Short Review. *Industrial Health*. 2008; 46: 309-317
22. Marija Grdić, Karmela Barisic, Lada Rumora, Ilza Salamunic, Milena Tadijanovic, Tihana Zanc Grubisic, Renata Piikalová, Zlata Flegar-Mestrić and Dubravka Juretic. Genetic Frequencies of Paraoxonase 1 Gene Polymorphisms in Croatian Population. *CROATICA CHEMICA ACTA*.2008;81 (1):105-111
23. Jeremy G Wheeler, Bernard D Keavney, Hugh Watkins, Rory Collins, and John Danesh. Four paraoxonase gene polymorphisms in 11212 cases of coronary heart disease and 12786 controls: meta-analysis of 43 studies. *Lancet*. 2004; 363:689-95
24. Tiret L, Bonnardeaux A, Poirier O, Ricard S, Marques-Vidal P, Evans A, Arveiler D, Luc G, Kee F, Ducimetiere P, Soubrier F, Cambien F. Synergistic effects of angiotensin-converting enzyme and angiotensin-II type 1 receptor gene polymorphisms on risk of myocardial infarction. *Lancet*. 1994;344:910-913
25. Nishio E, Watanabe Y. Cigarette smoke extract inhibits plasma paraoxonase activity by modification of the enzyme's free thiols. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;236:289-293
26. Peng DQ, Zhao SP, Nie S, Li J. Gene-gene interaction of PPAR gamma and ApoE affects coronary heart disease risk. *Int J Cardiol*. 2003 Dec;92(2-3):257-63.