

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
CENTRO DE ESTUDOS DE SAÚDE DO TRABALHADOR E
ECOLOGIA HUMANA

O EFEITO DO HÁBITO DE FUMAR SOBRE A ATIVIDADE DA
ENZIMA PARAOXONASE EM UMA POPULAÇÃO HUMANA

THAÍS FAGGIONI

Tese de mestrado submetida à Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP),
como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Ciências
(área de Saúde Pública)

Rio de Janeiro

2003

Fundação Oswaldo Cruz
Escola Nacional de Saúde Pública
Curso de Pós-graduação em Saúde Pública

**O EFEITO DO HÁBITO DE FUMAR SOBRE A ATIVIDADE DA
ENZIMA PARAOXONASE EM UMA POPULAÇÃO HUMANA**

THAÍS FAGGIONI

Orientador: Josino Costa Moreira

Co-orientadora: Paula Sarcinelli

Dissertação defendida e aprovada em19...../.....agosto..... de 2003

Pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. Jaime Silva de Lima (1º examinador) - Universidade do Rio de Janeiro - UNI-RIO

Prof. Dr^a. Rita de Cassia O. C. Mattos (2ª examinadora) - CESTEh/FIOCRUZ

Prof. Dr. Josino Costa Moreira (Presidente da Comissão Examinadora) - CESTEh/FIOCRUZ

Faggioni, Thaís

O Efeito do Hábito de Fumar sobre a Atividade da Enzima Paraoxonase em uma População Humana.

Xii, 75 páginas

Tese de Mestrado em Saúde Pública, Escola Nacional de Saúde Pública - FIOCRUZ.

1. Paraoxonase; 2. Tabagismo; 3. Indicador de susceptibilidade; 4. Tese.

I. Fundação Oswaldo Cruz; II. Título.

Este trabalho é dedicado aos meus pais e ao Felipe, meus grandes e adorados
companheiros.

AGRADECIMENTOS

- ❖ Aos meus pais Márcia e Expedito, por estarem sempre ao meu lado, em todos os momentos, pessoais ou profissionais, me apoiando como verdadeiros amigos.
- ❖ Ao Felipe, por acompanhar passo a passo todos os meus obstáculos e estar sempre torcendo e me dando todo o amor necessário para eu não esmorecer.
- ❖ A minha avó Ercília, por seu carinho de avó e amor de mãe.
- ❖ Ao meu orientador Josino Costa Moreira, por sua orientação e pela boa vontade de sempre.
- ❖ Ao André Oliveira que, apesar de estar sempre “com pressa”, me ajudou bastante e numa hora crucial. Valeu mesmo!
- ❖ A minha co-orientadora Paula Sarcinelli, por toda a força que me deu nos momentos mais desgastantes. Era muito bom ouvir: “calma, vai dar tudo certo!”. Valeu, Paulinha!
- ❖ A Ana Cristina, que me “introduziu” no laboratório do CESTEh e me ajudou bastante.
- ❖ A Lucineide, Sérgio e a todo o pessoal do CESTEh que, de alguma forma, me ajudou nesta batalha.
- ❖ A Lúcia Helena e ao André Mazei do INCQS, pela ajuda e boa vontade.
- ❖ Ao amigo Pedro Paulo, por ser parte fundamental de minhas conquistas profissionais.
- ❖ As minhas amigas Andréia, Renata, Isabel, Kelly e Talita. A amizade de vocês é muito importante para mim.
- ❖ A Larinha, pela alegria com que me recebe todos os dias.

RESUMO

O tabagismo é considerado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) a principal causa de morte evitável em todo o mundo, estando associado com diversas doenças e, especialmente, com um aumento na incidência de aterosclerose prematura. Recentes trabalhos têm mostrado que a paraoxonase (PON), protege contra a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), que pode levar ao desenvolvimento da aterosclerose, e que alterações na atividade e concentração da enzima paraoxonase têm sido observadas em fumantes. Assim, o objetivo principal do presente estudo foi investigar uma possível interferência do tabagismo sobre a atividade da enzima paraoxonase. Para isso, foi analisado um grupo de 40 indivíduos (20 fumantes e 20 não fumantes) da cidade de Vassouras, Rio de Janeiro. A determinação da atividade paraoxonásica foi realizada a partir do método de Eckerson et al. (1983 a, 1983 b), modificado por Moraes (1997). A dosagem da enzima arilesterase foi feita a partir do método de Lorentz et al. (1979), modificado por Oliveira-Silva et al. (1998). Os dados obtidos nesta pesquisa indicam que o tabagismo pode influenciar a atividade da paraoxonase, aumentando ainda mais os riscos de desenvolvimento da aterosclerose e que o uso de anticoncepcional também pode exercer uma forte influência sobre a atividade da paraoxonase.

ABSTRACT

Tobacco smoking is the most preventable cause of death, according to WHO (World Health Organization), and it is connected to several illnesses, specially the increase of cases of premature atherosclerosis. Recent studies have shown that the paraoxonase (PON) protects low density lipoprotein against oxidation, which can lead to the development of atherosclerosis and modifications in the activity and in the concentration of the paraoxonase enzyme have been detected in smokers. The main purpose of this study was to investigate the possible interference of tobacco smoking at the paraoxonase activity. To achieve that 40 people (20 smokers and 20 non-smokers) from Vassouras, Rio de Janeiro, were analysed. The determination of the paraoxonase activity was accomplished by the Eckerson's et al. method (1983 a, 1983 b), modified by Moraes (1997). The amount of the arislesterase enzyme was taken by the Lorentz et al method (1979), modified by Oliveira-Silva et al. (1998). The data acquired in the present research indicate that tobacco smoking can influence the paraoxonase activity and increase the risks of developing atherosclerosis. It was also discovered that the use of contraceptive (birth control) can also act strongly on the paraoxonase activity.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1- INTRODUÇÃO | |
| 1.1- Esterases | 1 |
| 1.2- Inseticidas Organofosforados | 3 |
| 1.2.1- Monitoramento Biológico de Exposição a Inseticidas Organofosforados | 8 |
| 1.2.1.1- Indicadores de dose interna | 8 |
| 1.2.1.2- Indicadores de efeito | 9 |
| 1.2.1.3- Indicadores de susceptibilidade | 9 |
| 1.3- Paraoxonase | 10 |
| 1.3.1- Propriedades da paraoxonase plasmática humana | 12 |
| 1.3.2- Associação da paraoxonase com lipoproteínas de alta densidade (HDL) | 12 |
| 1.3.3- Possíveis funções fisiológicas da paraoxonase | 15 |
| 1.3.4- A genética da paraoxonase sérica humana e a modulação de sua atividade | 16 |
| 1.4- Tabagismo: Dados Epidemiológicos | 20 |
| 1.4.1- A toxicidade do tabaco | 20 |
| 1.4.2- Farmacologia da nicotina | 22 |
| 1.4.3- Conseqüências do tabagismo para a saúde | 23 |
| 1.5- Aterosclerose | 27 |
| 1.5.1- A atividade da paraoxonase na aterosclerose | 32 |
| 1.5.2- A influência do polimorfismo da paraoxonase na aterosclerose | 33 |
| 1.6- Modulação da atividade da PON por dieta, estilo de vida e fatores ambientais | 34 |
| 1.7- A Paraoxonase e o Tabagismo | 36 |
| 2- OBJETIVOS | 39 |
| 3- MATERIAIS E MÉTODOS | 40 |
| 3.1- Reagentes | 40 |
| 3.2- Equipamentos | 40 |
| 3.3- Grupos de indivíduos | 40 |
| 3.4- Dados epidemiológicos | 41 |
| 3.5- Coleta e processamento das amostras de sangue | 41 |
| 3.6- Dosagem das atividades das enzimas paraoxonase e arilesterase | 41 |
| 3.6.1- Dosagem da atividade da enzima arilesterase | 41 |

| | |
|---|----|
| 3.6.2- Dosagem da atividade da enzima paraoxonase | 42 |
| 3.6.2.1- Dosagem da atividade basal da enzima paraoxonase | 42 |
| 3.6.2.2- Dosagem da atividade da enzima paraoxonase estimulada por NaCl | 42 |
| 3.7- Determinação dos fenótipos da enzima paraoxonase na população estudada | 43 |
| 3.8- Banco de dados, cálculos estatísticos e gráficos | 44 |
| 4- RESULTADOS E DISCUSSÃO | 45 |
| 4.1- Considerações | 45 |
| 4.2- Análises descritivas | 46 |
| 4.2.1- Distribuição dos sexos na população em estudo | 46 |
| 4.2.2- Distribuição da idade na população em estudo | 47 |
| 4.2.3- Análise descritiva da atividade basal e estimulada por NaCl da paraoxonase | 49 |
| 4.2.3.1- Atividade basal da enzima paraoxonase | 49 |
| 4.2.3.2- Atividade da enzima paraoxonase estimulada por NaCl | 52 |
| 4.2.4- Análise descritiva da atividade da enzima arilesterase | 54 |
| 4.2.4.1- Atividade da enzima arilesterase | 55 |
| 4.3- Distribuição fenotípica | 57 |
| 5- CONCLUSÃO | 61 |
| 6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 63 |

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de DL 50 aguda de inseticidas organofosforados. Página 6.

Tabela 2 - Sinais e sintomas nas intoxicações por inseticidas organofosforados. Página 7

Tabela 3 - O polimorfismo da paraoxonase dependente de substrato. Página 18.

Tabela 4 - Análise descritiva da atividade basal da enzima paraoxonase da população em estudo. Página 52.

Tabela 5 - Análise descritiva da atividade da enzima paraoxonase estimulada por NaCl da população estudada. Página 54.

Tabela 6 - Análise descritiva da atividade da enzima arilesterase da população estudada. Página 56.

Tabela 7-Distribuição dos fenótipos da população em estudo da cidade de Vassouras, Rio de Janeiro. Página 60.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Exemplos de rotas metabólicas do pesticida organofosforado paration no organismo humano. Página 2.

Figura 2 - Estrutura básica de um inseticida organofosforado. Página 3.

Figura 3 - Representação esquemática da enzima paraoxonase. Página 14.

Figura 4- Distribuição mundial dos fenótipos de baixa atividade da enzima paraoxonase. Página 19.

Figura 5 - Distribuição dos sexos da população estudada. Página 46.

Figura 6 - Distribuição da idade da população total estudada. Página 47.

Figura 7- Distribuição da idade do grupo de fumantes da população estudada. Página 48

Figura 8 - Distribuição da idade do grupo de não fumantes da população estudada. Página 48.

LISTA DE ABREVIATURAS

μg - Micrograma

μL - Microlitro

λ - Comprimento de onda

DL50 - Dose Letal 50

DMSO - Dimetil Sulfóxido

HCl - Ácido Clorídrico

HDL - Lipoproteína de alta densidade

Kg - Kilograma

LDL - Lipoproteína de baixa densidade

M - Molar

Mg - Miligrama

min - Minuto

mL - Mililitro

mM - Milimolar

NaCl - Cloreto de sódio

OMS - Organização Mundial de Saúde

OP - Organofosforados

PON - Paraoxonase

POX - Paraoxonase (EC 3.1.1.8)

RPM - Rotações por minuto

Tris - Tri - Hidroxi - Amino - Metano

VLDL - Lipoproteína de densidade muito baixa

1. INTRODUÇÃO

1.1 – ESTERASES

As esterases são enzimas hidrolíticas, presentes em uma grande quantidade de organismos vivos e possuem especificidade para uma gama variada de substratos, como ésteres de colina, ácidos aromáticos, compostos organofosforados (OP) (Noel & Mayasich, 1991).

Este grupo de enzimas pode ser dividido em três grandes grupos, em função da interação com organofosforados. As esterases do tipo “A”, são capazes de hidrolisar compostos OP, sem serem inibidas por estes, já as esterases do tipo “B”, são capazes de hidrolisar estes compostos, mas, entretanto, são inibidas por estes compostos, enquanto as esterases do tipo “C”, não possuem qualquer forma de interação com os pesticidas OP (Parkinson, 1996).

Os compostos OP podem ser “atacados” enzimática e simultaneamente, em diferentes pontos de sua molécula. Um exemplo de reação que acontece com compostos OP é a dessulfuração oxidativa, que resulta em um composto com maior toxicidade, normalmente denominado o composto oxon análogo ao xenobiótico original. É assim que ocorre a biotransformação do paration (figura 1), que sofre uma reação de dessulfuração oxidativa, e é transformado em paraoxon (seu oxon análogo), capaz de produzir efeito tóxico (Sultatos & Murphy, 1993 e Chambers et al., 1991). O passo subsequente a ativação é uma etapa de detoxicação, quando ocorrem reações de hidrólise e conjugação. No caso dos pesticidas OP e, mais precisamente, os ésteres de fosfato formados, as esterases catalisam reações de hidrólise (McCracken et al., 1993).

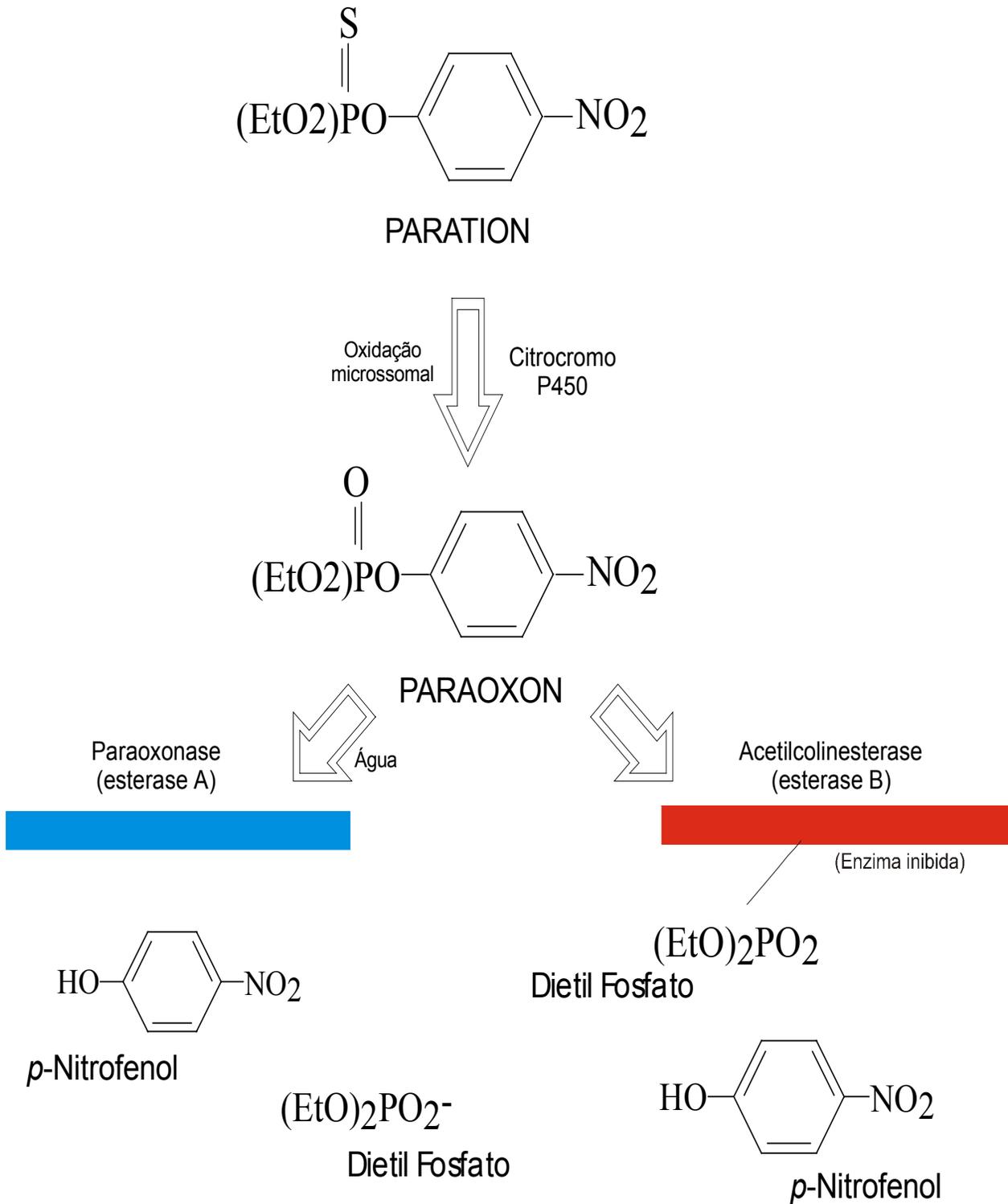
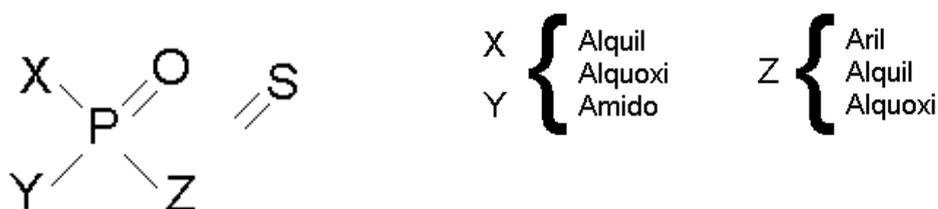


Figura 1- Exemplos de rotas metabólicas do pesticida organofosforado paration no organismo humano. Nota-se, a fosforilação é irreversível na enzima acetilcolinesterase, o que não ocorre na paraoxonase.
Fonte: Oliveira-Silva, 2000.

