

# Interação entre o polimorfismo 192 da paraoxonase e os baixos níveis de colesterol-HDL no risco de doença coronária [41]

MARIA ISABEL MENDONÇA, ROBERTO PALMA DOS REIS, ANA ISABEL FREITAS, ANDREIA PEREIRA, ANA CÉLIA SOUSA; SÓNIA FREITAS, ILÍDIO ORNELAS, CAROLINA FREITAS; ANTÓNIO BREHM, JOSÉ JORGE ARAÚJO

Unidade de Investigação e Serviço de Cardiologia do Hospital Dr. Nélio Mendonça (Hospital Central do Funchal), Funchal, Madeira, Portugal  
Laboratório de Genética Humana da Universidade da Madeira, Madeira, Portugal  
Faculdade de Medicina da Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal

**Rev Port Cardiol 2010; 29 (04): 571-580**

## RESUMO

A doença coronária (DC) é a principal causa de mortalidade nos países desenvolvidos. O aumento da peroxidação lipídica está associado com a progressão acelerada da arteriosclerose. A Paraoxonase (PON1) é uma enzima antioxidante, que protege contra a peroxidação lipídica e a DC. A actividade da PON1 está sob controlo genético e a sua base molecular consiste num polimorfismo do gene da PON1 que apresenta duas isoformas comuns: a forma nativa, Q (192 Gln) com elevada capacidade de protecção das LDL da peroxidação lipídica *in vitro*, e a isoforma mutada R (192 Arg) com baixa capacidade de protecção.

**Objectivo:** O objectivo deste trabalho foi investigar a interacção entre o alelo R do gene da PON 1 e os níveis plasmáticos baixos de colesterol HDL, no risco do aparecimento da DC.

**Métodos:** Participaram no estudo 818 indivíduos, 298 doentes coronários com idade média  $55.0 \pm 10.3$  anos, 78.9% do sexo masculino, e 520 controlos, com uma idade média de  $53.3 \pm 11.7$  anos, 72, 5% do sexo masculino, tendo casos e controlos sido emparelhados por idade e sexo. Foi considerado um valor <de 40 mg/dl (0,90 mmol/L), nos homens e <de 50 mg/dl (1,11 mmol/L), nas mulheres como um nível baixo de Colesterol HDL. As comparações genotípicas, entre casos e controlos, foram

## ABSTRACT

### Interaction of paraoxonase-192 polymorphism with low HDL-cholesterol in coronary artery disease risk

**Introduction:** Coronary artery disease (CAD) is the main cause of mortality in developed countries. Increased lipid peroxidation is associated with accelerated progression of atherosclerosis. Paraoxonase (PON1) is an antioxidant enzyme bound to high-density lipoprotein (HDL), which protects against lipid peroxidation and coronary artery disease. PON1 activity is under genetic control and its molecular basis is a polymorphism in the PON1 gene that shows two common isoforms: the wild Q form (192 Gln) with high ability to protect LDL from lipid peroxidation *in vitro*, and the mutated R (Arg) form with lower ability.

**Aim:** To explore the interaction of the R allele of the paraoxonase gene and low HDL-cholesterol concentrations in CAD risk.  
**Methods:** The study population consisted of 818 individuals, 298 coronary patients, aged  $55.0 \pm 10.3$  years, 78.9% male, and 520 age and gender matched healthy controls, aged  $53.3 \pm 11.7$  years, 72.5% male. Low HDL-cholesterol was defined as <0.90 mmol/l in men and <1.11 mmol/l in women. Comparisons of genotypes between cases and controls were performed by a

efectuadas pelo teste do Chi-quadrado. A significância estatística foi aceite para valores de  $p < 0,05$ . Para determinar o risco relativo de DC, em relação ao genótipo RR e aos níveis baixos de colesterol HDL, foi usada uma análise univariada e foram utilizadas as tabelas epidemiológicas 4x2 e medidas de sinergismo (modelo aditivo - SI e multiplicativo - SIM) para determinar a interação entre o genótipo RR e os níveis baixos de colesterol HDL. Foi finalmente calculado o excesso de risco relativo (RERI) e proporção atribuída à interação (AP).

**Resultados:** A PON1 192 RR está associada à DC [OR=1,61;  $p=0,043$ ] para toda a população. A associação de níveis baixos de HDL com o genótipo 192 RR mostrou um aumento do risco de DC (OR=17,38;  $p < 0,0001$ ) comparada aos níveis normais de HDL associados ao mesmo genótipo (OR=1,39;  $p=0,348$ ) e aos níveis baixos de HDL sem o genótipo RR (OR=7,79;  $p < 0,0001$ ). Índices de Sinergismo: SI= 2,3; SIM = 1,6; RERI=9,2; AP=0,53.

**Conclusão:** Estes dados sugerem a existência de um efeito sinérgico entre o genótipo 192 RR da PON1 e os valores baixos de colesterol HDL, na emergência de DC, pois este genótipo aumentou o risco de DC, em especial, na população com níveis plasmáticos baixos de colesterol HDL. A proporção de DC que pode ser atribuída a esta interação (AP) foi de 0,53 significando que 53% da DC que surgiu nestes indivíduos, foi explicada por esta interação.

