

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Centro de Desenvolvimento Tecnológico - CDTec

Curso de Graduação em Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

**Análise de polimorfismo no promotor do gene da paraoxonase 1 e sua relação
com a atividade enzimática em mulheres**

Maitê Krüger Becker

Pelotas, 2014

Maitê Krüger Becker

**Análise de polimorfismo no promotor do gene da paraoxonase 1 e sua relação
com a atividade enzimática em mulheres**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal de Pelotas, como requisito
parcial à obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia.

Orientador: Augusto Schneider

Pelotas, 2014.

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901

Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

B395a

Becker, Maitê Krüger

Análise de polimorfismo no promotor do gene da paraoxonase 1 sua relação com a atividade enzimática em mulheres/ Maitê Krüger Becker. – 27f. : il. – Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Biotecnologia). Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico. Pelotas, 2014. – Orientador Augusto Schneider.

1.Biotecnologia. 2.Paraoxonase 1. 3.Polimorfismo.
4.Mulheres. 5.Atividade enzimática. 6.Idade. I.Schneider,
Augusto. II.Título.

CDD: 613.04244

Maitê Krüger Becker

Análise de polimorfismo no promotor do gene da paraoxonase 1 e sua relação com a atividade enzimática em mulheres

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 12 de dezembro de 2014.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Augusto Schneider (Orientador) – Universidade Federal de Pelotas

M.Sc. Pedro Augusto Silva Silveira – Universidade Federal de Pelotas

M.Sc. Rodrigo França – Universidade Federal de Pelotas

Dedico este trabalho aos meus pais Maira e Laerte e aos meus irmãos João Alex, Luiz Felipe e Marcus Vinícius que são meu esteio e minha motivação.

Agradecimentos

A Universidade Federal de Pelotas, em especial o Centro de Desenvolvimento Tecnológico possibilitando que eu cursasse esta graduação, me fazendo crescer tanto profissionalmente como pessoalmente.

A minha família, de um modo geral, que sempre esteve presente em todos os momentos que precisei, tanto nas tristezas e fracassos, quanto nas alegrias.

Ao meu orientador Augusto Schneider, por possibilitar a realização de meu estágio final e Trabalho de Conclusão de Curso em seu laboratório, por ser sempre solícito, executar com maestria sua profissão e fornecer todos os subsídios necessários para a realização deste trabalho.

A minha pequena sobrinha Betina, que mesmo sem ter consciência, transforma em alegria todo instante na sua presença, até os mais difíceis.

As minhas cunhadinhas Bianca (ex-companheira de moradia), Rosiele e Vitória pelo carinho, amizade e apoio de sempre.

Ao ex-companheiro de “Arena Maldonado” Renan e ao atual Rômulo, pelas junções e funções de jogo de futebol que faziam da estadia em Pelotas um pouco mais leve.

Ao doutorando Pedro, que me inseriu na rotina do laboratório e esteve sempre disposto a ajudar.

Ao Felipe, que deu aquela força no Espectrofotômetro.

Aos meus colegas da ATBIOTEC 2014, em especial as minhas amigas Ana Sofia e Katielle, que foram um grande presente que a universidade me deu e que com certeza levarei para a vida.

Muito Obrigada!

Resumo

BECKER, Maitê Krüger. **Análise de polimorfismo no promotor do gene da paraoxonase 1 e sua relação com a atividade enzimática em mulheres.** 2014. 27f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

A paraoxonase 1 (PON1) é uma enzima associada a lipoproteína de alta densidade (HDL) sintetizada e secretada no fígado. A PON1 possui uma ação antioxidante em membranas e atua também na prevenção da oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), desempenhando um papel importante no metabolismo de lipídeos e protegendo contra o desenvolvimento da aterosclerose. Investigações sugerem que o polimorfismo T(-107)C parece promover um efeito mais significativo na expressão do gene e também na atividade sérica enzimática, além de estar relacionado a uma diminuição do risco de doença cardiovascular. O objetivo deste estudo foi relacionar os níveis séricos de atividade da PON1 com o polimorfismo na região -107 do promotor do gene da PON1 em mulheres de diferentes faixas etárias. Foram utilizadas 29 amostras de sangue e soro de voluntárias, através da extração de DNA, realização de PCR e digestão enzimática dos fragmentos de PCR foi feita a genotipagem para o polimorfismo T(-107)C. Também foi realizada a análise de atividade enzimática de PON1 no soro. Os resultados encontrados referentes à frequência alélica indicam um percentual de 53,45% de alelos C e 46,55% de alelos T, mostrando uma predominância do alelo C na população analisada, diferindo da distribuição padrão de outras populações étnicas. Quanto a distribuição genotípica, pode-se observar índices de 27,6% C/C; 51,7% C/T e 20,7% T/T. Quando estes foram relacionados com a atividade enzimática, foi observada uma relação linear entre a presença do alelo C e atividade de PON1, pois quanto maior a presença do alelo favorável C, maior o nível de atividade da PON1, sendo que não foram evidenciadas associações entre a idade e a atividade enzimática. Por fim, observou-se um padrão de distribuição alélica similar ao encontrado na população europeia e uma relação linear entre a presença do alelo C favorável e a atividade enzimática. Estes dados são importantes para futuras correlações com outras variáveis, já que existem poucos estudos de análise do polimorfismo -107 na população brasileira.