Tem-se postulado que a maior diferença entre as esterases, se encontra na presença de um resíduo cisteína no sítio catalítico da esterase “A” e de serina no sítio ativo das esterases “B” (Yan et al, 1994). Ambas famílias de enzimas são capazes de hidrolisar organofosforados, porém o tempo de dissociação do complexo enzima-substrato é que irá determinar o potencial inibidor ou não destes compostos. Nas esterases do tipo “B”, o tempo de dissociação é maior que a meia-vida (“turnover”) da enzima, sendo assim, pode-se considerar que esta família de pesticidas é um inibidor irreversível deste complexo enzimático, o que já não ocorre com as esterases do tipo “A”, já que nesta família de enzimas, o tempo de dissociação do complexo enzima-substrato é menor do que a meia-vida da enzima, sendo assim, os compostos organofosforados não são inibidores efetivos desta família de enzimas (Mackness, 1989).

1.2- INSETICIDAS ORGANOSFOSFORADOS

Os inseticidas organofosforados são basicamente ésteres do ácido fosfórico e sua nomenclatura mais comum se baseia nos átomos e radicais que se ligam ao átomo central de fósforo (figura 2).



Fonte: Ecobichon, 1996

Figura 2 - Estrutura básica de um inseticida organofosforado.

Os inseticidas organofosforados podem ser classificados, de acordo com a estrutura química, em:

- Fosforados, como o paraoxon etílico;
- Tiofosforados divididos em monotiofosforados como o paration etílico e metílico, Sumition, Fenition, Diazinon e Ditiofosforados como o Dimetoato, Malation, etc;
- Clorofosforados, como DDVP, Dipterex, Trition, etc;
- Flúor e Cianofosforados, como o Sarin, Soman e Tabun.

Os inseticidas organofosforados são absorvidos pelo organismo humano através de todas as vias possíveis, incluindo a via dérmica, o trato gastrointestinal, a via respiratória e as membranas mucosas (Larini, 1997).

A absorção pela via oral ocorre nas intoxicações acidentais, particularmente em crianças, em homicídios e suicídios, não sendo esta via considerada de grande importância na exposição ocupacional. A absorção dérmica é a principal via de penetração nos envenenamentos ocupacionais. Pela via respiratória pode ocorrer, especialmente em indivíduos que trabalham nas indústrias de formulação e também no uso doméstico sob a forma de aerossóis (Spray) (Larini, 1997).

Os inseticidas organofosforados não são acumulados no organismo humano sendo facilmente degradados e excretados. A eliminação ocorre predominantemente através da urina sendo a eliminação pelas fezes considerada de pequena importância (Larini, 1997).

A tabela 1 mostra os valores de DL50 aguda oral e dérmica para os principais inseticidas organofosforados (Larini, 1997). A DL50 é o valor estimado da dose

necessária, em mg/Kg de peso corpóreo, que irá levar a morte de 50% dos animais em experimentação (Henao e Corey, 1986; Albert, 1988; Fait, 1994).

O quadro sintomatológico pode variar quanto à gravidade, rapidez de instalação e/ou duração, na dependência da via de absorção e da magnitude da exposição. Não ocorre nenhuma alteração inflamatória importante no local de absorção, mas a toxicidade sistêmica é elevada. Os sinais e sintomas mais comumente observados nos envenenamentos por inseticidas organofosforados estão resumidos na tabela 2.

O diagnóstico clínico ou químico das intoxicações por organofosforados apresenta dificuldades não só em relação à diversidade dos sinais e sintomas observados, mas também devido a fatores como: a utilização de inseticidas de diversas classes numa mesma formulação comercial, a presença de impurezas de fabricação nos produtos de grau técnico, a inibição da atividade da enzima pode-se desenvolver sem algum significado clínico de intoxicação, entre outros.

Tabela 1 - Valores de DL 50 aguda de inseticidas organofosforados.

| Inseticidas | DL 50 (mg.Kg ⁻¹) em ratos | | | |
|-------------------|---------------------------------------|--------|-------------|---------|
| | Via Oral | | Via Dérmica | |
| | Machos | Fêmeas | Machos | Fêmeas |
| Paration etílico | 7,0 | 4,0 | 21,0 | 6,8 |
| Paration Metílico | 9,7 | 4,5 | | 67,0* |
| Sumition | 837,0 | 673,0 | – | 1000,0 |
| Fenition | 190,0 | 310,0 | | 330,0* |
| Dimetoato | | 180* | | 700,0* |
| Formotion | 535,0 | 375,0 | | 700,0* |
| Ekatin | | 60,0* | – | – |
| Gusation | | 20,0* | – | – |
| T.E.P.P. | 1,1 | – | 2,4 | – |
| Malation | 1375,0 | 1000,0 | | 4000,0* |
| D.D.V.P. | 80,0 | 56,0 | 107,0 | 75,0 |
| Dipterex | 630,0 | 560,0 | | 2000,0* |
| Bromophos | 1600,0 | 1730,0 | | 5000,0* |
| Ronnel | 1250,0 | 2630,0 | | 5000,0* |

* Sexo não especificado.

Fonte: Larini, 1997.

Tabela 2 - Sinais e sintomas nas intoxicações por inseticidas organofosforados.

| Local | Sinais e Sintomas | | |
|-----------------------------|---|--|---|
| | | Precoces | Tardios |
| 1- Sistema Nervoso Central | 1.1 - Alterações neuropsiquiátricas | Tensão, ansiedade, inquietude. | Alterações dos sonhos e pesadelos excessivos, dificuldade de concentração, comprometimento da memória, etc. |
| | 1.2 - Alterações neurológicas puras | Cefaléia, tonteira e vertigens. | Convulsões, atonia, tremores, confusão, torpor e coma, soluços, etc. |
| 2- Sistema Nervoso Autônomo | <i>Efeitos Muscarínicos:</i> 2.1 - Sistema respiratório | Aumento do ritmo respiratório superficial, tosse. | Rinorréia, secreção bronquiolar excessiva, edema pulmonar, etc. |
| | 2.2 - Aparelho digestivo (mais graves quando a intoxicação ocorre por esta via) | Perda de apetite | Náuseas, vômitos, dores abdominais, diarreia, defecação involuntária. |
| | 2.3 - Sistema circulatório | Pulso diminuído | Bradycardia, parada cardíaca, etc. |
| | 2.4 - Oculares | Visão enfraquecida | Miose, pupilas punctiformes sem reação. |
| | 2.5- Geniturinário | | Diurese freqüente e involuntária. |
| | 2.6 - Glândulas exócrinas | Lacrimejamento, aumento das secreções salivar e nasal. | Transpiração excessiva. |
| 3- Sistema Somático | 3- <i>Efeitos Nicotínicos</i> | Fadiga, fraqueza muscular, contrações involuntárias | Câimbras, fasciculações, enfraquecimento muscular. |

Fonte: Larini, 1997.

1.2.1- MONITORIZAÇÃO BIOLÓGICA DE EXPOSIÇÃO A INSETICIDAS ORGANOFOSFORADOS

O uso de indicadores biológicos tem sido útil ferramenta no sentido de possibilitar avaliações mais específicas como, por exemplo, a dose de uma substância no órgão onde se dá a sua ação tóxica, assim como também indicar diferenças individuais relacionadas aos mecanismos toxicocinéticos dos xenobióticos (Lowry, 1995; Bernard, 1995).

Basicamente 3 tipos de indicadores biológicos podem ser utilizados nestes monitoramentos, os indicadores biológicos de: dose interna, efeito e susceptibilidade.

1.2.1.1- Indicadores de dose interna

Estes indicadores podem refletir a concentração real da substância no local onde ela exerce sua ação tóxica, ou estimar o grau de exposição sempre que o nível da substância no material biológico esteja correlacionado com a concentração ambiental. Além disso, admite avaliar a concentração do agente químico nos órgãos e tecidos a partir dos quais é lentamente liberada.

No caso dos pesticidas organofosforados, poderíamos citar a detecção de metabólitos destes pesticidas como o *p*-nitrofenol (no caso do paration), metabólitos alquilfosfatos (dietil organofosforados), como poderíamos citar também a determinação direta destes compostos, apesar da sua menor aplicação devido a sua meia-vida relativamente curta e sua não acumulação nos tecidos (He, 1993).

1.2.1.2- Indicadores de efeito

São aqueles que identificam alterações precoces e reversíveis no organismo, resultantes da ação do xenobiótico, oriundos da ação deste em qualquer tecido, órgão ou sistema (Lowry, 1995).

No monitoramento a pesticidas organofosforados, um indicador de efeito bastante utilizado é a determinação das atividades das colinesterases sanguíneas.

1.2.1.3- Indicadores de susceptibilidade

Possibilitam a determinação de indivíduos com maior ou menor sensibilidade à ação tóxica de um determinado xenobiótico, nos ajudando a entender, pelo menos em parte, as diferentes respostas individuais face à exposição a substâncias tóxicas, facilitaria também a determinação de áreas de maior ou menor risco, de acordo com o perfil das populações dos locais estudados.

No caso dos pesticidas organofosforados, um candidato a indicador de susceptibilidade poderia ser a enzima paraoxonase (EC 3.1.1.8) (Costa e Manzo, 1995), já que existem estudos que indicam esta enzima como fator de proteção frente a compostos organofosforados, devido à capacidade desta hidrolisar estes compostos (Geldmacher et al., 1988). Existem ainda evidências indiretas como a alta susceptibilidade de pássaros, que possuem nenhuma ou baixa atividade paraoxonásica, a intoxicação por organofosforados, em comparação com mamíferos, que possuem níveis bem mais altos de atividade desta enzima (Brealey et al., 1980).

Poderíamos citar também testes diretos a respeito da proteção da paraoxonase contra a intoxicação por organofosforados, onde após se injetar paraoxonase

parcialmente purificada em animais, a resistência destes foi bastante aumentada (Costa et al., 1990; Li et al., 1993; Li et al., 1995).

Um outro fator importante para o papel da paraoxonase como indicador de susceptibilidade frente a compostos organofosforados, está baseado no seu polimorfismo genético, que será explicado detalhadamente mais adiante. A paraoxonase humana exibe um polimorfismo dependente de substrato, apresentando duas isoformas, com três fenótipos diferentes, com diferentes taxas de hidrólise de compostos organofosforados.

1.3 - PARAOXONASE

O principal representante das esterases “A” é a enzima paraoxonase – hidrolase de ligações triésteres de ácido fosfórico com afinidade específica a organofosforados (EC 3.1.1.8) (Mackness et al., 1996; Walker, 1993). Seu nome deriva de um dos substratos mais comumente utilizados *in vitro*, o paraoxon. (Costa, 2003). A maior parte da sua atividade está presente no soro, podendo também ser encontrada em eritrócitos e tecido cerebral. O tecido hepático, além de concentrar uma parte desta atividade, representa a fonte primordial da que é encontrada no plasma (Mackness, 1989).

A paraoxonase é o principal responsável pela detoxicação de agentes organofosforados em nosso organismo (Mackness, 1989). Em mamíferos, qualquer oxon que escape da detoxicação hepática, pode ser hidrolisado no sangue pela paraoxonase antes de chegar ao tecido nervoso. Alguns organofosforados como, por exemplo, o pirimifos – metiloxon, são rapidamente hidrolisados pela paraoxonase e estima-se que nenhuma molécula ativa deste pesticida chegue ao cérebro (Brealey et al.,

1980). Assim, no caso dos pesticidas organofosforados, a paraoxonase pode atuar como um indicador de susceptibilidade.

A função precisa da enzima paraoxonase em nosso organismo é ainda desconhecida (Heinecke e Lysis, 1998). Apesar da afinidade desta enzima por compostos organofosforados ser de extrema importância, esta não é a função para a qual ela foi originalmente designada. Estudos *in vitro* demonstram que ela pode reduzir significativamente a geração de peróxidos lipídicos durante a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), sendo assim, esta esterase pode estar ligada na proteção *in vivo* contra a aterosclerose (Kim et al, 1998). Desta forma, e também de acordo com Kelso et al. (1994), a atividade da paraoxonase pode ser usada como indicador preditivo de danos vasculares.

A atividade da paraoxonase pode estar também correlacionada com processos ligados ao infarto do miocárdio em algumas populações (Antikainen et al, 1996; Sanghera et al, 1997, Kao et al, 1998) e a diabetes (Ruiz, 1997; Kao et al, 1998). Outros trabalhos também indicam uma possível atividade hidrolítica de endotoxinas de alguns protozoários (Smith et al, 1995).

1.3.1 - Propriedades da paraoxonase plasmática humana

Evidências têm sugerido existir duas isoformas estruturais, que parecem ser constituídas de dois estágios de oxidação da paraoxonase, um com todos os resíduos de cisteína livres e um com uma ponte de dissulfeto. Essas isoformas não podem ser explicadas pelos pontos de mutações que determinam as isoformas genéticas (Sorenson et al, 1995 b).

A atividade da enzima é inibida por reagentes sulfidríla, e sua inibição é revertida pela cisteína. Assim, um resíduo de cisteína poderia estar associado como um componente essencial do sítio ativo da enzima. Porém, Sorenson et al (1995 b) testou diretamente esta hipótese e mostrou que a cisteína 283 não é essencial para a hidrólise do paraoxon. Portanto, a estrutura do sítio ativo da paraoxonase permanece indeterminada.

Estudos detalhados sobre a cinética da hidrólise do paraoxon pela paraoxonase humana indicam que o paraoxon é hidrolisado em pH 10,5 e que os íons cálcio têm dois papéis no mecanismo catalítico. Primeiro, o cálcio é necessário para a manutenção do sítio ativo, seja participando diretamente da reação catalítica ou mantendo a conformação apropriada do sítio ativo. Segundo, íons cálcio facilitam a remoção de dietil fosfato do sítio ativo, possivelmente pela polarização da ponte dupla P-O do paraoxon (Vitarius and Sultatos, 1995).

1.3.2- Associação da paraoxonase com lipoproteínas de alta densidade (HDL)

As esterases foram primeiramente descritas por Manzur (1946), e a associação da paraoxonase com lipoproteínas de alta densidade foi primeiramente detectada por Uriel, em 1961, através de imunoprecipitados de HDL após eletroforese de soro humano (LaDu, 1992). Subseqüentes investigações confirmaram esses achados em muitas espécies de mamíferos. Porém, não foi identificado se a paraoxonase era um componente intrínseco do HDL. Estudos mais recentes (Blatter et al, 1993; Gan et al, 1991; Kelso et al, 1994; La Du, 1992) confirmaram que é extremamente difícil remover a apolipoproteína A da paraoxonase durante a purificação de soro humano, o que sugere que a Apo A-I e paraoxonase estão fortemente associadas.

A paraoxonase tem uma região N-terminal extremamente hidrofóbica (Adkins et al, 1993) que permite se ancorar com lipídeos HDL, porém a paraoxonase não está presente em lipoproteínas de baixa densidade (LDL) ou em lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), indicando uma interação específica com HDL, talvez pela associação com apo A-I (Blatter et al, 1993). A estrutura da paraoxonase pode ser observada na figura 3.

Pelo fato da paraoxonase estar associada com lipoproteínas de alta densidade (HDL), e existir uma óbvia diferença das concentrações circulantes de HDL entre homens e mulheres; o HDL-colesterol é, em média 25% mais elevado em mulheres do que em homens. Os estrogênios tendem a elevar os níveis de HDL-colesterol enquanto os androgênios tendem a baixá-los. Isso também pode explicar níveis mais elevados de paraoxonase encontrados em mulheres do que em homens (Guyton, 1997).