#### Palavras-Chave

Polimorfismos; Paraoxonase 1; Factores de Risco; Colesterol HDL; Doença Coronária

chi-square test. Statistical significance was accepted at  $p < 0.05$ . Odds ratios and 95% confidence intervals for the RR genotypes and HDL-deficient subjects were computed using univariate analysis (2x2 tables). To determine the interaction between the RR paraoxonase genotype and HDL-deficient subjects, we used 4x2 epidemiologic tables and synergy measures: the additive model (Rothman's synergy index, SI) and multiplicative model (Khoury's synergy index, SIM). The relative excess risk due to interaction (RERI) and the attributable proportion (AP) due to interaction (Rothman) were calculated.

**Results:** The PON1 RR192 polymorphism was associated with coronary heart disease (OR=1.61;  $p=0.043$ ) in the whole population. HDL-deficient subjects with the RR192 genotype showed increased risk for CAD (OR=17.38;  $p < 0.0001$ ) compared to those with normal HDL and RR192 (OR=1.39;  $p=0.348$ ) and HDL-deficient subjects not carrying the RR genotype (OR=7.79;  $p < 0.0001$ ). Synergy measures were SI=2.3, SIM=1.6; RERI=9.2.

**Conclusion:** These data suggest the existence of a synergistic effect of the PON1 RR192 genotype (with lower antioxidant ability) and HDL-deficient subjects in risk for development of CAD. The AP due to this interaction was 0.53, meaning that 53% of CAD was explained by this interaction.

#### Key words

Polymorphisms; Paraoxonase-1; Risk factors; HDL-cholesterol; Coronary disease.

## INTRODUÇÃO

A paraoxonase 1 (PON 1) sérica I é uma esterase cálcio dependente, associada às lipoproteínas de baixa densidade (HDL) que ao diminuir a acumulação de produtos da peroxidação lipídica lhes confere propriedades antioxidantes<sup>(1)</sup>. Se os níveis de actividade da PON1 estão reduzidos aumenta o *stress* oxidativo e o risco de doença coronária (DC)<sup>(2)</sup>.

## INTRODUCTION

Serum paraoxonase 1 (PON1) is a calcium-dependent esterase bound to low-density lipoprotein (HDL), to which it confers antioxidant properties by decreasing the accumulation of lipid peroxidation products<sup>(1)</sup>. Lower PON1 activity increases oxidative stress and risk for coronary artery disease (CAD)<sup>(2)</sup>.

Various studies have shown that the antioxidant properties of PON1, which are responsi-

Vários estudos evidenciam que a actividade antioxidante da PON 1 (responsável pela função ateroprotectora), está sob regulação genética e ambiental, variando em indivíduos e populações.

Nos humanos, a actividade enzimática da PON 1, em relação ao substrato paraoxon, é modulada por um certo número de polimorfismos situados no locus da PON 1. Um deles é o polimorfismo 192 Q/R, com substituição de Glutamina (Q) por Arginina (R) na posição 192 do gene. A isoforma PON 1 Q apresenta baixa actividade em relação à hidrólise do paraoxon e a isoforma PON R apresenta elevada actividade<sup>(3)</sup>. Segundo trabalhos de Durrington e Mackness, a capacidade de protecção efectuada pela enzima em relação à oxidação das LDL é oposta à sua actividade hidrolítica em relação ao paraoxon. Assim, a enzima pode ser mais activa ao hidrolisar o paraoxon e menos activa na protecção da oxidação das LDL<sup>(4)</sup>.

Alguns estudos efectuados nos EUA e Europa demonstraram que o alelo R estava associado com DC<sup>(5,6)</sup> mas outros não demonstraram essa associação<sup>(7)</sup>.

Esta variabilidade de resultados sugere que a interacção gene ambiente e gene-gene podem modular o relacionamento entre o polimorfismo da PON1 I 192 e a DC.

A concentração baixa de HDL aumenta a susceptibilidade para a aterosclerose e DC e a PON1 I está associada às propriedades antioxidantes desta lipoproteína, logo a interacção entre os níveis baixos de HDL e as isoformas da PON1 I com baixa (192 Q) ou elevada (192 R) actividade enzimática, é um alvo lógico para ser investigado.

Nestas circunstâncias, o objectivo deste trabalho foi investigar a interacção entre os alelos R e Q do polimorfismo 191 Q/R da PON 1 e os níveis plasmáticos baixos de colesterol HDL, no risco do aparecimento da DC.

## MÉTODOS

Participantes: 818 indivíduos participaram neste estudo sendo 298 doentes coronários e 520 controlos aparentemente normais, tendo-se procurado que casos e controlos não fossem significativamente diferentes em termos

ble for its atheroprotective effect, are under genetic and environmental regulation and vary among individuals and populations.