Palavras-chave: paraoxonase 1; polimorfismo; mulheres; atividade enzimática; idade.

Abstract

BECKER, Maitê Krüger. **Analysis of polymorphism in the paraoxonase 1 gene promoter and its relationship to enzyme activity in women.** 2014. 27f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

The paraoxonase 1 (PON1) is an enzyme associated with high density lipoprotein (HDL) and is synthesized and secreted in the liver. The PON1 act as an antioxidant in membranes and prevents the oxidation of low density lipoproteins (LDL), playing an important role in lipid metabolism and protecting against the development of atherosclerosis. Research suggests that the polymorphism T(-107)C appears to promote a more significant effect on gene expression and also in serum enzyme activity, in addition to being associated with decreased risk of cardiovascular disease. The aim of this study was to compare serum levels of PON1 activity with a polymorphism in the position -107 of promoter of PON1 gene in women of different age groups. Were used 29 blood samples and serum and DNA extraction, PCR and digestion enzyme PCR fragments genotyping was performed for the identification of the polymorphism T(-107)C. Also it was performed analysis of enzymatic activity of serum on PON1. The results concerning the allele frequency indicate a percentage of 53,45% of C alleles and 46,55% of T alleles, showing a predominance of C allele in the population studied, differently from the standard distribution of other ethnic populations. Relative the genotype distribution can be observed rates of 27,6% C/C; 51,7% C/T and 20,7% T/T. When they were correlated with enzymatic activity, a linear relationship was observed between the presence of the C allele and PON1 activity, because the greater the presence of the C allele favorable, the higher the level of PON1 activity. Finally, we observed a pattern of allele distribution similar to that found in the European population and a linear relationship between the favorable presence allele C and enzyme activity. There were no associations between age and enzyme activity. These results are important for future correlations with other variables, as there are few -107 polymorphism analysis studies in the Brazilian population.

Keywords: paraoxonase 1; polymorphism; women; enzyme activity; age.

Lista de Figuras

Figura 1	Mapa genético da família PON em humanos	13
Figura 2	Diferença de frequência alélica entre diferentes populações étnicas ...	14
Figura 3	Local de corte da enzima <i>BrSBI</i>	19
Figura 4	Gel de agarose demonstrando variantes genotípicas	20
Figura 5	Frequência dos alelos C e T	21
Figura 6	Relação da atividade da PON1 com variantes genotípicas	22
Figura 7	Relação da idade com a atividade da PON1	22

Lista de Abreviaturas

PON	Paraoxonase
PON1	Paraoxonase1
HDL	Lipoproteína de alta densidade
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
Pb	Pares de Base

Lista de Símbolos

mL	Mililitro
°C	graus Celsius
ul	Microlitros
min	Minutos
rpm	rotações por minuto
ug	Micrograma
M	Molar
H	Horas
Ng	Nanograma
X	Vezes
%	Porcento
®	Registro
™	Trademark
V	Volts
mM	Milimolar
nM	Nanomolar
U	Unidade

Sumário

1	Introdução	13
1.1	Objetivo Geral	16
1.2	Objetivos Específicos	17
2	Materiais e Métodos	17
2.1	Amostragem	17
2.2	Coleta de sangue	17
2.3	Extração de DNA	18
2.4	Quantificação e diluição	18
2.5	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	19
2.6	Digestão enzimática	19
2.7	Eletroforese	20
2.8	Atividade PON1	20
2.9	Análises estatísticas	20
3	Resultados e discussão	21
4	Considerações finais	24
	Referências	25

1. Introdução

Polimorfismos são, por definição, variações comuns na seqüência de nucleotídeos, onde os alelos específicos em um ou mais loci representam o genótipo para aqueles genes, sendo o fenótipo o efeito da ação do gene (FAVARIN, 2004).