Figura 3 - Representação esquemática da enzima paraoxonase, mostrando os sítios polimórficos, o segmento hidrofóbico N-terminal, a ponte dissulfeto e um resíduo sulfidril livre.

Fonte: La Du et al., 1993.

1.3.3 - Possíveis funções fisiológicas da paraoxonase

Qualquer discussão sobre as funções fisiológicas da paraoxonase está em estágio de especulação, e resultados mais atuais são necessários para uma confirmação experimental. O que é indiscutível é a importante atuação da paraoxonase no metabolismo de alguns xenobióticos, estes não encontrados na natureza (Hyde & Carmichael, 1991). Mas a questão mais difícil é: Qual é o substrato natural da paraoxonase?

Estudos em animais indicaram um aumento da atividade da HDL-paraoxonase após injeção intravenosa de endotoxina bacteriana, indicando a possibilidade dessa enzima hidrolisar os lipopolissacarídeos (LPS) constituintes da endotoxina (Bóg-Hansen et al, 1978).

Outros estudos mostraram que a paraoxonase pode fazer parte de um complexo HDL-tripanosoma lítico. O fator tripanolítico (TLF) é conhecido como uma subfração do HDL, tóxica para o *Trypanosoma brucei brucei* (Smith et al, 1995).

Pesquisas já comprovaram que o HDL reduz o acúmulo de peróxidos lipídicos de LDL por um mecanismo enzimático (Mackness et al, 1993). Estudos posteriores indicaram que a paraoxonase era um dos componentes do HDL responsável por esta atividade (Mackness et al, 1993). Assim, HDL pode proteger contra o desenvolvimento de aterosclerose tanto no transporte de colesterol quanto impedindo a oxidação de LDL, que se acredita ser um estágio essencial na aterogênese. Com isso, todas as enzimas associadas ao HDL, como a paraoxonase, poderiam estar envolvidas neste processo (Klimov et al, 1993). Porém, a atividade da paraoxonase é modulada por um polimorfismo genético que pode ser crucial para a atividade da paraoxonase na proteção contra o desenvolvimento da aterosclerose.

1.3.4 - A genética da paraoxonase sérica humana e a modulação de sua atividade

A paraoxonase pertence a uma família multigênica de enzimas com três genes, designados por PON1, PON2 e PON3. Todos possuem graus de similaridade marcantes, porém é a PON1, com 354 aminoácidos em sua seqüência gênica, que está associada com o metabolismo lipídico (Primo-Parma et al., 1996).

A paraoxonase (PON1) possui um polimorfismo genético, que em populações européias, segue um modelo de segregação mendeliano simples, determinado por dois alelos autossômicos, codominantes, seguindo os princípios de Hardy-Weinberg. Entretanto em algumas populações, esta distribuição é unimodal e não pode ser explicada pela equação de Hardy-Weinberg. A perda dos fenótipos de baixa atividade parece ser a responsável por este comportamento (Gelmacher et al, 1988; Mackness et al, 1996). Na figura 4, podemos observar a distribuição mundial dos fenótipos de baixa atividade metabólica da enzima paraoxonase.

As bases moleculares do polimorfismo da enzima paraoxonase, frente a estimulação por NaCl e hidrólise de compostos organofosforados, pode ser a substituição de um aminoácido na posição 192 (ou 191 quando a alanina é definida como resíduo N-terminal). A isoenzima A (baixa atividade) tem uma glutamina na posição 192 e a B (alta atividade) uma arginina na posição 192. Uma outra substituição na posição 55 (de leucina para metionina) parece não afetar o efeito do polimorfismo (Humbert et al, 1993; Adkins et al, 1993). Essas isoenzimas são resultantes da expressão de dois genes alelos localizados em um mesmo locus (q21-q22) no braço longo do cromossoma autossômico 7, que está muito próximo do gene para a fibrose cística. Estruturalmente, estas isoformas são glicoproteínas que possuem peso molecular de

aproximadamente 43KDa, com três cadeias de carboidrato por molécula, representando 15,8% de seu peso total (Furlong et al, 1993).

Existem algumas discrepâncias na nomenclatura deste polimorfismo. Adkins et al (1993) utiliza-se do A para designar o fenótipo de baixa atividade (glutamina na posição 192) e B para o fenótipo de alta atividade (arginina na posição 192), enquanto Humbert et al (1993) se utiliza de 192 Q (baixa atividade) e 192 R (alta atividade). Esta última nomenclatura e, segundo dados mais recentes (La Du, 1999), é a nomenclatura recomendada para o perfil genotípico da paraoxonase.

Diferenças marcantes na distribuição polimórfica da paraoxonase são observadas, em populações humanas, em função da origem étnica dos indivíduos. Observa-se que nas populações Européia (caucasianas) e Americana de origem caucasiana 45% pertence ao A (Q), 12% ao B (R) e o restante ao AB (QR), enquanto que nenhum polimorfismo foi encontrado em africanos, orientais e índios americanos (Szabó et al, 1991).

Estudos desenvolvidos por Davies et al (1996) exploraram o polimorfismo na atividade da paraoxonase e seu substrato, avaliando a eficiência catalítica da PON1 de uma forma substrato-dependente. Apesar da isoenzima B (ou PON1 192 R) ser mais ativa com alguns substratos como o paraoxon, outros substratos como o fenil acetato, não discriminam entre isoenzimas. Outros substratos como diazoxon e armas químicas como sarin e soman são hidrolisados mais rapidamente pela isoenzima A (ou PON1 192 Q). Isto poderia ter afetado a susceptibilidade ao sarin no envenenamento ocorrido em Tóquio, devido a poucos japoneses serem portadores da isoenzima A (PON1 192 Q) (Yamasaki et al, 1997). O polimorfismo dependente de substrato da paraoxonase pode ser observado na tabela 3.

Tabela 3 - O polimorfismo dependente de substrato da paraoxonase.

| Aloenzimas | Substratos |
|---|---|
| Aloenzima R é mais ativa com: | Paraoxon Metilparaoxon Clortion oxon EPN oxon Armin |
| Atividades similares entre as aloenzimas com: | Fenilacetato Clorpirifos oxon 2- Naftil acetato |
| Aloenzima Q é mais ativa com: | Diazoxon Sarin Soman Hidroperóxidos fosfolipídios |

Fonte: Mackness et al., 1998.

O polimorfismo genético também pode afetar a concentração plasmática da paraoxonase. Experimentos indicaram que a atividade sérica em indivíduos saudáveis está diretamente relacionada com a concentração da proteína ($r: 0,89; p < 0,001$); assim, indivíduos homocigotos RR têm maiores concentrações de PON1 que indivíduos homocigotos QQ e heterocigotos QR, níveis intermediários (Blatter-Garin et al, 1994).

1.4 - TABAGISMO: DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

O tabagismo é considerado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) a principal causa de morte evitável em todo o mundo. A OMS estima que um terço da população mundial adulta, isto é, 1 bilhão e 200 milhões de pessoas (entre as quais 200 milhões de mulheres), sejam fumantes. Só o Brasil, contribui com cerca de 30 milhões de fumantes, sendo que 12 milhões são mulheres (OPAS, 2002).

Pesquisas comprovam que aproximadamente 47% de toda a população masculina e 12% da população feminina no mundo fumam. Enquanto nos países em desenvolvimento os fumantes constituem 48% da população masculina e 7% da população feminina, nos países desenvolvidos a participação das mulheres mais do que triplica: 42% dos homens e 24% das mulheres têm o hábito de fumar. As pesquisas indicam também que as pessoas que começam a fumar na adolescência (como ocorre em mais de 70% dos casos) e continuam fumando por duas décadas ou mais morrem 20 a 25 anos mais cedo do que aquelas que nunca acenderam um cigarro (OPAS, 2002).

O total de mortes devido ao uso do tabaco atingiu a cifra de 4 milhões de mortes anuais, o que corresponde a mais de 10 mil mortes por dia. No Brasil, estimam-se 80.000 mortes anuais por doenças relacionadas ao tabagismo. Caso as atuais tendências mundiais de expansão do consumo do tabaco sejam mantidas, esses números aumentarão para 8,4 milhões de mortes anuais por volta do ano 2020, sendo metade delas indivíduos em idade produtiva (entre 35 e 69 anos) (WHO, 2001).

1.4.1- A toxicidade do tabaco

A extensão e a gravidade da epidemia do tabagismo estão ligadas à utilização do

cigarro industrial cujo fumo, pouco irritante, pode ser intensamente inalado, tendo por consequência absorção rápida de todos os produtos tóxicos. O fumo do tabaco é composto por uma fase gasosa (CO₂ CO HCN) e por uma fase particulada no qual mais de 4.000 substâncias já foram identificadas (Hoffmann, 1986).

Os principais agentes tóxicos do tabaco são o monóxido de carbono (CO), a nicotina, o alcatrão e os irritantes (Hoffmann, 1986).

O monóxido de carbono é o agente indutor da formação de carboxihemoglobina, que provoca uma hipóxia tissular. Desta forma, favorece o aparecimento de lesões endoteliais que podem originar aterosclerose. Pode originar também um aumento da adesividade e da agregação de plaquetas e uma diminuição da deformidade dos glóbulos vermelhos; esses fatores são responsáveis por uma hiperviscosidade sanguínea geradora de acidentes vasculares agudos (Hoffmann, 1986).

O fumo do tabaco contém muitas substâncias irritantes como acroleína, fenóis, peróxido de nitrogênio, ácido cianídrico, amoníaco, entre outros, que aumentam a produção do muco brônquico e diminuem, ao mesmo tempo, a sua eliminação reduzindo a motilidade dos cílios vibráteis; assim, se explica a tosse dos fumantes e o aumento da incidência das infecções respiratórias, podendo conduzir à bronquite crônica (Hoffmann, 1986).

O alcatrão é o principal responsável pela ação cancerígena do tabaco, sendo o alfabenzopireno a substância cancerígena mais estudada (FAD, 1997).

A nicotina, por sua ação simpaticomimética, é um dos fatores responsáveis pelas complicações vasculares. Ela é, sobretudo, o agente essencial da dependência (FAD, 1997).

1.4.2 – Farmacologia da nicotina

A nicotina é um alcalóide da família das nicotiaminas contida nas folhas de várias espécies de plantas, tais como as folhas do tabaco (ICGZC, 2003).

A absorção da nicotina pelo organismo, depende em parte do pH do fumo. Para o cachimbo, charuto e certos cigarros castanhos, o pH é alcalino; a nicotina, base fraca, é diretamente absorvida pelas mucosas bucal e nasal. Para os cigarros, o fumo tem um pH ácido e a nicotina é muito pouco absorvida pelas mucosas bucal e nasal. No entanto, este fumo (em virtude das técnicas de fabricação e da natureza do tabaco utilizado) é mais suave (“mais doce”), menos irritante e pode também ser facilmente inalado. Nos alvéolos pulmonares, a absorção da nicotina é muito rápida e provoca uma elevação aguda da nicotínia cuja amplitude depende do número de inalações, da intensidade da inalação e da retenção mais ou menos prolongada do fumo nos pulmões (ICGZC, 2003).

Em menos de 7 segundos, mais de 25% da nicotina absorvida fixa-se sobre os receptores cerebrais específicos. A chegada da nicotina ao cérebro é mais rápida após a inalação que após injeção intravenosa e o "shoot" de nicotina ligado ao consumo de cigarros é o elemento responsável pelos efeitos psico-ativos da nicotina e da indução muito precoce da dependência (ICGZC, 2003)

Por fixação sobre os receptores periféricos, a nicotina desencadeia um estímulo simpático responsável pelos efeitos cardiovasculares: aumento moderado e transitório de pressões arteriais sistólicas e diastólicas e da frequência cardíaca, diminuição do volume de ejeção sistólica, vasoconstrição arterial periférica durável. O relaxamento da musculatura esquelética e o aumento da atividade motora e das secreções do trato gastrintestinal estão ligados à atividade colinérgica da nicotina. A fixação sobre os

receptores cerebrais específicos explica as propriedades psico-ativas da nicotina: ação de euforia, estimulante, com aumento da vigília, do poder de concentração intelectual, da memória imediata. Em certos fumantes, um efeito tranquilizante e ansiolítico; noutros, comporta-se como um verdadeiro anti-depressor. Todas estas ações, constituem as bases da dependência psicológica (ICGZC, 2003).

Em certos fumantes aparece uma outra dependência física à nicotina. Logo que a nicotemia baixa para além de um certo nível, a sensação de necessidade, de falta, aparece como um impulso irresistível (compulsão) para repegar no cigarro. O fumante adapta o seu consumo para manter este nível, é o fenómeno de auto-nivelamento da nicotina. Esta necessidade física, ligada à baixa da nicotemia pode comparar-se com a hipoglicemia e à sensação de fome daí resultante (ICGZC, 2003).

1.4.3 – Conseqüências do tabagismo para a saúde

Embora o câncer de pulmão, enfisema pulmonar e doenças cardíacas sejam as doenças mais divulgadas como conseqüências do fumo, outros efeitos do cigarro podem causar graves problemas de saúde: (OPAS, 2002).

1. Perda de cabelo – O fumo debilita o sistema imunológico, deixando o corpo mais vulnerável a doenças como o lúpus eritomatoso, que provoca perda de cabelo, ulcerações da boca e exantemas no rosto, couro cabeludo e nas mãos (OPAS, 2002).

2. Cataratas – Os fumantes acusam uma incidência 40% maior de catarata, a perda de transparência do cristalino que bloqueia a luz e pode levar à cegueira (OPAS, 2002).

3. Formação de rugas – O fumo envelhece a pele prematuramente, removendo proteínas que lhe dão elasticidade, privando-a de vitamina A e restringindo a circulação do sangue. A pele do fumante é seca, áspera e enrugada, especialmente ao redor dos lábios e dos olhos (OPAS, 2002).

4. Perda de audição – Como o uso do fumo cria placas nas paredes dos vasos sanguíneos, reduzindo o fluxo de sangue para o interior do ouvido, o fumante pode perder a audição mais cedo que os não fumantes e é mais susceptível à perda de audição causada por infecções dos pavilhões auriculares ou ruído forte. O fumante tem três vezes mais probabilidade que os não fumantes de contrair infecções do labirinto que podem levar a outras complicações, tais como meningite e paralisia facial (OPAS, 2002).

5. Câncer da pele – O fumo, embora não cause melanoma (forma por vezes letal de câncer cutâneo), aumenta as probabilidades de morte por esta causa. Os fumantes apresentam um risco duas vezes maior de contrair câncer das células escamosas cutâneas (OPAS, 2002).

6. Deterioração dos dentes – O fumo interfere na química da boca, criando excesso de tártaro, amarelando os dentes e contribuindo para a sua deterioração. Os fumantes têm probabilidade uma vez e meia maior de perder os dentes (OPAS, 2002).

7. Enfisema – Além do câncer pulmonar, o uso do fumo causa enfisema, uma dilatação e ruptura dos alvéolos pulmonares que reduz a capacidade dos pulmões de receber oxigênio e expelir dióxido de carbono (OPAS, 2002).

8. Osteoporose – O monóxido de carbono e a fumaça do tabaco, aglutinam-se mais rapidamente com o sangue do que o oxigênio, reduzindo em até 15 % a capacidade do sangue do fumante de transportar oxigênio. Devido a isso, os órgãos do fumante perdem densidade, fraturam-se mais facilmente e levam até 80% mais tempo para se recuperar (OPAS, 2002).

9. Doenças Cardíacas – Uma a cada três mortes no mundo deve-se a causas cardiovasculares. As doenças cardiovasculares relacionadas com o tabagismo matam mais de 600.000 pessoas por ano nos países desenvolvidos. Fumar acelera os batimentos cardíacos, eleva a pressão sanguínea e aumenta o risco de hipertensão e obstrução das artérias, vindo com o tempo, a causar ataques cardíacos e derrame cerebral (OPAS, 2002).

10. Úlcera gástrica – Fumar reduz a resistência às bactérias que causam úlcera gástrica (*Helicobacter pilory*). Além disso, compromete a capacidade do estômago de neutralizar ácidos após uma refeição, deixando ao ácido atacar o revestimento estomacal. As úlceras dos fumantes são mais difíceis de tratar e têm mais probabilidade de ocorrer (OPAS, 2002).

11. Descoloração dos dedos – O alcatrão contido na fumaça do tabaco acumula-se nos dedos e nas unhas, deixando-as manchadas com um marrom amarelado (OPAS, 2002).