In humans, the enzymatic activity of PON1, as determined by its action on paraoxon as a substrate, is modulated by polymorphisms in the PON1 gene locus, including the Q192R polymorphism, in which glutamine (Q) is replaced by arginine (R) at position 192. The Q isoform has low activity in hydrolyzing paraoxon, while the R isoform presents high activity<sup>(3)</sup>. According to Durrington et al., paraoxonase's protective effect against LDL oxidation is inversely proportional to its ability to hydrolyze paraoxon<sup>(4)</sup>.

Some studies in the US and Europe have shown that the R allele is associated with CAD<sup>(5,6)</sup>, while others failed to demonstrate such an association<sup>(7)</sup>. These conflicting results suggest that gene-environment and gene-gene interactions may modulate the relationship between the PON1 192 polymorphism and CAD.

Low HDL concentrations increase susceptibility to atherosclerosis and CAD, and the antioxidant properties of this lipoprotein are influenced by PON1. The interaction between low HDL and PON1 isoforms with low (Q192) or high (R192) activity is thus a logical target for investigation.

In this context, the aim of this study was to explore the interaction between the R and Q alleles of the PON1 Q192R polymorphism and low HDL-cholesterol concentrations in CAD risk.

## METHODS

The study population consisted of 818 individuals, of whom 298 were coronary patients and 520 were apparently healthy controls, who were not significantly different in terms of age and gender. The cases, mean age 55.0±10.3 years, 78.9% male, were selected consecutively between 2003 and 2005 following discharge after hospitalization for myocardial infarction or CAD confirmed by coronary angiography that showed at least 75%

de idade e sexo. Os casos (n=298) com idade média de 55,0±10.3 anos, 78,9% 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 DC, confirmada por coronariografia com pelo menos 75% de obstrução de um dos vasos coronários. Os controlos (n=520), aparentemente normais com uma média de idade de 53,3 ± 11,7, sendo 72,5% do sexo masculino, foram seleccionados aleatoriamente dos cadernos eleitorais de entre os indivíduos sem antecedentes ou história sugestiva de doença coronária.

Os indivíduos eram classificados como tendo Hipertensão Arterial (HTA) se referiam este antecedente, cumpriam medicação anti-hipertensora ou apresentavam uma pressão arterial sistólica  $\geq 140$  mm Hg e/ou uma pressão diastólica  $\geq 90$  mm Hg, na média de três medições<sup>(8)</sup>. Considerava-se existir diabetes caso fossem utilizados antidiabéticos orais, ou insulina, ou o valor da glicémia basal fosse superior a 7,8 mmol/l ou 126 mg/dl<sup>(9)</sup>.

O Índice de Massa Corporal (IMC) foi calculado pela fórmula peso/altura<sup>2</sup>, sendo a obesidade definida como um índice de massa corporal superior a 30 kg/m<sup>2</sup><sup>(10)</sup>.

O indivíduo foi considerado fumador se fumava ou tinha menos de cinco anos de abstenção tabágica. A dislipidemia foi considerada se o nível de colesterol total em jejum era  $> 5,2$  mmol/L ou 200 mg/dL, o colesterol 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  $> 1,5$  mmol/L ou 150 mg/dL ou se o indivíduo cumpria medicação anti-dislipidémica<sup>(11)</sup>.

Foi considerado um valor  $< 40$  mg/dl (0,90 mmol/L), nos homens e  $< 50$  mg/dl (1,11 mmol/L), nas mulheres como um nível baixo de Colesterol.

#### **Análise Estatística:**

As frequências alélicas foram deduzidas da distribuição genotípica

As comparações genotípicas, entre casos e controlos, foram efectuadas pelo teste do Chi-quadrado.

obstruction of at least one coronary artery. The controls, mean age 53.3±11.7 years and 72.5% male, were selected randomly from the electoral register from individuals with no history or suggestion of CAD.

Subjects were classified as having hypertension if they reported the fact, were taking antihypertensive medication or had systolic BP of  $\geq 140$  mmHg and/or diastolic BP of  $\geq 90$  mmHg, based on the mean of three measurements (8). They were classified as having diabetes if they were taking oral antidiabetics or insulin or if their fasting glucose was higher than 7.0 mmol/l or 126 mg/dl<sup>(9)</sup>.

Body mass index (BMI) was calculated as weight in kilograms divided by height in meters squared, with obesity defined as a BMI of  $> 30$ <sup>(10)</sup>.

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  $\geq 3.4$  mmol/l or 130 mg/dl, HDL-cholesterol of  $\leq 40$  mg/dl with a total cholesterol/HDL-cholesterol ratio of  $\geq 5.0$ , and triglycerides of  $\geq 1.5$  mmol/l or 150 mg/dl, as well as being considered present in individuals taking lipid-lowering medication<sup>(11)</sup>.

Low HDL was defined as  $< 40$  mg/dl (0.90 mmol/l) in men and  $< 50$  mg/dl (1.11 mmol/l) in women.