As Paraoxonases (PON) compõem uma família multigênica de enzimas localizadas no braço longo do cromossomo 7 na região q21.3-q22.1 em humanos (Figura1) (HOFER et al., 2006). Dentre estas, a mais estudada é a paraoxonase1 (PON1) (FERNANDES, 2007), que é uma enzima associada a lipoproteína de alta densidade (HDL) (BROPHY et al., 2001) sintetizada e secretada no fígado. A PON1 possui uma ação antioxidante em membranas e atua também na prevenção da oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), por isso desempenhando um papel importante no metabolismo de lipídeos e protegendo contra o desenvolvimento da aterosclerose (MOHAMMADI, 2012, COSTA et al., 2005).

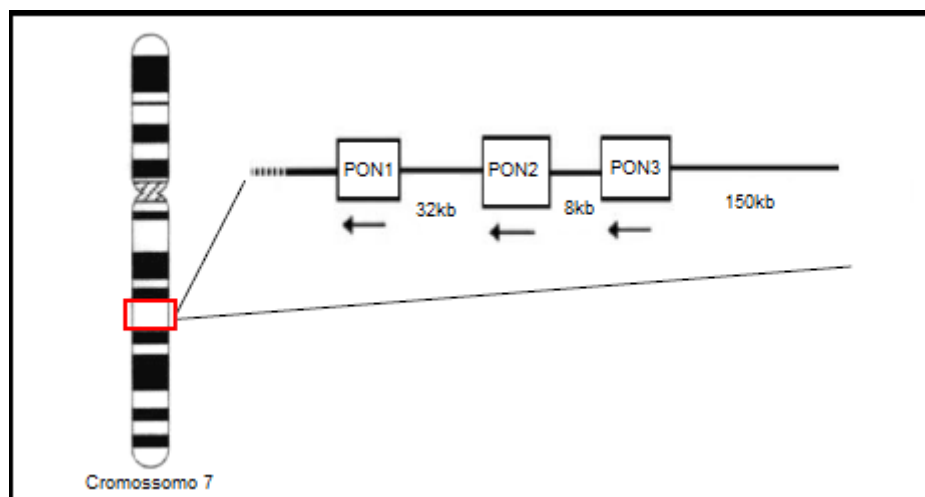
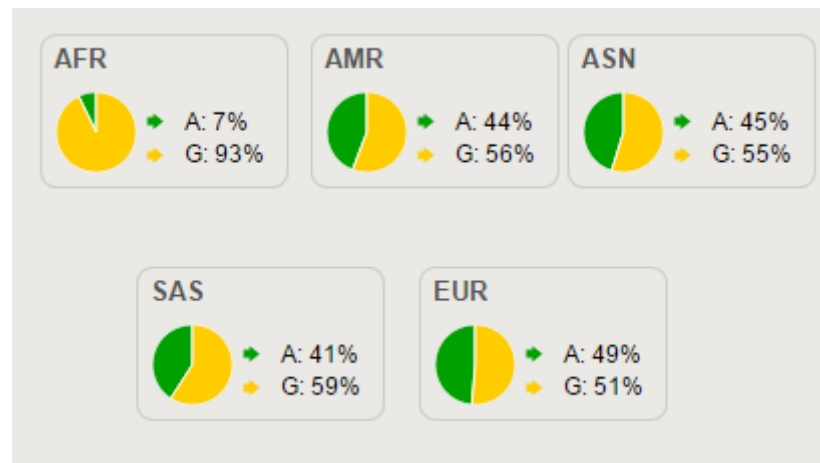


Figura 1. Mapa genético da família PON em humanos. Fonte: Li, et, al 2003 (adaptado).

A PON1 possui atividade enzimática já em recém-nascidos e suas concentrações séricas em indivíduos a partir de um ano de idade são semelhantes ao adulto. As mulheres apresentam níveis significativamente maiores se comparados com a média de atividade em homens (MACEDO, 2013). Também há variações na distribuição

alélica entre populações de diferentes etnias em cerca de 10 a 40 vezes (Figura 2), sendo que a atividade enzimática se mostra diminuída em diferentes patologias como diabetes, hipercolesterolemia familiar, entre outras (FERRI, 2009). A concentração sérica de PON1 também pode ser alterada pela idade do indivíduo, sendo a causa provável o aumento do estresse oxidativo em associação ao envelhecimento celular (COSTA et al., 2005). Dados ainda conflitantes demonstram que a atividade da PON1 também pode estar alterada em uma dieta aterogênica (ingestão de ácidos graxos saturados), no tabagismo, na gravidez e menopausa (MACEDO, 2013; CORREIA, 2009; FERRÉ et al., 2003).