12. Câncer uterino e abortamento – Além de aumentar o risco de câncer cervical e uterino, o fumo cria problemas de fecundidade para mulheres, bem como complicações na gravidez e no parto. Fumar durante a gravidez aumenta o risco de bebês com peso

baixo e futuras conseqüências nocivas para a saúde. O abortamento é duas a três vezes mais comum em fumantes, o mesmo ocorrendo com as perdas fetais devidas à privação de oxigênio e as anormalidades da placenta induzidas pelo monóxido de carbono e pela nicotina. A síndrome de morte súbita do lactente também está associada com o uso do fumo. Ademais, fumar pode reduzir os níveis de estrogênio, causando menopausa prematura (OPAS, 2002).

13. Deformação dos espermatozóides – Fumar pode deformar os espermatozóides e danificar o seu DNA, fato que poderia causar abortamento ou defeitos congênitos. Alguns estudos mostraram que os homens que fumam têm maior risco gerar filhos sujeitos a contrair câncer. Fumar diminui a contagem de espermatozóides e reduz o fluxo de sangue para o pênis, o que pode causar impotência. A infertilidade é mais comum entre os fumantes (OPAS, 2002).

14. Psoríase – O fumante tem duas a três vezes mais chances de contrair psoríase, uma afecção inflamatória cutânea não contagiosa (OPAS, 2002). A psoríase é uma dermatose inflamatória crônica comum, que afeta até 1-2% das pessoas nos Estados Unidos. Indivíduos de todas as idades podem apresentar a doença, que pode, algumas vezes, estar associada com artrite, miopatia, enteropatia, cardiopatia ou síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (Robbins, 2000).

15. Doença de Buerger – Também chamada tromboangiíte obliterante, é uma inflamação das artérias, das veias e dos nervos das pernas, principalmente causando restrição do fluxo sanguíneo. Não tratada, a doença de Buerger pode resultar em

gangrena (necrose de tecidos do corpo) e amputação das áreas comprometidas (OPAS,2002).

16. Câncer – Já foi demonstrado que mais de 40 elementos contido no tabaco causam câncer. O fumante tem de 16 a 22 vezes mais probabilidades de contrair câncer pulmonar que os não fumantes. Segundo diversos estudos, quanto mais tempo uma pessoa fuma, maior o risco de contrair outras formas de câncer, inclusive cânceres de nariz (2 vezes), da língua, da boca, das glândulas salivares e da faringe (6 a 27 vezes), do esôfago (8 a 10 vezes), da laringe (10 a 18 vezes), do estômago (2 a 3 vezes), dos rins (5 vezes), da bexiga (3 vezes), do pênis (2 a 3 vezes), do pâncreas (2 a 5 vezes), do cólon e do reto (3 vezes) e do ânus (5 a 6 vezes) (OPAS, 2002).

1.5 - ATEROSCLEROSE

A aterosclerose contribui esmagadoramente para uma taxa de mortalidade – cerca de metade ou mais de todas as mortes - e morbidade, no mundo ocidental, que ultrapassa a de qualquer outra doença. Embora qualquer órgão ou tecido do corpo possa ser afetado, a doença aterosclerótica sintomática localiza-se mais freqüentemente nas artérias que suprem o coração, o cérebro, os rins, os membros inferiores e o intestino delgado. As principais conseqüências desta doença consistem em infarto do miocárdio (ataque cardíaco), infarto cerebral (acidente vascular cerebral) e aneurisma da aorta. Por conseguinte, os dados epidemiológicos da aterosclerose são expressos, em grande parte, em termos da incidência ou do número de mortes causadas por cardiopatia isquêmica (Robbins, 2000).

A prevalência e a gravidade da doença entre indivíduos e grupos, estão relacionadas com diversos fatores, alguns constitucionais e, portanto imutáveis, e outros adquiridos e potencialmente passíveis de controle. Os fatores de risco que predisõem a aterosclerose foram identificados através de diversos estudos e incluem fatores constitucionais como idade, sexo e genética, além de fatores potencialmente controláveis como hiperlipidemia, hipertensão, diabetes e, o tabagismo (Robbins, 2000).

Sabe-se, portanto que, dentre os principais fatores de risco associados ao tabagismo estão as doenças cardiovasculares, porém os mecanismos precisos responsáveis pelas propriedades aterogênicas do cigarro não são completamente conhecidos (Frei, 1991).

Não apenas o uso de cigarro constitui um dos mais potentes fatores de risco para aterosclerose, como também é um dos fatores que, quando reduzido ou eliminado, diminui claramente o risco de desenvolvimento da aterosclerose (Harrison, 1992). A combustão do cigarro gera uma ampla variedade de radicais livres e aldeídos que provocam um estresse oxidativo que pode contribuir para o desenvolvimento da aterosclerose (Frei, 1991).

Os radicais livres são espécies químicas que possuem um único elétron não-pareado em uma órbita externa. A energia criada por essa configuração instável é liberada através de reações com moléculas adjacentes, como substâncias químicas inorgânicas ou orgânicas – proteínas, lipídios, carboidratos – particularmente com moléculas essenciais das membranas e ácidos nucleicos. Além disso, os radicais livres desencadeiam reações autocatalíticas através das quais as moléculas que reagem com eles são convertidas em radicais livres e propagam a cadeia de lesão. Os radicais livres podem ser desencadeados dentro das células por diversos mecanismos como: absorção de energia radiante (como raios X e luz ultravioleta), metabolismo enzimático de

substâncias químicas exógenas ou drogas, reações de redução-oxidação que ocorrem durante processos metabólicos normais, entre outros (Robbins, 2000).

Na presença de oxigênio, os radicais livres podem causar peroxidação dos lipídios dentro das membranas plasmáticas e organelas. A lesão é desencadeada quando as ligações duplas em ácidos graxos insaturados dos lipídios das membranas são atacadas por radicais livres derivados do oxigênio, particularmente por OH. As interações lipídio-radical geram peróxidos, que são instáveis e reativos, e sobrevivem uma reação em cadeia autocatalítica (denominada propagação) que pode resultar em lesão extensa das membranas, organelas e células. Os radicais livres também promovem a oxidação das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos. A modificação oxidativa acentua a degradação de enzimas críticas pelo complexo proteossoma multicatalítico, gerando devastação em toda a célula (Robbins, 2000).

As células têm múltiplos mecanismos para remover os radicais livres e, desse modo, minorar a lesão. Os radicais livres são naturalmente instáveis e costumam decompor-se espontaneamente. O superóxido, por exemplo, é instável e decompõe-se espontaneamente. Contudo, há vários sistemas não enzimáticos e enzimáticos que contribuem para a inativação das reações de radicais livres como, principalmente, os antioxidantes que bloqueiam o desencadeamento da formação de radicais livres e detêm a lesão por radicais. São exemplos as vitaminas lipossolúvel E e A, bem como o ácido ascórbico e glutathione (Robbins, 2000), além das evidências sobre a atividade antioxidante da paraoxonase (Richard, 2000).

A aterosclerose é uma doença das artérias de calibres grande e médio, caracterizada pelo desenvolvimento de lesões gordurosas, denominadas placas ateromatosas, na superfície interna das paredes arteriais. Essas placas começam a surgir em consequência da deposição de diminutos cristais de colesterol na íntima e no

músculo liso subjacente. Com o decorrer do tempo, os cristais crescem e o tecido fibroso e músculo liso proliferam formando placas cada vez maiores (Guyton, 1997).

O fator mais importante no processo do desenvolvimento da aterosclerose consiste na presença de altas concentrações plasmáticas de colesterol na forma de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (Guyton, 1997). A lipoproteína é uma forma alterada de LDL que contém a porção apo B-100 da LDL ligada à apo A, uma grande molécula de glicoproteína apresentando elevado grau de homologia estrutural com o plasminogênio (uma importante proteína no processo da fibrinólise). A lipoproteína exerce efeitos aterogênicos potenciais, incluindo acúmulo de lipídios, modulação das células endoteliais, proliferação das células musculares lisas e controle da neovascularização da placa (Robbins, 2000).

O centro desta lipoproteína é constituído quase exclusivamente de colesterol esterificado lipossolúvel, enquanto a maior parte da superfície é composta de fosfolipídios e colesterol não-esterificado. Ambas essas substâncias de superfície possuem grupos prostéticos com carga elétrica, estabelecendo uma carga elétrica negativa sobre a superfície da lipoproteína, o que permite a sua solubilidade no plasma. Em um dos pólos existe uma única molécula grande de apoproteína B-100 (apo B-100), proteína que possui um sítio de reconhecimento para os receptores de lipoproteínas de baixa densidade existentes nas membranas celulares de praticamente todas as células do organismo. Dessa maneira, elas liberam colesterol e fosfolipídios para praticamente todas as células do organismo. A alteração da apoproteína B-100, leva à uma perda do reconhecimento dos receptores dos macrófagos, que não irão, portanto, metabolizá-los, levando a um acúmulo de lipoproteínas de baixa densidade, que são tóxicas para estas células. Os macrófagos podem ser vistos ao microscópio como células “esponjosas”,

que representam a manifestação visível da lesão aterosclerótica. Com a continuidade do processo, as lesões ateromatosas tendem a se expandir (Brown, 1990).

As lipoproteínas de alta densidade são menores e não apresentam apoproteína B-100, apresentando assim, um comportamento totalmente diferente das lipoproteínas de baixa densidade. Uma porção significativa das lipoproteínas de alta densidade contém um dos dois tipos de apoproteínas, apoproteína A-I (apo A-I) ou apoproteína A-II (apo A-II), situadas na superfície externa da lipoproteína. Essas proteínas apresentam, portanto, afinidades por receptores celulares diferentes das lipoproteínas de baixa densidade (Guyton, 1997).

Historicamente, estudos experimentais planejados para investigar diretamente as propriedades antiaterogênicas de apo A-I e as partículas do HDL têm sido limitadas a modelos *in vitro*, dada a limitada capacidade de realizar estudos invasivos no homem. A disponibilidade de camundongos transgênicos e outros animais têm fornecido modelos intactos do metabolismo de lipoproteínas e aterosclerose. Estudos de tais modelos têm proporcionado uma prova direta em mamíferos de que o nível plasmático elevado da apo A-I resulte em um aumento do HDL e na inibição da formação de lesões ateroscleróticas. Embora esses estudos demonstrem que a apo A-I tem efeito inibitório direto sobre o início e a progressão de lesões ateroscleróticas, não abordam quais efeitos os níveis elevados de HDL teriam sobre as lesões estabelecidas. Como os estudos clínicos e patológicos têm indicado que a prevenção secundária e até a primária de coronariopatia no homem mais provavelmente envolve a estabilização ou a regressão de placas coronarianas existentes, esta questão é da maior relevância clínica (Noto, 2001).

Os efeitos benéficos atribuídos ao HDL são, provavelmente, a habilidade de promover o efluxo de colesterol das paredes celulares das artérias e transportá-lo para o fígado para ser catabolizado (Guyton, 1997). Experimentos mais recentes sugerem uma

outra possibilidade, o fato do HDL atuar também na proteção contra a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (Parthasarathy et al, 1990).

Assim, o LDL - colesterol é conhecido como o “colesterol ruim” que, quando oxidado, tende a formar placas que bloqueiam os vasos sanguíneos, levando a ataques cardíacos e derrames. O fumo é conhecido por aumentar o risco de doenças cardiovasculares reduzindo os níveis de HDL-colesterol, conhecido como o “colesterol bom”, que funciona como um fator de proteção (UFAC, 2002).

1.5.1 - A atividade da paraoxonase na aterosclerose

A influência da paraoxonase e de seu polimorfismo em doenças cardiovasculares está relacionada com sua habilidade de metabolizar lipídios oxidados e prevenir sua formação. A oxidação de LDL, acredita-se ser o papel central na quimiotaxia de monócitos e diferenciação de macrófagos, que são eventos iniciais na progressão da aterosclerose. A paraoxonase, tanto previne a formação de LDL oxidados quanto inativa fosfolipídios oxidados, uma vez que formados (Noto, 2001).

A grande evidência da conexão entre a hidrólise de lipídios oxidados pela paraoxonase e susceptibilidade a aterosclerose veio de um estudo em camundongos (Shih, 1998), onde camundongos com ausência de PON1 apresentaram lesões ateroscleróticas significativamente maiores que àqueles com PON1 presente.

A atividade da paraoxonase já mostrou-se menor em indivíduos com diabetes mellitus insulino-dependentes e hipercolesterolemia familiar (FH) (Mackness et al, 1991 c), duas doenças que levam ao desenvolvimento de aterosclerose. Não é viável que a baixa atividade da paraoxonase nessas doenças é causada geneticamente, porque FH é uma doença monogênica que envolve uma mutação no receptor de LDL (Goldstein &

Brownl, 1977) e induz diabetes em ratos com streptozotocin causando um decréscimo progressivo da atividade da PON1 (Patel et al, 1990).

Estudos mais recentes (Abbott et al, 1995) mostraram que a baixa atividade da PON1 sérica nas diabetes mellitus insulino-dependente e não dependente não foi devido a diferenças no polimorfismo genético da PON1 comparadas com controles ou com um decréscimo na concentração da PON1 em diabéticos, mas sim devido a alterações na composição do HDL.

A atividade da PON1 também está reduzida em pacientes que sobreviveram a um infarto do miocárdio (McElveen et al,1986). Esta baixa atividade poderia ser uma conseqüência da doença cardíaca isquêmica e não um fator de predisposição. Porém, segundo estudos de Secchiero et al (1989), nenhuma alteração na atividade da PON1 é encontrada nos dias seguintes a um infarto agudo do miocárdio, sugerindo que qualquer decréscimo deve ocorrer antes do infarto. Sendo assim, resultados mais relevantes são necessários para o estudo do desenvolvimento da aterosclerose associada à atividade da PON1.

Mackness et al (1997 d) afirmam que a PON1 está presente no fluido intersticial humano associada com partículas de HDL, estando portanto, presente nas paredes das artérias; posição ideal para proteger contra a oxidação de LDL e, conseqüentemente, contra o desenvolvimento da aterosclerose.

1.5.2- A influência do polimorfismo da paraoxonase na aterosclerose

O maior interesse na atividade da paraoxonase, no contexto da aterosclerose, está no fato de a atividade desta enzima estar muito reduzida em indivíduos que tiveram infarto do miocárdio quando comparada com grupos controle (McElveen. Et al, 1987).

Estudos já confirmaram que o genótipo da PON1 está significativamente associado com variações da concentração plasmática de HDL, LDL, triglicerídeos totais e apo B (Hegele et al, 1995 a). Homozigotos (QQ) para a variação de baixa atividade da PON1 têm níveis plasmáticos de HDL, LDL, triglicerídeos e apo B menores que heterozigotos (QR) ou homozigotos para alta atividade (RR). Além disso, homozigotos para baixa atividade têm taxas maiores na relação colesterol / HDL colesterol, LDL / HDL e apo B / apo A, indicando menor proteção contra lipoproteínas aterogênicas que heterozigotos e homozigotos para alta atividade (Hegele et al, 1995 a).

A relação entre o polimorfismo da PON1 e a presença de doença cardiovascular está associada ao alelo R (alta atividade). Assim, genótipos QR e RR apresentam uma diferença muito mais marcante no desenvolvimento de ateroma do que o genótipo QQ (Hegele et al, 1995 a).

1.6- MODULAÇÃO DA ATIVIDADE DA PARAOXONASE POR DIETA, ESTILO DE VIDA E FATORES AMBIENTAIS

Em humanos, a atividade da paraoxonase sérica aumenta do nascimento até 15-25 meses de vida, quando alcança um nível que é determinado pelo polimorfismo da região regulatória 5', de fatores ambientais e genéticos individuais. No adulto, os níveis são estáveis e nenhuma alteração significativa tem sido observada com o aumento da idade (Playfer,1977). Porém, substâncias químicas ambientais, indutores enzimáticos, estados patológicos e fisiológicos, dieta e estilo de vida, têm demonstrado afetar significativamente a atividade enzimática da paraoxonase (Costa, 2003).

Fenobarbital, um clássico indutor enzimático, aumenta a atividade da paraoxonase e os níveis de RNAm no fígado de roedores, entretanto não foi encontrada alteração no soro (Hernandez, 1997; Kaliste-Korhonen, 1998).

Bário, zinco e mercúrio mostraram inibir a atividade da paraoxonase no fígado de ratos e em humanos, *in vitro* (Gonzalvo,1997).