#### **Biochemical and genetic 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. A direct enzymatic technique was used for HDL and LDL cholesterol. Lipoprotein(a), apolipoprotein B100, and high-sensitivity C-reactive protein were quantified by nephelometry. Homocysteine was measured by fluorescence polarized immunoassay.

#### **PON1 Q192R**

Genomic DNA was extracted from 80 ml of peripheral blood using a standard phenol-

Para determinar o risco relativo de DC, em relação ao genótipo RR e aos níveis baixos de colesterol HDL foram calculados o *Odds Ratio* e os seus respectivos intervalos de confiança de 95%. Para determinar possíveis interações sinérgicas/antagónicas entre o genótipo PON 192 RR e os níveis baixos de HDL foram usadas tabelas epidemiológicas 4x2 e medidas de sinergismo no modelo aditivo (SI, Rothman's synergy Index, 1974)<sup>(12)</sup> e multiplicativo (SIM, Khoury's synergy index, 1996)<sup>(13)</sup>. Foi finalmente calculado o excesso de risco relativo (RERI) e proporção atribuída à interacção (AP).

A significância estatística foi aceite para valores de  $p < 0,05$ .

### Análises bioquímicas e genéticas

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 a centrifugado meia hora depois a 3.500 g. Para o colesterol HDL e LDL foi usada uma técnica enzimática directa. A Lp (a), Apolipoproteína B100, e Proteína C reactiva de alta sensibilidade foram quantificadas pela técnica de Nefelometria. A homocisteína foi determinada pela técnica de Imunoensaio de Fluorescência Polarizada (FPIA).

### PON 192 Q/R

O DNA gnómico foi extraído a partir de 80  $\mu$ l de sangue periférico usando um método *standard* fenol-clorofórmio com precipitação por acção do etanol. 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 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<sup>(14)</sup>.

chloroform method and ethanol precipitation. 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 *AlwI* 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<sup>(14)</sup>.

### Statistical analysis

Allele frequencies were deduced from genotype distribution. The chi-square test was used to compare frequencies of genotypes and alleles in cases and controls.

The relative risk of CAD associated with the RR genotype and low HDL levels was expressed as odds ratios and 95% confidence intervals. To determine possible interactions between the PON1 RR192 genotype and low HDL, 4x2 epidemiologic tables were constructed and additive (Rothman's synergy index)<sup>(12)</sup> and multiplicative (Khoury's synergy index)<sup>(13)</sup> models used to assess synergy and antagonism. Finally, the relative excess risk due to interaction (RERI) and the attributable proportion (AP) due to interaction were calculated.

Statistical significance was accepted at  $p < 0.05$ .

### RESULTS

The coronary patients presented more conventional risk factors, and mean HDL-cholesterol was significantly lower (*Table I*).

Analysis of genotype frequency in cases and controls showed that only the RR genotype had a higher frequency, in the cases (12.4% vs. 8.1%), and was significantly associated with CAD (OR=1.61 [0.99-2.64];  $p=0.043$ ) (*Table II*).

## RESULTADOS / RESULTS

Os doentes coronários apresentavam maior número de factores de risco convencionais e a média do Colesterol HDL era significativamente mais baixa, (*Quadro I*).

Na análise da frequência genotípica entre casos e controlos, verificamos que apenas o genótipo PON RR apresenta, nos casos, uma frequência mais elevada (12,4% versus 8,1%, associando-se à DC de forma significativa [OR=1,61 (0,99-2,64); P=0,043], (*Quadro II*).

Na nossa população, o alelo R da PON Q192R, isoladamente, não apresentou risco significativo de DC, (*Quadro III*).

A interacção entre os níveis baixos de HDL e o genótipo 192 RR elevou o risco de DC (OR=17,38; p <0,0001) quando comparada

In our population, the R allele of PON1 Q192R in isolation did not present a significant CAD risk.

The interaction between low HDL and the RR192 genotype raised CAD risk (OR=17.38; p<0.0001) compared to that between this genotype and normal HDL (OR=1.39; p=0.348) or low HDL without the RR genotype (OR=7.79; p<0.0001) (*Table IV*).

The proportion of CAD attributable to the interaction is 0.53, meaning that in patients with low HDL and PON1 RR192, 53% of CAD can be explained by this interaction.