Legenda: A = Alelo T; G = alelo C

Figura 2. Diferença de frequência alélica entre diferentes populações étnicas

Mais de 160 polimorfismos já foram descritos no gene da PON1 (MASSELI, 2007), dois destes são comuns, presentes na região codificante do gene da paraoxonase que correspondem à troca de uma Glutamina por uma Arginina no códon 192 (Q192R) e outro que correspondente a troca de uma Leucina por uma Metionina no códon 55 (L55M) sendo que ambos foram correlacionados com a atividade sérica da PON1 e com a propensão a desenvolver doença cardiovascular (CAMPO et al., 200a). Estudos também identificaram cinco polimorfismos na região regulatória (promotor), estes estão localizados nas posições -107/108, -126, -160/162, -824/832 e -907/909 (BROPHY et al., 2001). Investigações sugerem que o polimorfismo T(-107)C (rs705379) parece promover um efeito mais significativo na expressão do gene e também na atividade sérica enzimática, além de estar relacionado a uma diminuição do risco de doença cardiovascular. Ainda pode-se

citar a associação do genótipo (-107)CC com uma maior atividade da PON1 sendo o oposto apresentado no genótipo TT(-107) (CAMPO et al., 2004).

A fertilidade feminina declina a partir dos 30 anos de idade devido a redução do número e da qualidade dos oócitos, sendo que a qualidade parece ser o fator preponderante para o estabelecimento desta condição (ABREU et al., 2006). Outros fatores também interferem na reprodução das mulheres, como síndrome do ovário policístico (SOP), endometriose, miomas, e outros distúrbios (LORENÇATTO et al., 2002; KULIE et al., 2011; SILVA et al., 2005). Estudos mostraram que uma dieta rica no consumo de gordura e de colesterol total não está relacionada com quadro de infertilidade, porém, existiria sim uma associação positiva com a ingestão de ácidos graxos trans e o risco de infertilidade (RODRIGUES et al., 2009). Uma dieta rica em gorduras estaria envolvida com o desenvolvimento da obesidade e alteração dos níveis dislipidêmicos nessas mulheres, alterando desta forma os níveis de atividade da PON1 (MOHAMMADI; RAFRAF, 2012). Outras abordagens indicam que a atividade de PON1 sérica em mulheres submetida ao processo de fertilização *in vitro* está diretamente correlacionada a qualidade embrionária (BROWNE et al., 2008). Além disso, outros estudos indicam que a adição de PON1 ao meio de maturação oocitária *in vitro* aumenta linearmente a produção de embriões (RINCON et al., 2014). Assim fica claro, a importância da PON1 para a fertilidade das mulheres, especialmente aquelas na faixa de risco após os 32 anos.

Com base nestas evidências, este trabalho visa relacionar os níveis séricos de atividade da PON1 com o polimorfismo na região -107 do gene da PON1 em mulheres de diferentes faixas etárias.

Objetivo Geral

Relacionar os níveis séricos de atividade da PON1 com o polimorfismo na região -107 do gene da PON1 em mulheres de diferentes faixas etárias.

Objetivos Específicos

- Determinar a distribuição genotípica do polimorfismo -107 da região promotora do gene da PON1 em mulheres;
- Avaliar a atividade da PON1 no soro das voluntárias;
- Correlacionar os níveis de atividade da PON1 com a idade.

2 Materiais e métodos

2.1 Amostragem

Um total de 29 mulheres entre 18 e 50 anos participaram do estudo. Foram recrutadas mulheres atendidas no ambulatório de ginecologia da Faculdade de Medicina da UFPel. Todas as participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina.

2.2 Coleta de sangue

As participantes foram encaminhadas ao Laboratório Novara na cidade de Pelotas – RS, onde foram coletados 2mL de sangue com EDTA e 2mL de sangue em tubo sem anticoagulante. As amostras foram congeladas em freezer a -20°C.