A atividade da PON1 pode variar dependendo de condições fisiológicas ou patológicas. Por exemplo, a atividade sérica da PON1 decresce significativamente durante a gravidez (Geldmacher, 1988; Weitman, 1983). Baixa atividade tem sido encontrada em pacientes com doença renal (Hasselwander, 1998), na diabetes mellitus (Abbott, 1995; Mackness, 1998), em várias deficiências de HDL (Mackness, 1987), e cirrose hepática (Ferré, 2001).

Nas analfalipoproteinemias como “Olho de Peixe” (retinopatia) e “Doença de Tangier”, há um grande decréscimo ou ausência de níveis circulantes de HDL e da atividade da PON1. Essa redução pode simplesmente ser devido à ausência de HDL como o carreador para a PON1(Mackness et al, 1989).

Crianças com estenose pilórica têm níveis aumentados de atividade da PON1, que persistem até uma semana após a cirurgia corretiva quando a alimentação já está estabelecida (Szafran et al, 1997). Omura (1980) encontrou níveis significativamente menores da atividade da PON1 em 236 japoneses com uma variedade de doenças crônicas, e amiloidose sistêmica foi associada com baixa atividade da PON1 em outro estudo (Maury et al, 1984).

Dieta e estilo de vida também podem afetar a atividade da PON1. Etanol e outros álcoois têm mostrado serem inibidores da atividade da PON1, apesar de estudos, *in vitro*, comprovarem que o consumo moderado diariamente de álcool, aumenta a

atividade da paraoxonase sérica, sem distinção entre vinho tinto ou cerveja (Van der Gaag, 1999). Já

uma dieta rica em gordura, mostrou-se inibir a atividade da PON1 em camundongos (Shih, 1996; Hedrick, 2000).

O hábito de fumar é o principal fator contribuinte para o decréscimo da atividade da paraoxonase sérica. Experimentos *in vitro* mostraram inibição da atividade sérica da PON1 através de extratos de cigarro (Nishio, 1997).

1.7– A PARAOXONASE E O TABAGISMO

O estresse oxidativo é considerado o maior mecanismo patológico associado com o hábito de fumar, pelo processo de peroxidação lipídica. Muitos estudos têm demonstrado o aumento da susceptibilidade de oxidação de LDL e altos níveis de LDL em fumantes (Morrow et al, 1995; Heitzer, 1996); o que confere a hipótese de um importante mecanismo causal que associa o hábito de fumar com doenças vasculares e atividades reduzidas da paraoxonase (Ross, 1999).

LDL oxidados parecem inativar a atividade da paraoxonase através de interações entre o grupo sulfidrila da enzima e lipídios oxidados, que são formados durante a oxidação de LDL (Aviram et al., 1999). Neste aspecto, a atividade da paraoxonase (PON1) deve ser parcialmente inativada na presença do estresse oxidativo como, provavelmente, ocorre com os fumantes. Por outro lado, os extratos do tabaco parecem modificar os tióis livres da enzima de uma forma dose / tempo dependente (Nishio et al., 1997). Assim, a baixa atividade da PON1 em fumantes é provavelmente, devido a um aumento do estresse oxidativo, junto com uma inibição catalítica causada pelo extrato do cigarro.

Além disso, o fumo causa o estresse oxidativo não apenas através da produção de radicais reativos de oxigênio mas também pelo enfraquecimento dos mecanismos de defesa dos antioxidantes, como vitaminas C e E e a enzima paraoxonase.

Em 1997, um estudo *in vitro* (Nishio, 1997) mostrou que extratos de cigarro inibiram a atividade enzimática da paraoxonase, afirmando ainda mais a hipótese de que a inibição da paraoxonase, sendo esta um antioxidante, pode também contribuir para o aumento da oxidação de LDL em fumantes. Neste estudo, houve um decréscimo de 15% da atividade da paraoxonase após 15 minutos de exposição ao extrato de cigarro (1,000µL) e após 1 hora de exposição, 50% da atividade da paraoxonase foi perdida. Em 6 horas, já houve perda de 90% da atividade da enzima.

Em 1999, foi analisada a frequência de doenças cardíacas em grupos de fumantes, ex-fumantes e não fumantes (nunca fumaram), que se mostrou significativamente menor no grupo de não-fumantes. Também foram analisadas as atividades e concentrações da paraoxonase sérica, tendo fenilacetato e paraoxon como substratos. Com ambos os substratos, as atividades e concentrações enzimáticas foram menores no grupo dos fumantes. Os ex-fumantes tiveram valores intermediários entre os fumantes e o grupo dos que nunca fumaram. No grupo dos ex-fumantes, foi feita uma avaliação complementar em relação ao tempo que eles pararam de fumar., formando dois grupos: < 3 meses e de 3 a 24 meses sem fumar. Maiores atividades da paraoxonase foram encontradas no segundo grupo. Também foi constatado que os níveis da paraoxonase de ex-fumantes aumentam dramaticamente com o tempo, normalizando-se após dois anos de abstinência (Richard et al, 2000).

Estudos sugerem que alguns componentes do extrato do cigarro modificam tióis livres da paraoxonase na posição 283, levando à perda da atividade da paraoxonase. A paraoxonase contém três resíduos de cisteína (nas posições 41, 283 e 352) (Humbert et

al, 1993). Os resíduos de cisteína das posições 41 e 352 formam uma ponte de dissulfeto intramolecular e não estão no sítio ativo da enzima. Já a cisteína da posição 283, parece estar muito próxima do sítio ativo da enzima. Mutações (*in vitro*) neste sítio, mostraram que o para-hidromercuribenzenato (PCMB), inibidor da paraoxonase, modifica esse resíduo de cisteína (posição 283), bloqueando o sítio ativo da paraoxonase (Robert et al, 1995).

Muitas substâncias químicas presentes no extrato de cigarro têm sido estudadas. Neste mesmo trabalho de Nishio et al (1997) isolaram algumas substâncias, tais como nicotina (450mM), ácido palmítico (250mM), acroleína (55mM), acetonitrila (150mM) e acetaldeído (1M), com o objetivo de identificarem a natureza química do inibidor da paraoxonase. O acetaldeído mostrou-se inibindo a atividade da paraoxonase.

O estudo mais recente sobre a inibição da paraoxonase pelo fumo (Sentí, 2003) mostra uma interação significativa entre o fumo, a atividade física e a atividade da enzima paraoxonase. Nesta pesquisa, foram avaliados dois grupos divididos em fumantes e não fumantes e foi testada a hipótese de que o exercício físico regular modifica a relação entre o fumo e a atividade da paraoxonase, que se mostrou reduzida de acordo com a frequência do fumo e da atividade física.

Assim, apesar de muitas evidências sobre o efeito inibidor do cigarro sobre a atividade da enzima paraoxonase, os trabalhos são poucos e recentes e muita pesquisa ainda precisa ser realizada, principalmente entre indivíduos, aparentemente saudáveis ou que, pelo menos, não tiveram nenhum problema cardíaco, como é o caso desta pesquisa que realizamos.

2. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo principal, observar o comportamento da enzima paraoxonase em uma população de indivíduos fumantes e compará-lo com a atividade desta enzima em uma população de indivíduos que nunca fumaram.

Um outro objetivo deste trabalho seria realizar uma investigação sobre o perfil fenotípico das duas populações, já que são poucos os dados no Brasil sobre o perfil fenotípico desta enzima em populações brasileiras.

Assim, o presente trabalho tem como objetivos:

- Avaliar a influência do tabagismo na atividade da enzima paraoxonase;
- Verificar a existência ou não de inibição diferencial dos diferentes fenótipos da enzima paraoxonase devido ao tabagismo;
- Avaliar a distribuição fenotípica da paraoxonase da população estudada;
- Avaliar diferenças sexo-dependentes da atividade da enzima paraoxonase.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- REAGENTES

- Dietil - *p* – Nitrofenil – Fosfato (paraoxon), adquirido da sigma chemical company.
- Fenil acetato, adquirido da sigma chemical company.
- Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.2 – EQUIPAMENTOS

- Espectrofotômetro Shimadzu - UV-Visível 1601 A.
- Centrífuga Excelsa Baby II – modelo 206 R.
- Balança analítica Mettler – modelo AE200.
- Agitador magnético Thermolyne – modelo 37600 mixer.
- Micropipetas Eppendorf modelos 2-10 μ L , 10-100 μ L e 100-1000 μ L.
- Pipeta Gilson (1-5mL).

3.3 – GRUPOS DE INDIVÍDUOS

O estudo foi realizado em uma população humana da cidade de Vassouras, Rio de Janeiro, somando um total de 40 indivíduos, com idade variando de 19 a 44 anos.

Os 40 indivíduos foram divididos em 2 grupos: fumantes e não fumantes. O grupo dos fumantes foi formado por 20 indivíduos (10 mulheres e 10 homens), assim como o grupo dos não fumantes, formado por 20 indivíduos (10 mulheres e 10 homens).

3.4 – DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

Todos os indivíduos foram submetidos à um questionário, de acordo com as normas do Comitê de Ética, para que pudéssemos obter informações sobre idade, etnia, estado de saúde, uso de anticoncepcional, tabagismo; enfim, dados que poderiam influenciar na atividade da enzima paraoxonase.

3.5 – COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE SANGUE

As amostras de sangue foram coletadas em tubos Vacumtainer heparinizados. Estes foram centrifugados a 4000 RPM por 20 minutos, separando-se a fração plasmática da fração celular. As amostras de plasma foram armazenadas em tubos Eppendorf em alíquotas de cerca de 1 mL, no freezer (- 20° C), até o momento de serem utilizadas. A fração celular do sangue era descartada.

3.6 – DOSAGEM DAS ATIVIDADES DAS ENZIMAS PARAOXONASE E ARILESTERASE

3.6.1 – Dosagem da atividade da enzima arilesterase

A dosagem da atividade da enzima arilesterase foi realizada a partir do método de Lorentz et al (1979), modificado por Oliveira-Silva et al (1998), cujo meio reacional é composto por 2983 µL de tampão Tris-HCl 50mM pH 8,5; 2,5 µL de plasma sendo esta reação iniciada com 15 µL de fenil acetato 1,2 M diluído em DMSO. Esta atividade foi medida cineticamente por 2 minutos em λ : 270nm. Esta atividade foi expressa em n

moles de produto formado (fenol) por minuto por mL de plasma (nmoles fenol/ min/ mL de plasma).

3.6.2 - Dosagem da atividade da enzima paraoxonase

A determinação da atividade da enzima paraoxonase (tanto a basal quanto a estimulada por NaCl) foi realizada a partir do método de Eckerson et al (1983 a, 1983 b), modificado por Moraes (1997). Sendo a atividade desta expressa em μ moles de *p*-nitrofenol/min/mL de plasma.

3.6.2.1- Dosagem da atividade basal da enzima paraoxonase

O meio reacional foi composto por 900 μ L de tampão glicina 60mM CaCl₂ 1,2mM pH 10,5, 50 μ L de paraoxon 40mM (tampão glicina e metanol) e 50 μ L de plasma humano fresco. A leitura da amostra (produto formado, *p*-Nitrofenol) foi realizada cineticamente por 2 minutos com comprimento de onda de 410nm.

3.6.2.2- Dosagem da atividade da enzima paraoxonase estimulada por cloreto de sódio (NaCl)

Para a atividade estimulada por sal, o meio foi composto por 400 μ L de tampão glicina 60mM CaCl₂ 1,2mM pH 10,5, 500 μ L de NaCl 2M (solução preparada em tampão glicina 60mM CaCl₂ 1,2mM pH 10,5) e 50 μ L de plasma humano fresco. Ambas as reações foram iniciadas pela adição de 50 μ L de paraoxon 40mM (em uma solução 50% tampão glicina 60mM CaCl₂ 1,2mM pH 10,5 e 50% metanol). A

determinação desta atividade se deu através da medida cinética, por 2 minutos, do produto formado (*p*-Nitrofenol), analisando-a espectrofotometricamente em comprimento de onda de 410 nm.

3.7 – DETERMINAÇÃO DOS FENÓTIPOS DA ENZIMA PARAOXONASE NA POPULAÇÃO ESTUDADA

A determinação dos fenótipos foi caracterizada utilizando-se a metodologia proposta por Eckerson et al.(1983 a e 1983 b), se baseando em uma distribuição trimodal (fenótipos QQ, QR, RR), no qual os principais parâmetros determinantes são a atividade da enzima paraoxonase estimulada por NaCl e a atividade da enzima arilesterase. Onde consideraremos indivíduos QQ (baixa atividade) os que apresentarem o valor desta razão < 14, QR (atividade intermediária) os que apresentarem valores compreendidos entre 14 e 38 e RR (alta atividade) os que apresentarem valores > ou igual a 38. Assim:

$$\frac{\text{Pox (NaCl)}}{\text{Ariesterase}} = \text{Fenótipo}$$

Legenda: Pox (NaCl) = Atividade Paraoxonásica estimulada por NaCl; Ariesterase = Atividade arilesterásica; Fenótipo = Fenótipo obtido, onde cada fenótipo tem a sua faixa de valor.

3.8 – BANCO DE DADOS, CÁLCULOS ESTATÍSTICOS E GRÁFICOS

Para a confecção do banco de dados, foi utilizado o programa Access 97 da Microsoft.

Os cálculos estatísticos e elaboração dos gráficos foram realizados no programa Sigma Plot 3.0, SPSS 11 e EXCEL 97.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- CONSIDERAÇÕES

Já é conhecido que o cigarro tem uma grande quantidade de agentes oxidantes que promovem efeitos deletérios no sangue e tecidos que, provavelmente, contribuem para o aumento da incidência de doenças cardiovasculares presentes nos fumantes.

As informações disponíveis sobre os mecanismos moleculares de ação do cigarro são limitadas, porém recentes observações sugerem que o efeito oxidante do cigarro está, em parte, relacionado com a inibição da atividade da enzima paraoxonase causada pelos constituintes do cigarro.

Como já descrito neste trabalho, os níveis de atividade da paraoxonase sérica podem ser influenciados por muitos fatores como estados fisiológicos e patológicos, atividade física, sexo, uso de anticoncepcional, tabagismo, e o próprio polimorfismo da enzima. Portanto, nesta tese foram obtidas informações, através de questionário, a respeito dos dados pessoais como sexo, informações relacionadas com o estado de saúde dos participantes e, principalmente, dados relacionados com o hábito de fumar, que é o foco desta pesquisa. Além destes fatores, também foi questionada a etnia dos participantes, com o objetivo de correlacionar e caracterizar a distribuição fenotípica da enzima paraoxonase.

Com estas avaliações, um banco de dados foi confeccionado e a partir dele foi possível correlacionar as variáveis epidemiológicas e clínicas dos grupos de fumantes e não fumantes (nunca fumaram) com os dados obtidos a partir da dosagem das atividades enzimáticas da paraoxonase basal, arilesterase e paraoxonase estimulada por NaCl.

Abaixo, seguem os resultados obtidos nesta dissertação, que foram realizados da seguinte maneira: em uma primeira etapa efetuamos uma análise descritiva e de comparação de alguns dados em ambas as populações: fumantes e não fumantes e as correlações entre as diversas variáveis; e em uma segunda etapa a distribuição dos fenótipos da enzima paraoxonase foi obtida.

4.2- ANÁLISES DESCRITIVAS

4.2.1- Distribuição dos sexos na população em estudo

Como podemos observar na figura 5, a distribuição dos sexos se deu da seguinte forma: 50% era composta de homens e 50% de mulheres.

O grupo das mulheres foi dividido em mulheres fumantes (50%) e mulheres não fumantes (50%). A mesma divisão foi obtida no grupo dos homens.

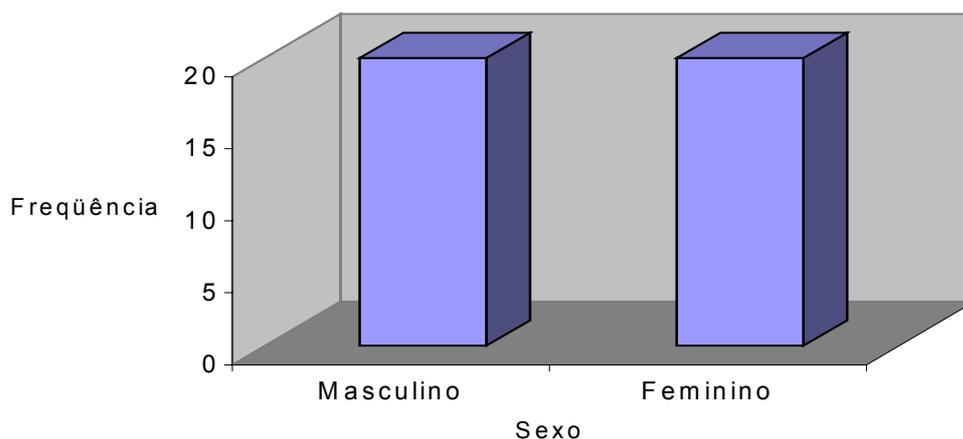


Figura 5 -Distribuição dos sexos da população estudada.