## DISCUSSION

In the present study, the risk for coronary

Quadro I - Características basais da população em estudo

| Variáveis                        | Casos (n=298) | Controlos (n=520) | Valor de p |
|----------------------------------|---------------|-------------------|------------|
| Idade (anos)                     | 55,0 ± 10,3   | 53,3 ± 11,7       | Ns         |
| Sexo Masculino (%)               | 235 (78,9%)   | 377 (72,5%)       | Ns         |
| História Familiar (%)            | 114 (38,3%)   | 76 (14,6%)        | <0,0001    |
| Hábito de Fumar (%)              | 115 (38,6%)   | 118 (22,7%)       | <0,0001    |
| Hipertensão (%)                  | 114 (38,3%)   | 119 (22,9%)       | <0,0001    |
| Diabetes Mellitus (%)            | 69 (23,2%)    | 34 (6,5%)         | <0,0001    |
| Álcool (gr/dia)                  | 55,6 ± 83,2   | 24,6 ± 45,9       | <0,0001    |
| PAS (mmHg)                       | 134,6 ± 20,5  | 127,2 ± 17,4      | <0,0001    |
| PAD (mmHg)                       | 79,0 ± 10,5   | 75,6 ± 10,8       | <0,0001    |
| IMC (Kg/m <sup>2</sup> )         | 27,9 ± 4,0    | 26,4 ± 26,4       | <0,0001    |
| Heart Rate (bt/min)              | 68,9 ± 12,8   | 72,0 ± 8,6        | <0,0001    |
| Leucocitos (10 <sup>3</sup> /µl) | 7,8 ± 2,0     | 7,3 ± 2,1         | 0,026      |
| Glicémia (mg/dl)                 | 120,1 ± 50,4  | 96,2 ± 11,9       | <0,0001    |
| HDL (mg/dl)                      | 39,7 ± 9,8    | 56,7 ± 18,5       | <0,0001    |
| LDL (mg/dl)                      | 119,2 ± 44,0  | 114,5 ± 36,2      | 0,04       |
| Triglicédeos (mg/dl)             | 193,2 ± 143,1 | 148,6 ± 107,7     | 0,002      |
| Apo B (mg/dl)                    | 103,5 ± 27,6  | 111,1 ± 25,2      | Ns         |
| Lipoproteína (a) (mg/dl)         | 36,9 ± 36,6   | 26,8 ± 24,6       | Ns         |
| Homocisteína (µmol/l)            | 11,7 ± 3,7    | 10,8 ± 5,0        | 0,002      |
| Fibrinogénio mg/dL               | 335,5 ± 96    | 268 ± 58,8        | 0,001      |
| VOP m/sec                        | 10,3 ± 2,1    | 8,8 ± 1,9         | <0,0001    |

PAS – Pressão Arterial Sistólica; PAD – Pressão Arterial Diastólica; IMC – Índice de Massa Corporal; HDL – High Density Lipoprotein; LDL – Low Density Lipoprotein; Apo B – Apolipoproteína B 100; VOP – Velocidade de Onda de Pulso.

com a interacção entre os níveis normais de HDL e o mesmo genótipo (OR=1,39; p=0,348) ou aos níveis baixos de HDL sem o genótipo RR (OR=7,79; p <0,0001), (*Quadro IV*).

A proporção de DC atribuível a esta interacção é de 0,53 o que significa que, nos doentes com HDL baixa e PON 192 RR, 53% da existência de DC pode ser explicada por esta interacção.

artery disease calculated for the PON1 RR genotype was 1.61, with statistical significance in the whole population, which is within the range of results of other studies (1.5 in a meta-analysis by Durrington)<sup>(4)</sup>.

However, there is considerable variation in the results of studies investigating PON1 Q192R and CAD. The RR genotype was linked with CAD in some American studies,

**Table I. Baseline characteristics of the study population**

| Variable                         | Cases (n=298) | Controls (n=520) | p       |
|----------------------------------|---------------|------------------|---------|
| Age (years)                      | 55.0±10.3     | 53.3±11.7        | NS      |
| Male (%)                         | 235 (78.9%)   | 377 (72.5%)      | NS      |
| Family history (%)               | 114 (38.3%)   | 76 (14.6%)       | <0.0001 |
| Smoking                          | 115 (38.6%)   | 118 (22.7%)      | <0.0001 |
| Hypertension (%)                 | 114 (38.3%)   | 119 (22.9%)      | <0.0001 |
| Diabetes (%)                     | 69 (23.2%)    | 34 (6.5%)        | <0.0001 |
| Alcohol intake (g/day)           | 55.6±83.2     | 24.6±45.9        | <0.0001 |
| SBP (mmHg)                       | 134.6±20.5    | 127.2±17.4       | <0.0001 |
| DBP (mmHg)                       | 79.0±10.5     | 75.6±10.8        | <0.0001 |
| BMI (Kg/m <sup>2</sup> )         | 27.9±4.0      | 26.4±26.4        | <0.0001 |
| Heart rate (bpm)                 | 68.9±12.8     | 72.0±8.6         | <0.0001 |
| Leukocytes (10 <sup>3</sup> /µl) | 7.8±2.0       | 7.3±2.1          | 0.026   |
| Blood glucose (mg/dl)            | 120.1±50.4    | 96.2±11.9        | <0.0001 |
| HDL (mg/dl)                      | 39.7±9.8      | 56.7±18.5        | <0.0001 |
| LDL (mg/dl)                      | 119.2±44.0    | 114.5±36.2       | 0.04    |
| Triglycerides (mg/dl)            | 193.2±143.1   | 148.6±107.7      | 0.002   |
| Apo B (mg/dl)                    | 103.5±27.6    | 111.1±25.2       | NS      |
| Lipoprotein(a) (mg/dl)           | 36.9±36.6     | 26.8±24.6        | NS      |
| Homocysteine (µmol/l)            | 11.7±3.7      | 10.8±5.0         | 0.002   |
| Fibrinogen (mg/dl)               | 335.5±96      | 268±58.8         | 0.001   |
| PWV (m/sec)                      | 10.3±2.1      | 8.8±1.9          | <0.0001 |

Apo B: apolipoprotein B100; BMI: body mass index; DBP: diastolic blood pressure; HDL: high-density lipoprotein; LDL: low-density lipoprotein; PWV: pulse wave velocity; SBP: systolic blood pressure

**Quadro II - Genótipos da PON Q192R no risco de DC**

| PON 192 Q/R | Casos (n=298) | Controlos (n=520) | Odds ratio (IC 95%) | Valor de p |
|-------------|---------------|-------------------|---------------------|------------|
| QQ          | 108 (36.2)    | 210 (40,0)        | 0,84 (0,62-1,14)    | 0,242      |
| QR          | 153 (51.3)    | 268 (51,5)        | 0,99 (0,74-1,33)    | 0,957      |
| RR          | 37 (12.4)     | 42 (8,1)          | 1,61 (0,99-2,64)    | 0,043      |

**Table II. Genotypes of PON1 Q192R and CAD risk**

|    | Cases (n=298) | Controls (n=520) | Odds ratio (95% CI) | p     |
|----|---------------|------------------|---------------------|-------|
| QQ | 108 (36.2)    | 210 (40.0)       | 0.84 (0.62-1.14)    | 0.242 |
| QR | 153 (51.3)    | 268 (51.5)       | 0.99 (0.74-1.33)    | 0.957 |
| RR | 37 (12.4)     | 42 (8.1)         | 1.61 (0.99-2.64)    | 0.043 |

**Quadro III - Alelo Q e R da PON Q192R no risco de DC**

| PON 192 Q/R | Casos (n=298) | Controlos (n=520) | Odds ratio (95% IC) | Valor de p |
|-------------|---------------|-------------------|---------------------|------------|
| Q           | 369 (0,60)    | 688 (0,66)        |                     |            |
| R           | 227 (0,38)    | 352 (0,34)        | 1,20 (0,97-1,49)    | 0,084      |

**Table III. Q and R alleles of PON Q192R and CAD risk**

|   | Cases (n=298) | Controls (n=520) | Odds ratio (95% CI) | p     |
|---|---------------|------------------|---------------------|-------|
| Q | 369 (0.60)    | 688 (0.66)       |                     |       |
| R | 227 (0.38)    | 352 (0.34)       | 1.20 (0.97-1.49)    | 0.084 |

## DISCUSSÃO

O presente trabalho levou a um cálculo do risco de DC da PON 1 RR, para toda a população, da ordem de 1,61, com significância estatística, o que está perfeitamente dentro da média dos resultados de outros autores (1,5 na meta-análise publicada por Durrington).

while in Europe other groups failed to show such an association<sup>(15)</sup>. This disparity suggests, besides ethnic differences between populations, that gene-gene and gene-environment interactions are involved, particularly the possibility that the antioxidant capacity conferred by PON1 is especially important when vascular risk is high due to other risk factors.

**Quadro IV - Interação entre o polimorfismo PON 192 RR e os níveis baixos de colesterol HDL**

| PON 192 Q/R |               | Casos (n=298) | Controlos (n=520) | Odds Ratio (IC 95%) | Valor de p |
|-------------|---------------|---------------|-------------------|---------------------|------------|
| RR          | HDL <40 mg/dl |               |                   |                     |            |
| -           | -             | 93 (31,2)     | 388 (74,6)        | Referência          |            |
| -           | +             | 168 (56,4)    | 90 (17,3)         | 7,79 (5,46-11,13)   | <0,0001    |
| +           | -             | 12 (4,0)      | 36 (6,9)          | 1,39 (0,66-2,90)    | 0,348      |
| +           | +             | 25 (8,4)      | 6 (1,2)           | 17,38 (6,54-48,78)  | <0,0001    |

**Índices de sinergismo:** (Interação entre o genótipo PON 192 RR e os níveis baixos de colesterol HDL)

**SI** = 16,38/6,79 + 0,39 = 2,3; (Risco Aditivo)

**SIM** = 17,38/7,79 x 1,39 = 1,6; (Risco multiplicativo)

**RERI** = 17,38-7,79-1,39+1=9,2; (Excesso de Risco Relativo)

**AP** = 9,2/17,38=0,53 (Proporção atribuída à interação)

**Table IV - Interaction between the PON1 192RR polymorphism and low HDL-cholesterol**

|    |               | Cases (n=298) | Controls (n=520) | Odds Ratio (IC 95%) | Valor de p |
|----|---------------|---------------|------------------|---------------------|------------|
| RR | HDL <40 mg/dl |               |                  |                     |            |
| -  | -             | 93 (31.2)     | 388 (74.6)       | Reference           |            |
| -  | +             | 168 (56.4)    | 90 (17.3)        | 7.79 (5.46-11.13)   | <0.0001    |
| +  | -             | 12 (4.0)      | 36 (6.9)         | 1.39 (0.66-2.90)    | 0.348      |
| +  | +             | 25 (8.4)      | 6 (1.2)          | 17.38 (6.54-48.78)  | <0.0001    |