4.2.2- Distribuição da idade na população em estudo

Embora a idade, de adultos, não influencie na atividade da enzima paraoxonase, a distribuição foi realizada apresentando uma distribuição normal no teste de Kolmogorov-Smirnov com significância superior a 5%, apresentando média de 24,09 anos para a população total, de 26,13 anos para fumantes e de 22,05 anos para não fumantes, como observamos nas figuras 6, 7 e 8.

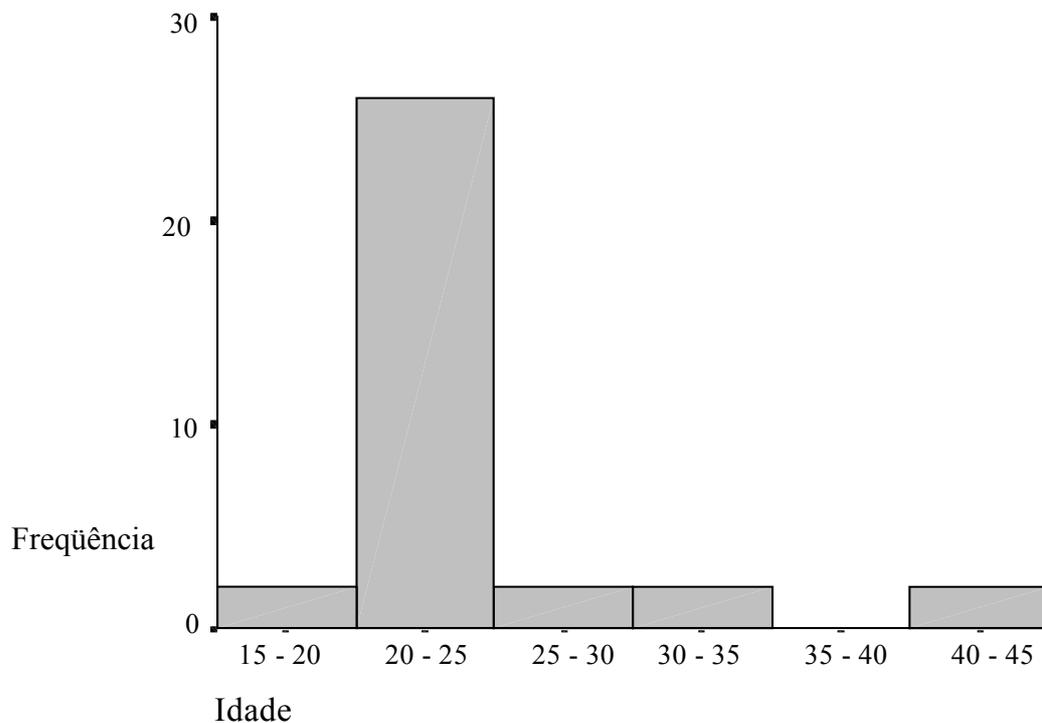


Figura 6 - Distribuição da idade da população total estudada.

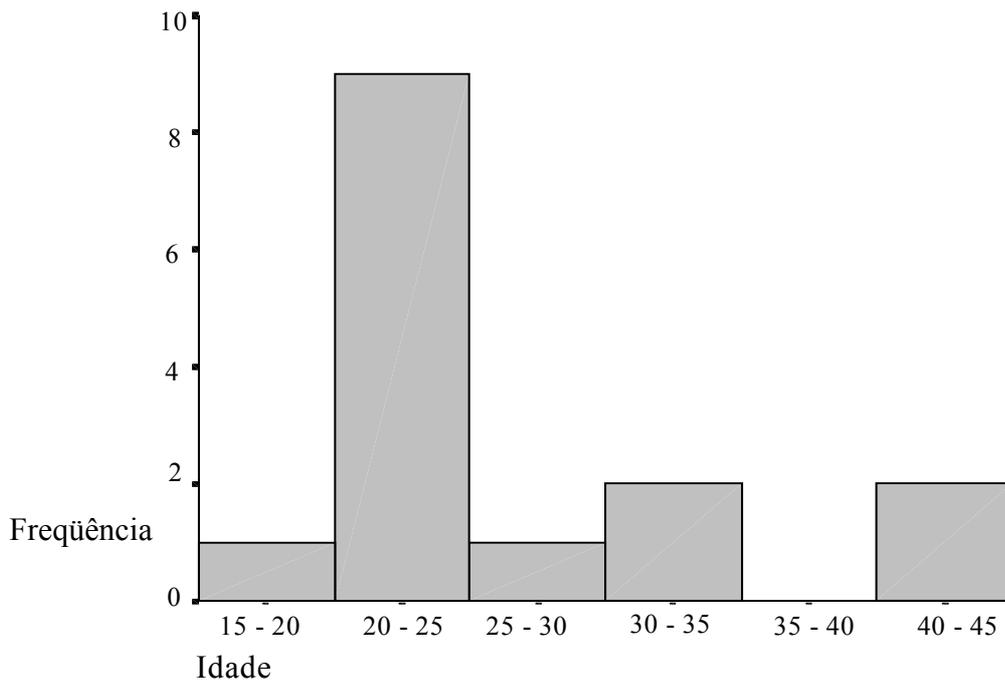


Figura 7 - Distribuição da idade do grupo de fumantes da população estudada.

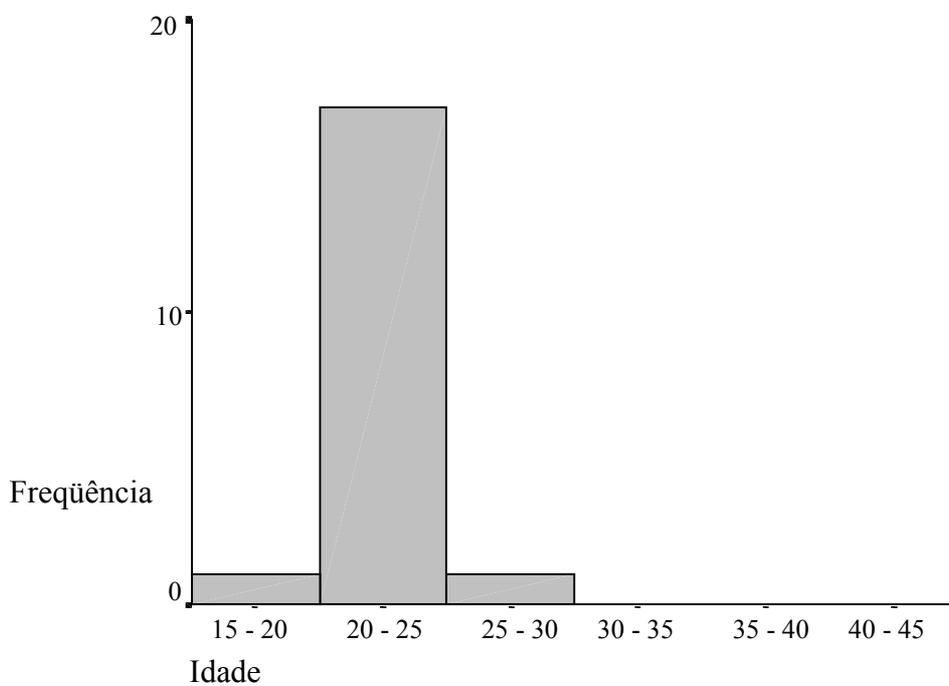


Figura 8 - Distribuição da idade do grupo de não fumantes da população estudada.

4.2.3- Análise descritiva da atividade basal e estimulada por NaCl da enzima paraoxonase

Neste tópico analisaremos descritivamente a atividade da enzima paraoxonase (basal e estimulada por sal) nos diversos grupos organizados nesta pesquisa. Esta análise é de grande importância, principalmente porque, além de evidenciarmos se há algum tipo de inibição da atividade desta enzima no grupo de fumantes, este tipo de análise em populações brasileiras, só foi realizado uma única vez por Oliveira-Silva (2000) e em populações expostas a pesticidas organofosforados, ou seja é inédito, no Brasil, a análise com grupos de fumantes.

4.2.3.1- Atividade basal da enzima paraoxonase

Em termos da média da atividade desta enzima, expressa em μ moles de *p*-nitrofenol /min /mL de plasma, podemos observar dados importantes:

A média da atividade da paraoxonase basal se mostrou superior no grupo dos não fumantes quando comparamos com a média da atividade desta no grupo dos fumantes; o que sustenta a hipótese de que a atividade da enzima paraoxonase pode estar sendo inibida pelo tabagismo. A diferença estatística estava na fronteira da significância, segundo o teste t de Student com significância superior a 5%, e isto pode ser explicado pela influência das mulheres fumantes, que tiveram uma atividade alta da paraoxonase, principalmente devido ao grande número de mulheres fumantes fazerem uso de anticoncepcional.

Como discutido anteriormente nesta pesquisa, a atividade da paraoxonase pode sofrer influência de muitos fatores, que podem atuar inibindo ou estimulando a sua

atividade. Os estrogênios, comprovadamente (Guyton, 1997), aumentam os níveis de HDL-colesterol e, por conseqüência, aumentam os níveis da paraoxonase sérica.

Os homens não fumantes apresentaram uma média de atividade da paraoxonase basal superior à média desta nos homens fumantes, e com uma diferença estatística significativa, segundo o teste t de Student. Isto sustenta ainda mais os indícios da interferência do tabagismo.

Estes resultados já eram esperados e estão de acordo com a literatura, como observamos nos estudos de Richard et al. (2000), onde a atividade da paraoxonase se mostrou significativamente reduzida na população de fumantes quando comparada com a população de não fumantes. O mesmo resultado observamos em um estudo mais recente de Sentí (2003).

Em relação ao grupo das mulheres, as mulheres fumantes apresentaram uma média da atividade da enzima paraoxonase basal superior à média desta para as mulheres não fumantes, apesar de não representar nenhuma diferença estatística entre os grupos, pelo teste t de Student.

Esse resultado obtido em relação à média da atividade da paraoxonase basal ser maior no grupo das mulheres fumantes quando comparadas com as mulheres não fumantes não é surpreendente, até porque a maioria dos estudos já realizados, só incluem um grupo geral de fumantes, não distinguindo os sexos.

Acreditamos que o fato das mulheres fumantes terem apresentado uma atividade da paraoxonase superior à do grupo das mulheres não fumantes se deve, mais uma vez, à influência do uso de estrogênio na atividade da enzima paraoxonase no grupo das mulheres fumantes, já que 64% das mulheres fumantes faziam uso de anticoncepcional, cerca de três vezes a freqüência das mulheres não fumantes.

Estes dados também estão de acordo com Wassmann et al, (2001), que têm sugerido que o estrogênio tem alta capacidade antioxidante e, conseqüentemente, tem capacidade de prevenir contra a produção de radicais livres vasculares, estando as mulheres mais “protegidas”, o que explicaria o menor número de distúrbios hemodinâmicos, ligados ao tabagismo, em mulheres.

Assim, o ideal é que novos estudos sobre a influência do tabagismo sejam realizados, incluindo também um estudo mais detalhado sobre a influência dos estrogênios na atividade da paraoxonase, para garantirmos que o efeito do tabagismo seja independente.

Os resultados que obtivemos, comparando o grupo geral de homens com o de mulheres, estão de acordo com estes dados. As mulheres (fumantes e não fumantes) apresentaram uma média da atividade da enzima paraoxonase basal significativamente superior à média da atividade da mesma nos homens (fumantes e não fumantes); o que pode ser explicado pelas diferenças hormonais entre os sexos.

Este fato afirma ainda mais a suspeita de uma relação sexo-dependente, onde levamos em consideração, principalmente, as diferenças hormonais e os níveis de HDL.

Tabela 4 - Análise descritiva da atividade basal da enzima paraoxonase da população em estudo, com n= 40.

| Análise descritiva da atividade da enzima paraoxonase (μ moles de <i>p</i> -nitrofenol/min/mL de plasma) | Média | Desvio padrão | Mínimo | Máximo |
|---|--------|---------------|--------|--------|
| População Total | 174,25 | 63,28 | 60 | 310 |
| Fumantes | 171,05 | 70,78 | 60 | 310 |
| Não Fumantes | 177,14 | 57,28 | 80 | 260 |
| Homens | 159,05 | 58,81 | 60 | 280 |
| Mulheres | 191,05 | 65,31 | 90 | 310 |
| Homens Fumantes | 151,00 | 63,50 | 60 | 280 |
| Homens Não Fumantes | 166,36 | 56,26 | 80 | 260 |
| Mulheres Fumantes | 193,33 | 75,33 | 90 | 310 |
| Mulheres Não Fumantes | 189,00 | 58,96 | 100 | 260 |

4.2.3.2- Atividade da enzima paraoxonase estimulada por NaCl

Pelo fato da enzima paraoxonase basal e estimulada por NaCl serem, na verdade, a mesma enzima, diferenciando-se apenas a sua estimulação ou não por NaCl, esperava-se obter os mesmos resultados que obtivemos com a paraoxonase basal. Porém, a atividade da paraoxonase estimulada por sal parece não ser tão afetada pelo tabagismo quanto à sua atividade basal.

Quase todas as médias obtidas com a atividade da paraoxonase estimulada por NaCl, expressa em μ moles de *p*-nitrofenol/min/mL de plasma, foram compatíveis com as médias obtidas com a atividade basal da paraoxonase, com exceção da média da atividade da paraoxonase estimulada por NaCl que se mostrou um pouco superior no grupo dos fumantes quando comparados com o grupo dos não fumantes, mas não estatisticamente diferente quando comparamos com o teste t de Student. O que podemos pensar, além da influência das mulheres fumantes que fazem uso de anticoncepcional, é que o grau de estímulo da paraoxonase pode ter sido influenciado pelos diferentes fenótipos, já que esta enzima, junto com a arilesterase é de fundamental importância para a análise fenotípica da população.

A atividade da paraoxonase estimulada por NaCl apresentou significativa diferença estatística, assim como com sua atividade basal, quando comparamos o grupo de homens (fumantes e não fumantes) com o grupo de mulheres (fumantes e não fumantes), apresentando $T = -1,70$ e $p < 0,05$.

O que se pode afirmar é que a paraoxonase sérica está associada com lipoproteínas de alta densidade - HDL (Mutch, 1992) e que existe uma óbvia diferença das concentrações circulantes de HDL entre homens e mulheres, estas apresentando níveis de HDL cerca de 25% mais elevado do que em homens (Guyton, 1997) e isto, conseqüentemente, influencia nos níveis de paraoxonase.

Entre o grupo dos homens fumantes comparados com o grupo dos homens não fumantes, observamos uma tendência na média de atividade da paraoxonase estimulada por NaCl que se mostrou superior no grupo dos homens não fumantes, apesar de não apresentar diferença estatística no teste t de Student.

Com o grupo de mulheres fumantes, mais uma vez, observamos uma diferença estatística, tendo uma atividade maior no grupo das mulheres fumantes. É claro que isto

pode ser explicado pelo uso de anticoncepcional por 64% das mulheres fumantes, sendo que apenas 20% das mulheres não fumantes faziam uso de anticoncepcional.