**Indices of synergism/antagonism** (interaction between the PON1 RR192 genotype and low HDL levels were as follows:

**SI** = 16.38/(6.79 + 0.39) = 2.3 (additive risk)

**SIM** = 17.38/(7.79 x 1.39) = 1.6 (multiplicative risk)

**RERI** = 17.38-7.79-1.39+1= 9.2 (relative excess risk due to interaction)

**AP** = 9.2/17.38 = 0.53 (attributable proportion)

No entanto, existe uma grande variabilidade nos resultados de várias outras séries de estudos que investigaram os genótipos da PON 192R e a DC. O genótipo RR associou-se com DC em alguns que decorreram nos EUA, no entanto na Europa existem outros que não mostraram essa associação<sup>(15)</sup>. Esta disparidade de resultados sugere, além de diferenças étnicas em diferentes populações, interações gene-gene e gene ambiente, nomeadamente a possibilidade de que a capacidade antioxidante conferida pela PON 1 seja particularmente importante, quando existe um risco vascular acrescido conferido por outros factores de risco.

De acordo com os presentes resultados, quando se entra em conta com os níveis baixos de HDL associados ao genótipo PON 1 192 RR, o risco de DC modifica-se substancialmente: a HDL baixa, só por si, comporta um risco cardiovascular acrescido e muito significativo, o que já era conhecido. A PON 1 192 RR, só por si, sem HDL baixa, apresenta um risco vascular pequeno.

Quando se junta a deficiente capacidade antioxidante, conferida pela PON 1 192 RR, com os níveis baixos de HDL o risco de DC dispara, havendo sinergismo mais do que adi-

Our results show that when low HDL levels is associated with the PON1 RR192 genotype, CAD risk is substantially increased. Low HDL by itself is known to significantly increase cardiovascular risk, while the risk from PON1 RR192 alone (without low HDL) is small.

The combination of impaired antioxidant capacity resulting from PON1 RR192 and low HDL causes CAD risk to increase sharply, as there is synergism that is more than additive, and indeed more than multiplicative, between the two conditions.

These findings may point to a new explanation for the disagreement in the risk attributed to PON1 polymorphisms in studies on different populations, indicating that if the population has a high prevalence of low HDL, the PON1 RR192 genotype will confer greater risk; if most subjects have normal HDL levels, the RR genotype will not lead to significant risk.

We also found that the proportion of CAD that can be attributed to the interaction is 0.53, meaning that 53% of CAD in individuals with PON1 RR192 and low HDL is explained by this interaction

The study has certain limitations. It was

tivo e mais do que multiplicativo, entre estas duas situações.

Estes resultados podem de forma inovadora explicar o desacordo do risco atribuído aos polimorfismos da PON 1 em estudos envolvendo populações diferentes: de acordo com estes resultados, se a população tem uma prevalência elevada de HDL baixa, a PON 1 192 RR surgirá com risco; se a população tiver maioritariamente níveis normais de HDL, o genótipo RR não acarretará risco significativo.

Verificamos também, no presente estudo, que a proporção de DC que pôde ser atribuída à interacção (AP) correspondeu a 0,53 significando que 53% da DC que surgiu nos indivíduos com PON 1 RR e HDL baixa, pode ser explicada por esta interacção.

O estudo apresenta algumas limitações:

Não foi possível efectuar a determinação dos níveis plasmáticos da actividade da enzima paraoxonase 1, nos casos e nos controlos, assim como a actividade da PON 1 por genótipo. No entanto, embora este doseamento fosse importante para avaliar a expressividade dos vários polimorfismos, para o cálculo do risco ligado a genótipos esta limitação não altera os resultados.

A dimensão da amostra original é, pelo menos, razoável, envolvendo mais de 800 elementos. No entanto, avaliar genótipos e indivíduos com determinados outros factores de risco significa a criação de subgrupos, e portanto a diminuição das amostras em análise. Esta situação é agravada devido à baixa prevalência do genótipo RR na nossa população (da ordem dos 9%). Nestas circunstâncias os números finais em análise acabam por ser limitados, o que leva a intervalos de confiança largos, obrigando a ter alguma reserva em relação aos números absolutos do estudo.

Sabemos que as populações caucasianas mediterrânicas se comportam diferentemente das populações asiáticas na prevalência do genótipo RR: nas mediterrânicas a sua prevalência é baixa, mas nas asiáticas este genótipo foi referido como o mais frequente.

Assim, apresentando a nossa população uma baixa prevalência de PON 1 RR, necessitamos de aumentar a nossa amostra a fim de aumentar o poder estatístico da mesma.

not possible to determine plasma activity of paraoxonase 1 in cases and controls or PON1 activity by genotype. However, although measurement of enzyme activity is important to assess how the different genotypes are expressed, when calculating how they affect risk, this limitation does not alter the results.

The size of the original sample is at least reasonable, with over 800 subjects, but assessment of genotypes in individuals with other risk factors entails the creation of subgroups, which reduces the sample size under analysis. This was exacerbated by the low prevalence of the RR genotype (around 9%) in our population, with the result that the numbers available for analysis were small and confidence intervals were wide. The absolute values of the study should therefore be treated with caution.

White Mediterranean populations have a lower prevalence of the RR genotype than Asians, in whom it is the most common. There was thus a low prevalence of PON1 RR in our populations, which means that the sample needs to be larger to improve the statistical power of the analysis.

Despite these limitations, we can conclude that the prevalence of PON1 RR192 in our population is low, and by itself confers only moderate coronary risk (odds ratio = 1.61). However, it has a synergic effect with low HDL, the combination leading to a highly significant cardiovascular risk.

This study thus supports the idea that coronary disease arises from the interaction between genetic factors, in this case PON1 polymorphisms, and behavioral factors, represented here by low HDL-cholesterol levels.

Apesar das limitações, do presente estudo podemos concluir que a PON 1 192 RR tem uma baixa prevalência na nossa população e, por si só, um risco coronário moderado (*Odds ratio* = 1,61). Apresenta, no entanto, efeito sinérgico com a HDL baixa, o que leva, nesse caso, a um risco cardiovascular muito importante.

Deste modo, o trabalho apoia o conceito de que a doença coronária emerge da interação entre factores genéticos, aqui representados pela PON 1, com factores comportamentais, no presente representados por níveis baixos de colesterol HDL.

Pedido de separatas para:  
Address for reprints:

Maria Isabel Mendonça  
Unidade de Investigação  
Hospital Dr. Nélio Mendonça  
Av. Luís de Camões  
Funchal, Madeira  
Portugal  
Tel: +351.291.744312  
Fax: +351.291.744312  
e-mail: dep.card@srs.pt

## BIBLIOGRAFIA / REFERENCES

1. Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett.* 1991; 286:152-154.
2. 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, Lusic AJ, Hazen S L. Relationship of Paraoxonase 1 (PON1) Gene Polymorphisms and Functional Activity with Systemic Oxidative Stress and Cardiovascular Risk. *JAMA.* 2008; 299(11):1265-1276.
3. Mackness MI, Mackness B, Durrington PN, Connelly PW, Hegele RA. Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. *Curr Opin Lipidol.* 1996; 7:69-76.
4. Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. Paraoxonase and Atherosclerosis. 2001, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:473-480.
5. Serrato M, Marian AJ. A variant of human paraoxonase/arylesterase (HUMPONA) gene is a risk factor for coronary artery disease. *J Clin Invest.* 1995; 96:3005-3008.
6. Pfohl M, Koch M, Enderle MD, Kühn R, Füllhase J, Karsch KR, Haring HU. Paraoxonase 192 Gln/Arg gene polymorphism, coronary artery disease, and myocardial infarction in type 2 diabetes. *Diabetes.* 1999 48:623-627; doi:10.2337/diabetes.48.3.623
7. Jauhiainen M, Frick MH, Ehnholm C. The Gln-Arg191 polymorphism of the human paraoxonase gene (HUMPONA) is not associated with the risk of coronary heart disease in Finns. *J Clin Invest.* 1996; 98:883- 885.
8. 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.* 2003; 289:2560-2572.
9. Report of the Expert Committee on Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1997, 1183-1197.
10. De Backer G, Ambrosioni E, Borch-Johnsen K, Brotons C, Cifkova R, Dallongeville J, Ebrahim S, Faergeman O, Graham I, Mancina G, Cats VM, Orth-Gomer K, Perk J, Pyörälä K, Rodicio JL, Sans S, Sansoy V, Sechtem U, Silber S, Thomsen T, Wood D. European Society of Cardiology. American Heart Association. American College of Cardiology. 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.
11. 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 (NCEPT) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001, 285:2486-2497.
12. Rothman KJ (1974) Synergy and antagonism in cause-effect relationships. *Am J Epidemiol* 99:385-388.
13. Khoury MJ, Flanders WD. Non-traditional epidemiologic approaches in the analysis of gene-environment interaction: case-control studies with no controls! *Am J Epidemiol.*1996; 144:207-213.
14. Mackness B, Durrington PN, Abuashia B, Boulton AJ, Mackness MI. Low paraoxonase activity in type II diabetes mellitus complicated by retinopathy. *Clin Sci (Lond).* 2000;98(3):355-63.
15. Senti M, Tomás M, Marrugate J, Elosura R, for the REGICOR Investigators. Paraoxonase 1 192 Polymorphism Modulates the Nonfatal Myocardial Infarction Risk Associated with Decreased HDLs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:415-420.