Tabela 5 - Análise descritiva da atividade da enzima paraoxonase estimulada por NaCl da população estudada, com n=40.

| Análise descritiva da atividade da enzima paraoxonase estimulada por NaCl (μ moles de <i>p</i> -nitrofenol/min/mL de plasma) | Média | Desvio padrão | Mínimo | Máximo |
|---|--------|---------------|--------|--------|
| População Total | 373,25 | 208,72 | 90 | 900 |
| Fumantes | 375,26 | 220,77 | 90 | 870 |
| Não Fumantes | 371,43 | 202,69 | 100 | 900 |
| Homens | 320,00 | 209,83 | 90 | 900 |
| Mulheres | 432,11 | 196,23 | 130 | 870 |
| Homens Fumantes | 310,00 | 182,39 | 90 | 630 |
| Homens Não Fumantes | 329,09 | 240,68 | 100 | 900 |
| Mulheres Fumantes | 447,78 | 246,97 | 130 | 870 |
| Mulheres Não Fumantes | 418,00 | 149,43 | 140 | 640 |

4.2.4 – Análise descritiva da atividade da enzima arilesterase

Esta é uma análise importante para este trabalho, pois o conhecimento do comportamento estatístico desta enzima é de fundamental importância já que a atividade

desta se faz necessária para a caracterização dos diferentes fenótipos da enzima paraoxonase, além do fato desta enzima ser uma esterase de comportamento catalítico semelhante ao da paraoxonase, sendo inclusive considerada por alguns autores (Adkins et al., 1993; Mackness et al., 1996) apenas mais uma atividade da enzima paraoxonase.

4.2.4.1- Atividade da enzima arilesterase

O fato da enzima arilesterase possuir sua atividade ligada à da enzima paraoxonase, explica o fato de observarmos a maioria dos resultados compatíveis com os que obtivemos ao analisarmos as médias da atividade basal da enzima paraoxonase.

Os não fumantes apresentaram uma atividade maior da arilesterase quando comparados com o grupo dos fumantes; o mesmo ocorreu quando comparamos as médias entre o grupo de homens fumantes e homens não fumantes, estes apresentando média, tendenciosa, superior; o que reafirma a hipótese do fumo estar inibindo a atividade da paraoxonase e, conseqüentemente, da arilesterase.

O grupo de mulheres fumantes apresentou uma média inferior à do grupo de mulheres não fumantes, apesar de estatisticamente, através do teste t de Student, não serem diferentes ($p > 0,05$).

Surpreendentemente, a média da atividade da enzima arilesterase, se mostrou significativamente superior no grupo dos homens (fumantes e não fumantes) quando comparada ao grupo das mulheres (fumantes e não fumantes). A atividade da arilesterase entre os grupos de homens e mulheres apresentou, através do teste t de Student, uma diferença estatística com $T= 2,23$ e $p < 0,05$.

Enfim, a atividade enzimática da arilesterase também foi comparada com todos os grupos, através do teste t de Student, para observarmos se há similaridade estatística

entre eles e se existe alguma tendência de inibição da atividade entre os diferentes grupos.

Quando comparamos a atividade da enzima arilesterase de fumantes com o grupo de não fumantes, observamos que os grupos são diferentes estatisticamente, com $T = 10,74$ e $p < 0,05$.

Tabela 6- Análise descritiva da atividade da enzima arilesterase da população estudada, com n=40.

| Análise descritiva da atividade da enzima arilesterase (nmoles de fenol/min/mL de plasma) | Média | Desvio padrão | Mínimo | Máximo |
|---|-------|---------------|--------|--------|
| População Total | 5,02 | 1,75 | 2,40 | 9,20 |
| Fumantes | 4,74 | 1,60 | 2,40 | 8,00 |
| Não Fumantes | 5,28 | 1,87 | 2,80 | 9,20 |
| Homens | 5,58 | 1,88 | 2,80 | 9,20 |
| Mulheres | 4,40 | 1,39 | 2,40 | 7,20 |
| Homens Fumantes | 5,20 | 1,63 | 2,80 | 8,00 |
| Homens Não Fumantes | 5,93 | 2,10 | 3,20 | 9,20 |
| Mulheres Fumantes | 4,22 | 1,48 | 2,40 | 6,40 |
| Mulheres Não Fumantes | 4,56 | 1,35 | 2,80 | 7,20 |

4.3 - DISTRIBUIÇÃO FENOTÍPICA

Uma análise entre os fenótipos, as atividades enzimáticas e dados epidemiológicos, foi realizada a fim de se visualizar o comportamento da enzima paraoxonase em uma população de fumantes e de não fumantes e também coletar dados preliminares a respeito de um possível papel protetor desta enzima frente à oxidação de lipoproteínas.

Cabe ressaltar que a análise dos fenótipos foi realizada com os 40 indivíduos, e envolveu as seguintes variáveis: atividades da paraoxonase (basal e estimulada por NaCl); atividade da arilesterase; fenótipo trimodal (razão da atividade da paraoxonase estimulada por NaCl sobre a atividade da enzima arilesterase, sendo QQ o fenótipo de baixa atividade, QR o fenótipo de atividade intermediária e RR o fenótipo de alta atividade hidrolítica).

Como discutimos anteriormente, o polimorfismo genético pode afetar a concentração plasmática da paraoxonase. Segundo experimentos de Blatter-Garin et al (1994), a atividade sérica da paraoxonase em indivíduos saudáveis está diretamente relacionada com a sua concentração ($r: 0,89; p < 0,001$); assim, indivíduos homozigotos RR têm maiores concentrações de PON1 que indivíduos homozigotos QQ e heterozigotos QR, apresentam níveis intermediários.

Como mostrado na figura 4, a distribuição mundial dos fenótipos de baixa atividade da enzima paraoxonase é muito variada, apresentando uma maior frequência entre os caucasianos (52%) (Mackness et al., 1996).

No Brasil, não existem muitos dados que possam subsidiar uma investigação sobre o perfil fenotípico da paraoxonase em populações brasileiras. Os únicos dados disponíveis foram obtidos por Oliveira-Silva et al. (2000), em uma população do Rio de

Janeiro, exposta e não exposta a pesticidas organofosforados, obtendo o seguinte perfil fenotípico: indivíduos expostos a organofosforados apresentaram um perfil fenotípico de 44% QQ, 52% QR e 4% RR, enquanto 36% dos indivíduos não expostos apresentaram o fenótipo QQ, 52% apresentaram o fenótipo QR e 12% o fenótipo RR.

De acordo com a etnia dos participantes desta pesquisa, esperava-se obter um perfil fenotípico compatível com os dados de Oliveira-Silva et al. (2000), o que não aconteceu. Porém, analisando os perfis fenotípicos dos indivíduos deste estudo, podemos afirmar que, apesar de não estarem de acordo com o perfil fenotípico esperado para a população do Rio de Janeiro, estão compatíveis com as atividades da paraoxonase obtidas nesta pesquisa. Devemos ainda levar em consideração que, mesmo sendo uma população branca, no Brasil existe um alto grau de miscigenação, o que poderia explicar uma distribuição fenotípica não compatível com os caucasianos, além disso o número de amostragem não é suficiente para afirmarmos, com segurança, qualquer conclusão a este respeito.

Os resultados que obtivemos estão apresentados na tabela 7. 77,5% da população total apresentaram um fenótipo RR, de alta atividade da paraoxonase. Estes dados só não foram surpreendentes porque explicam os níveis de atividade de paraoxonase ainda relativamente altos nos grupos de fumantes. Como a distribuição dos fenótipos se deu de forma normal para todos os grupos, os fenótipos não interferiram nas análises de atividade enzimática, favorecendo a influência do tabagismo como um fator independente.

Assim, os fenótipos não mascaram a inibição de atividade observada no grupo dos fumantes, apesar de 89,4% serem homozigotos para alta atividade, comparados com 71,4% RR, pertencentes ao grupo dos não fumantes. Este fato reafirma mais ainda a possível interferência do tabagismo na redução da atividade da paraoxonase, já que o

grupo dos fumantes, apesar do grande número de indivíduos com fenótipo RR, apresentou níveis mais baixos tanto nas análises de atividade da paraoxonase basal quanto nas análises de atividade da enzima arilesterase, esta mostrando uma diferença estatística significativa.

O mesmo pudemos observar quando comparamos as atividades enzimáticas entre homens fumantes e homens não fumantes. Apesar do 1º grupo (homens fumantes) apresentar 80% dos indivíduos RR contra apenas 54,5% RR dos indivíduos não fumantes, em todas as análises enzimáticas (paraoxonase basal e estimulada por NaCl e arilesterase) foram observados níveis reduzidos de atividade enzimática no grupo dos homens fumantes.

No caso do grupo das mulheres, o fenótipo não teve diferença estatística entre o grupo de fumantes, com 88,8% RR e o grupo de não fumantes, com 90% RR. Neste caso, insistimos ainda na provável interferência do uso de anticoncepcional por 64% das mulheres fumantes.

Ao compararmos o grupo de mulheres (fumantes e não fumantes) com o grupo de homens (fumantes e não fumantes), observamos que o fator principal que influenciou os níveis significativamente mais altos obtidos em mulheres, com exceção da atividade da arilesterase, foram as diferenças sexo-dependentes, principalmente os níveis de HDL que, em mulheres estão 25% mais elevados; além do uso extensivo de anticoncepcional por parte das mulheres fumantes. Assim, a influência dos níveis mais elevados de HDL em mulheres e a interferência dos estrogênios (anticoncepcional) teriam um papel mais significativo que os 89,4% de mulheres RR, comparados com os 66,6% de homens RR.

Como os estudos sobre o perfil fenotípico da paraoxonase são escassos no Brasil, mais estudos precisam ser realizados, principalmente com grupos de fumantes que, até o presente momento, nunca tinha sido realizado.

Tabela 7- Distribuição dos fenótipos da população em estudo (n=40) da cidade de Vassouras, Rio de Janeiro.

| Distribuição fenotípica da população em estudo da cidade de Vassouras, Rio de Janeiro | QQ (baixa atividade) | QR (atividade intermediária) | RR (alta atividade) |
|---|-------------------------|---------------------------------|------------------------|
| População Total | 2,5% | 20% | 77,5% |
| Fumantes | 0% | 10,6% | 89,4% |
| Não Fumantes | 4,8% | 23,8% | 71,4% |
| Homens | 4,8% | 28,6% | 66,6% |
| Mulheres | 0% | 10,6% | 89,4% |
| Homens Fumantes | 0% | 20% | 80% |
| Homens Não Fumantes | 9,2% | 36,3% | 54,5% |
| Mulheres Fumantes | 0% | 11,2% | 88,8% |
| Mulheres Não Fumantes | 0% | 10% | 90% |

5 - CONCLUSÃO

Muitos artigos mostraram que o fumo está firmemente estabelecido como um fator de risco primário para a aterosclerose. Fortes argumentos indicam uma função antioxidante da paraoxonase (Mackness et al., 1991 & Aviram et al., 1998) , que pode representar um potencial antiaterogênico de particular importância.

Os resultados apresentados na presente pesquisa, sugerem existir uma influência do tabagismo na atividade da enzima paraoxonase, porém propor qualquer conclusão a este respeito seria, no mínimo, precipitado.

O que podemos afirmar é que os resultados foram sugestivos de que a hipótese da modificação da atividade da paraoxonase sérica pode ser mais um mecanismo pelo qual o tabagismo acelera o processo aterogênico e, portanto, mais pesquisas precisam ser realizadas neste sentido.

Os níveis de HDL também fazem uma contribuição significativa para as variações dos níveis de atividade da paraoxonase. Assim, estudos com análise dos níveis de HDL devem ser realizados para estabelecermos resultados mais consistentes a respeito das diferenças sexuais e da independente influência do tabagismo.

Uma outra observação importante é a influência do uso de anticoncepcional, pois esta mascara o efeito do cigarro sobre a atividade da paraoxonase mas não diminui os malefícios do fumo. Portanto, seria importante um estudo bem detalhado sobre a influência dos hormônios na atividade desta enzima.

Observamos também que o efeito do fumo pode ser mais evidenciado entre os homens, o que poderia explicar o maior número de distúrbios hemodinâmicos, ligados ao fumo, em homens do que em mulheres.

Com relação aos dados obtidos através da análise dos fenótipos, mais estudos precisam ser realizados e com uma amostragem mais significativa.

No decorrer deste trabalho mostramos os benefícios que níveis altos de atividade da paraoxonase podem trazer, principalmente pelo seu efeito antioxidante. Apesar dos resultados do presente estudo precisarem ser mais trabalhados, com uma dosagem paralela de HDL, análise genotípica e um número maior de indivíduos fumantes e não fumantes, uma contribuição desta pesquisa é indiscutível: conseguimos mostrar um fator importante, como a proteção da paraoxonase para o metabolismo lipídico, que contribui como mais um benefício importante para a população parar de fumar.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, C.A.; MACKNESS, M.I.; KUMAR, S.; et al., 1995. Serum paraoxonase activity, concentration and phenotype distribution in diabetes mellitus and its relationship to serum lipids and lipoproteins. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 15: 1812-18.

ADKINS, S.; GAN, K. N; MODY, M.; LA DU, B. N., 1993. Molecular basis for the polymorphic forms of serum paraoxonase/arylesterase: Glutamine or Arginine at position 191, for the respective A or B allozymes. *Am.J.Hum.Genet.*, 52: 598-608.

ALBERT, L. A., 1988. Curso Básico de Toxicología Ambiental. Noriega Editors, 2ª ed. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud (ECO)/Organización Panamericana de Salud (OPAS)/Organización Mundial de Salud (OMS), Metepec, México.

ANTIKAINEN, M.; MURTIMAKI, S.; SYVANNE, M.; PAHLMAN, R., 1996. The Gln-Arg191 polymorphism of the human paraoxonase gene (HUMPONA) is not associated with the risk of coronary artery disease in finns. *J.Clin.Invest.*, 98: 883-85.

AVIRAM, M.; ROSEMBLAT, M.; BILLECKE, S.; EROGUL, J.; SORENSON, R.; BISGAIER, C. L, 1999. Human serum paraoxonase (PON1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.*, 35: 131-41.

BERNARD, A. M., 1995. Biokinetics and stability aspects of biomarkers: recommendations for application in population studies. *Toxicol.*, 101: 65-71.

BIELICKI, J.K.; MCCALL, M. R.; VAN DEN BERG, J. J. M.; KUYPERS, F. A.; FORTE, T. M., 1995. Copper and gas-phase cigarette smoke inhibit plasma lecithin: cholesterol acyltransferase activity by different mechanisms. *J Lipid Res.*, 36: 322-31.

BLATTER, M. C.; JAMES, R. W.; MESSMER, S.; BARJA, F.; POMETTA, D., 1993. Identification of a distinct human high-density lipoprotein subspecies defined by a lipoprotein-associated protein, K-85: identity of K-85 with paraoxonase. *Eur. J. Biochem.*, 211: 871-879.

BREALEY, C. J.; WALKER, C. H.; BALDWIN, C. B., 1980. A-Esterase Activities in Relation to the Differential Toxicity of Pirimiphos – Methyl to Birds and Mammals. *Pestic. Scien.*, 11: 546-54.

BØG-HANSEN, T. C.; KROG, H. H.; BACK, U., 1978. Plasma lipoprotein associated arylesterase is induced by bacterial lipopolysaccharide. *FEBS Lett.*, 93: 62-66.

COSTA, L. G.; MCDONALD, B. E.; MURPHY, S. D.; OMENN, G. S.; RICHTER, R. J.; MOTULSK, A.G.; FURLONG, C. E., 1990. Serum Paraoxonase and Its Influence on Paraoxon and Chlorpyrifos-oxon Toxicity in Rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 103: 66 -76.

COSTA, L. G.; MANZO, L., 1995. Biochemical Markers of Neurotoxicity: Research Strategies and Epidemiological Applications. *Toxicol. Lett.*, 77: 137- 44.

COSTA, L. G.; COLE, T. B.; JARVIK, G. P.; FURLONG, C. E., 2003. Functional Genomics of the Paraoxonase (PON 1) Polymorphisms: Effects on Pesticide Sensitivity, Cardiovascular Disease, and Drug Metabolism. *Annu. Rev. Med.*, 54: 371- 92.

DAVIES, H. G.; RICHTER, R. J.; KEIFER, M.; BROOMFIELD, C. A.; SOWALLA, J.; FURLONG, C. E., 1996. The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin. *Nat. Genet.*, 14: 334 -336.

ECKERSON, H. W.; ROMSON, J.; WYTE, C. & LADU, B. N., 1983 a. The human serum paraoxonase polymorphism: identification of phenotypes by their response to salts. *Am.J.Hum.Genet.*, 35: 214 - 227.

ECKERSON, H. W.; WYTE, C. & LADU, B. N., 1983 b. The human serum paraoxonase/arylesyerase polymorphism. *Am.J.Hum.Genet.*, 35: 1126 - 1138.

ECOBICHON, D..J. & STEPHENS, D. S., 1973. Perinatal development of human blood esterases. *Clin Pharm.Ther.*, 14: 41 - 47.

FAD., 1997. [http:// www.spttalgarve.min-saude.pt/dependencias/tabaco.htm](http://www.spttalgarve.min-saude.pt/dependencias/tabaco.htm). Data de acesso: 05 de maio de 2003.

FAIT, A., 1994. Introduction: General Structure of the manual. *Toxicology*, 91: 1-3.

FERRÉ, N.; CAMPS, J.; CABRÉ, M. et al., 2001. Hepatic paraoxonase activity alterations and free radical production in rats with experimental cirrhosis. *Metabolism*, 50: 997-1000.

FREI, B.; FORTE, T. M.; AMES, B. N.; CROSS, C. E., 1991. Gas phase oxidants of cigarette smoke induce lipid peroxidation and changes in lipoprotein properties in human blood plasma. *Biochem J.*, 277:133 -138.

FURLONG, C. E.; COSTA, L. G.; HASSET, C.; RICHTER, R. J.; SUDSTROM, J. A.; HUMBERT, R., 1993. Human and rabbit paraoxonases: purification, cloning,

sequencing, mapping and role of polymorphism in organophosphate detoxication. *Chem.-Biol. Interac.*, 87: 35-48.

GAN, K. N.; SMOLEN, A.; ECKERSON, H.W & LADU, B.N., 1991. Purification of human serum paraoxonase/arylesterase. *Drug. Met Dispos.*, 19: 100-106.

GELDMACHER, V.; MALLINCKODT, M.; DIEPGEN, T. L., 1988. The human paraoxonase polymorphism and specificity. *Toxicol Env.Chem.*, 18: 79-196.

GOLDSTEIN, J. L. & BROWN, M. S., 1977. The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Annu. Ver. Biochem.*, 46: 897-937.

GONZALVO, M. C.; GIL, F.; HERNANDEZ, A. F.; et al., 1997. Inhibition of paraoxonase activity in human liver microsomes by exposure to EDTA, metals and mercurials. *Chem. Biol. Interact.*, 105: 169-179.

HASSELWANDER, O.; MCMASTER, D.; FOGARTY, D. G.; et al., 1998. Serum paraoxonase and platelet-activating factor acetylhydrolase in chronic renal failure. *Clin. Chem.*, 44: 179-81.

HE, F., 1993. Biological Monitoring of Occupational Pesticides Exposure. *International Archives of Occupational and Environmental Health*: S69-S70.

HEDRICK, C. C.; HASSAN, K.; HOUGH, G. P.; et al., 2000. Short-term feeding of atherogenic diet to mice results in reduction of HDL and paraoxonase that may be mediated by na immune mechanism. *Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 20: 1946-52.

HEGELE, R. A.; BRUNT, J. H.; CONNELLY, P. W., 1995 a. A polymorphism of the paraoxonase gene associated with variation in plasma lipoproteins in a genetic isolate. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 15: 89-95.

HEINECKE, J. W.; LUSIS, A. J., 1998. Paraoxonase-Gene Related Polymorphisms Associated with Coronary Heart Disease: Support for the Oxidative Damage Hypotesis? *Am.J.Genet.*, 62: 20-24.

HENAO, S. E.; COREY, G., 1986. Serie Vigilancia 2: Plaguicidas Organofosforados e Carbamicos. Centro Panamericano de Ecologia Humana y Salud (ECO)/ Organización Panamericana de Salud (OPAS)/Organización Mundial de Salud (OMS), Metepec, México.

HERNANDEZ, A. F.; GONZALVO, M. C.; GIL, F.; et al., 1997. Divergent effects of classical inducers on rat plasma and microsomial fraction paraoxonase and arylesterase. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 3: 83-86.

HOFFMANN, D.; WYNDER, E. L., 1986. Chemical Constituents and bioactivity of tabacco smoke. *IARC Sci Publ.*, 74: 145-165.

HUMBERT, R.; ADLER, D. A.; FURLONG, C. E., 1993. The Molecular Basis of the Human Serum Paraoxonase Activity Polymorphism. *Nat Genet.*, 3: 73-76.

HYDE, E.G. & CARMICHAEL, W. W., 1991. Anatoxin-A(s), a naturally occurring organophosphate, is an irreversible active site-directed inhibitor of acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7). *J. Biochem. Toxicol.*, 6: 195-201.

ICGZC (Instituto de Clínica Geral da Zona Centro), 2003. [http:// www.icgzn.pt/centro/centro/tabaco1.html](http://www.icgzn.pt/centro/centro/tabaco1.html).

JAMES, R. W; LEVIEV, I.; RIGHETTI, A., 2000. Smoking is associated with reduced serum paraoxonase activity and concentrations in patients with coronary artery disease. *Circulation*, 101(19): 2252-7.

KALISTE-KORHONEN, E.; TUOVINEN, K.; HANNINEN, O., 1998. Effects of phenobarbital and –naphthoflavone on activities of different rat esterases after paraoxon exposure. *Gen. Pharmacol.*, 31: 307-312.

KAO, Y.; DONAGHUE, K.; CHAN, A.; KNIGHT, J.; SILINNK, M., 1998. A variant of paraoxonase (PON1) gene is associated with diabetic retinopathy in IDDM. *J. Clin Endoc Met.*, 83 (7): 2589-2592.

KELSO, G. J.; STUART, W. D.; RICHTER, R. J.; FURLONG, C. E.; JORDAN-STARRCK, T. C. & HARMONY, J. A. K., 1994. Apolipoprotein J is associated with paraoxonase in human plasma. *Biochem.*, 33: 832-839.

KIM, J.Q.; SONG, J.; PARK, Y. B., 1998. Molecular bases of coronary heart disease in Korea. *Journal of Korean Medical Science.*, 13 (1): 1-15 (Feb).

KLIMOV, A. N.; GUREVICH, V. S.; NIKIFOROVA, A. A.; PLAVINSKY, S. L.; TERYUKOVA, N. P., 1993. Antioxidative activity of high-density lipoproteins *in vivo*. *Atherosclerosis.*, 100: 13-19.

LADU, B.N., 1992. Human serum PON1 /Arylesterase. *In: Pharmacogenesis of Drug Metabolism* (Ed. Por Kalow W.):51-91. Pergamon Press, New York.

LARINI, L., 1997. Toxicologia. 3ª ed. pp.145-164, São Paulo: Editora Manole.

LI, W.; COSTA, L. G.; FURLONG, C. E., 1993. Serum paraoxonase status: a major factor in determining resistance to organophosphates. *J.Toxicol. Env. Health.*, 40: 337-346.

LI, W. F.; FURLONG, C. E. & COSTA, L. G., 1995. Paraoxonase protects against chlorpyrifos toxicity in mice. *Toxicol. Lett.*, 77: 31-38.

LOWRY, L. K., 1995. Role of Biomarkers of Exposure in the Assessment of Health Risks. *Toxicol. Lett.*, 77: 31-38.

MACKNESS, M. I.; WALKER, C. H.; CARLSON, L. A., 1987. Low A-esterase activity in serum of patients with fish-eye disease. *Clin. Chem.*, 33: 587-588.

MACKNESS, M. I., 1989. A-esterases. Enzymes looking for a role? *Biochem. Pharmacol.*, 38 (3): 385-390.

MACKNESS, M. I.; BHATNAGAR, D.; WINOCOUR, P. H.; ARROL, S.; ISHOLA, M.; DURRINGTON, P. N., 1991. Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolaemia and insulin-dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis.*, 86: 193-199.

MACKNESS, M. I.; ABBOT, C. K. & DURRINGTON, P.N., 1993. Is paraoxonase related to atherosclerosis?. *Chem-Biol. Interact.*, 87: 161-171.

MACKNESS, M. I.; MACKNESS, B.; DURRINGTON, P. N.; CONNELLY, P. W.; HEGELE, R. A., 1996. Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. *Current Opinion in Lipidology*, 7 (2): 69-76 Apr.

MACKNESS, M. I.; MACKNESS, B.; ARROL, S.; WOOD, G.; BHATNAGAR, D.; DURRINGTON, P. N., 1997 d. Presence of paraoxonase in human interstitial fluid. *FEBS Lett.*, 416: 377-380.

MACKNESS, B.; MACKNESS, M. I.; ARROL, S.; et al., 1998. Serum paraoxonase (PON1) 55 and 192 polymorphism and paraoxonase activity and concentration in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis*, 139: 341-49.

MANSUR, A., 1946. An Enzyme in Animal Tissue Capable of Hydrolyzing the Phosphorusfluorine Bond of Acyl Fluorophosphates. *J. Biol. Chem.*, 164: 271-289.

MAURY, C. P.; JUNGE, W.; TEPPA, A. M., 1984. Serum esterase activity in reactive systemic amyloidosis and its relation to amyloid A degrading activity. *J. Lab. Clin. Med.*, 104: 761-766.

MCELVEEN, J.; MACKNESS, M. I.; COLLEY, C. M.; PEARD, T.; WARNER, S.; WALKER, C. H., 1986. Distribution of paraoxon hydrolytic activity in the serum of patients after myocardial infarction. *Clin. Chem.*, 32: 671-673.

MORAES, F. F. .M., 1997. Padronização da dosagem da enzima paraoxonase em camundongos. Dissertação de Mestrado, Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública, CESTEH. 80pp.

MUELLER, R. F.; HORNING, S.; FURLONG, C. E.; MOTULSKY, A., 1983. Plasma paraoxonase polymorphism, a new enzyme assay: population, family, biochemical and linkage studies. *Am. J.Hum. Genet.*, 35: 393-408.

MUTCH, E.; BLAIN, P. G.; WILLIAMS, F. M., 1992. Interindividual vaiations in enzymes controlling organophosphate toxicity in man. *Human Exp. Toxicol.*, 11: 109-116.

NISHIO, E.; WATANABE, Y., 1997. Ciggarete smoke extract inhibits plasma paraoxonase activity by modification of the enzyme's free thiols. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 236: 289-93.

NOEL, G.R & MAYASICH, S. O., 1991. Parcial Characterization of Soluble Esterase from *Heterodere glycines* and Inibition by Aldicarb and Pheamiphos. *Comp. Biochem. Physiol.*, 99 (3): 537-540.

NOTO, H.; HASHIMOTO, Y.; SATOH, H.; et al., 2001. Exclusive association of paraoxonase 1 with high-density lipoprotein particles in apolipoprotein A-I deficiency. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 289: 395-401.

OLIVEIRA-SILVA, A. L.; MOREIRA, J. C; MENEZES, A. C; OLIVEIRA-SILVA, J. J; LIMA, J. S. 1998. Determinação dos aspectos cinéticos da enzima arilesterase (E.C.3.1.1.2) em plasma humano. Trabalho apresentado na XIII Federação das Sociedades de Biologia Experimental (FESBE).

OLIVEIRA-SILVA, A. L., 2000. Levantamento Fenotípico da Atividade da Enzima Paraoxonase em Populações Expostas e Não Expostas a Pesticidas Organofosforados. Dissertação de Mestrado, Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz.

OMURA, O., 1980. Serum paraoxonase polymorfisms in Japan. M.D. Thesis, University of Erlangen (Germany).

OPAS, 2002. <http://www.opas.org.br>. Data de acesso: 05 de maio de 2003.

PARKINSON, A., 1996. Biotransformation of Xenobiotics In: *Toxicology: The Basis Science of Poisons* (Klassen, D. Casarett & Doull's), 5th ed. Pergamon Press Inc., New York.

PARTHASARATHY, S.; BARNETT, J.; FONG, L. G., 1990. High-density lipoprotein inhibits the oxidative modification of low-density lipoprotein. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1044: 275-283.

PATEL, B. N.; MACKNESS, M. I.; HARTY, D. W.; ARROL, S.; BOOTHANFORD, R. P.; DURRINGTON, P. N., 1990. Serum esterase activities and hyperlipidaemia in the streptozotocin-diabetic rat. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1035: 113-116.

PLAYFER, J. R.; POWELL, C.; EVANS, D. A., 1977. Plasma paraoxonase activity in old age. *Age Ageing*, 6: 89-95.

PRIMO-PARMA, S. L.; SORENSON, R. C.; TEIBER, J.; LA DU, B. N., 1996. The human serum paraoxonase-arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics*, 33: 498-509.

QUINN, M. T; PARTHASARATHY, S.; FONG, L. G.; STEINBERG, D., 1987. Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84:

2995-2998.

RICHARD, W.; LEVIEV, I.; RIGHETTI, M., 2000. Smoking is Associated with Reduced Serum Paraoxonase Activity and Concentration in Patients with Coronary Artery Disease. *Circulation*, 101: 2252-2257.

RUIZ, J., 1997. Diabetes Mellitus and the late complications: influence of the genetics factors. *Diabetes & Metabolism*, 23: 57-63.

SANGHERA, D. K.; SAHA, N.; ASTON, C. E.; KAMBOH, M. I., 1997. Genetic polymorphism of paraoxonase and the risk of coronary hearth disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 17 (6): 1067-1073.

SECCHIERO, S.; MUSSAP, M.; ZANINOTTO, M.; BERTORELLE, R.; BURLINA, A., 1989. Serum arylesterase (paraoxonase) activity following myocardial infarction. *Clin. Chem. Acta*, 183: 71-76.

SENTÍ, M.; TOMÁS, M.; ANGLADA, R.; ELOSUA, R.; MARRUGAT, J.; COVAS, M.; FITÓ, M., 2003. *European Journal of Internal Medicine*, 14: 178-184.

SHIH, D. M.; GU, L.; HAMA, S.; et al., 1996. Genetic-dietary regulation of serum paraoxonase expression and its role in atherogenesis in a mouse model. *J.Clin. Invest.*, 97: 1630-1639.

SHIH, D. M.; GU, L.; XIA, Y. R.; et al., 1998. Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature*, 394: 284-298.

SMITH, A. B.; ESKO, J. D.; HAJDUK, S. L., 1995. Killing of trypanosomes by the human haptoglobin - related protein. *Science*, 268: 284-86.

SORENSEN, R. C.; PRIMO-PARMO, S. L.; KUO, C.L.; LADU, B. N., 1995 b. Reconsideration of the catalytic center and mechanism of mammalian paraoxonase/arylesterase. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA*, 92: 7187-7191.

SZABÓ, I.; RÓNIA, K.; CZINNER, A. & GACHÁLYI, B., 1991. Human paraoxonase polymorphism: Hungarian population studies in children and adults. *International J.Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.*, 29 (6): 238-241.

SZAFRAN, Z.; NOWAK, J.; SZAFRAN, H.; JANIK, A., 1997. Esterolytic activity of blood serum in infants with hypertrophic pyloric stenosis. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 17: 321-324.

TRIBBLE, D. L.; GIULIANO, L. J.; FORTMANN, S. P., 1993. Reduced plasma ascorbic acid concentrations in nonsmokers regularly exposed to environmental tobacco smoke. *Am J Clin Nutr.*, 58: 886-890.

UFAC, 2002. [http:// www.ufac.br/imprensa/2002/outubro/artigo660.html](http://www.ufac.br/imprensa/2002/outubro/artigo660.html). Data de acesso: 05 de maio de 2003.

VAN DER GAAG, M. S.; VAN TOL, A.; SCHEEK, L. M.; et al., 1999. Daily moderated alcohol consumption increases serum paraoxonase activity: a diet-controlled randomized intervention study in middle-aged men. *Atherosclerosis*, 147: 405-410.

VITARIUS, J.A. & SULTATOS,L.G., 1995. The role of calcium in the hydrolysis of the organophosphate paraoxon by human serum A-esterase. *Life Sci.*, 56: 125-134.

WALKER, C. H., 1993. The Classification of Esterases with Hydrolyse Organophosphates: Recent Developments. *Chem-Biol. Interactions*, 87: 17-24.

WASSMANN, S.; BÄUNER, A. T.; STREHLOW, K.; VAN EICKELS, M.; GROHÉ, C.; AHLBORY, K.; et al., 2001. Endothelial dysfunction and oxidative stress during estrogen deficiency inspontaneously hypertensive rats. *Circulation*, 103: 435 -441.

WEITMAN, S. D.; VODICNICK, M. J.; LECH, T. J., 1983. Influence of pregnancy on parathion toxicity and disposition. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 71: 215-224.

WHO (World Health Organization), 2001. Confronting the Tobacco Epidemic in an Era of Trade Liberation.

YAMASAKI, Y.; SAHAMOTO, K.; WATADA, H.; KAJIMOTO, Y.; HORI, M., 1997. The Arg (192) isoform of paraoxonase with low sarin-hydrolysing activity is dominant in the Japanese. *Hum. Genet.*, 101: 67-68.