2.3 Extração de DNA

Para a extração de DNA foram adicionados 500uL de sangue e 1.000uL de tampão de quebra de hemácias (Tris-HCl, sacarose, MgCl₂, Triton X-100 e água destilada) em microtubos de 1,5 mL, agitados em vórtex e centrifugados por 2 min a 7.000rpm, sendo o sobrenadante descartado. Este processo foi repetido por duas vezes, sendo que ao fim, os tubos foram postos para secagem em papel absorvente. Após esta etapa, 400uL de tampão de quebra de núcleo (Tris-HCl, EDTA anidro, SDS, citrato de sódio e água destilada) e 5ul de proteinase K (10 ug/uL) foram adicionados aos tubos e em seguida, incubados em banho seco a 55°C durante 1h e

agitados a cada 15min em vórtex. Concluída a incubação, foram acrescentados 100uL de NaCl (5M) e 600uL de clorofórmio e as amostras foram levadas ao freezer por 10min. Subsequentemente os tubos foram agitados e centrifugados a 9.000rpm por 2min. Em seguida, 400uL do sobrenadante foram transferidos a novos microtubos e acrescentados 800uL de etanol absoluto onde foram imediatamente agitados e centrifugados por 5min a 12.000rpm. O sobrenadante foi descartado e os tubos ficaram secando em temperatura ambiente e por fim, foram adicionados de 50uL de TE Buffer. As amostras ficaram armazenadas em freezer a -20°C.

2.4 Quantificação e diluição

Foi retirado 1uL de amostra para quantificação no NanoDrop. A partir do resultado da quantificação, 20uL de amostra foram diluídos com TE Buffer a fim de padronizá-las a uma concentração de 100ng/uL de DNA. As amostras que resultaram em concentrações abaixo deste valor não foram diluídas.

2.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Primeiramente, foi realizado um PCR teste a fim de confirmar a extração e diluição do DNA e o funcionamento dos primers, resultando na amplificação de uma banda bem visível na altura de 240pb. Foram estabelecidos dois protocolos, um para amostras de DNA não diluídas e outro para DNA diluído. Para a realização da técnica, o primeiro protocolo utilizou como base de cálculo 10uL de GOTaq® Green Master Mix (Promega), 1uL do primer forward (5'AGCTAGCTGCGGACCCGGCGGGGAGGAG3') e 1uL do primer reverse (5'GGCTGCAGCCCTCACCAACCC3'), 5uL de DNA e 3uL de água ultrapura. No segundo protocolo foi utilizado 10uL de GOTaq®, 1uL do primer forward e 1uL do primer reverse, 2uL de DNA (100 ng/uL) e 6uL de água ultra-pura. A técnica de PCR iniciou com as amostras expostas por 5min a 94C⁰ e 35 ciclos de: 94C⁰ por 45seg; 67C⁰ por 45seg; 72C⁰ por 45seg e 72°C por 10min. O produto da PCR foi submetido

a Eletroforese em gel de agarose (3%) e corado com SYBR® Safe (Life Technologies), onde confirmou-se a presença de bandas visíveis de 240pb, como o esperado. Estes protocolos foram utilizados para todas as amostras.

2.6 Digestão Enzimática

Os produtos de PCR foram digeridos com a enzima de restrição *BsrBI* (New EnglandBioLabs, Cambridge, UK) que cliva o DNA na sequência representada na figura 3. Foi utilizado 7uL do produto do PCR, 3 unidades de enzima (0,3uL) *BrsBI*, 1,5uL de CutSmart™ Buffer (10X) e 6,2uL de água ultrapura, e então incubadas em Termociclador por duas horas a 37°C.



Figura 3 – Local de corte da enzima BrSBI.

2.7 Eletroforese

Os fragmentos da digestão foram submetidos à Eletroforese em gel de agarose (3%) corado com SYBR® Safe (Life Technologies), onde foi adicionado o marcador de 100pb e 15uL de amostra. A voltagem aplicada foi de 150V durante 1h e separados devido ao diferencial de tamanho (em pb). As amostras do alelo T geraram fragmentos de 240pb e do alelo C de 28 e 212pb (Figura 4).



Figura 4. Gel de agarose demonstrando variantes genotípicas.

2.8 Atividade da PON1

A solução de trabalho foi preparada a partir de tampão (Tris/HCl e CaCl_2) acrescido de fenilacetato (8 mM), sendo homogeneizado em agitador magnético por 30min. O soro foi diluído da proporção de 3:1 com tampão Tris/HCl e posteriormente para 3,3uL de amostra de soro foram adicionados 500uL da solução de trabalho. A solução teve a absorbância medida em Espectrofotômetro no comprimento de onda de 270 nm por 60seg. A atividade da PON1 foi determinada pela absorbância multiplicada pelo fator de correção 115 e pelo fator de diluição 3. A atividade da PON1 foi expressa em U/mL.

2.9 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas através da análise de variância (ANOVA), a fim de determinar se há uma diferença significativa entre as médias das variáveis.

Resultados e Discussão

Os resultados encontrados referentes à frequência alélica mostram um percentual de 53,45% de alelos C e 46,55% de alelos T (Figura 5), mostrando uma predominância do alelo C na população analisada.

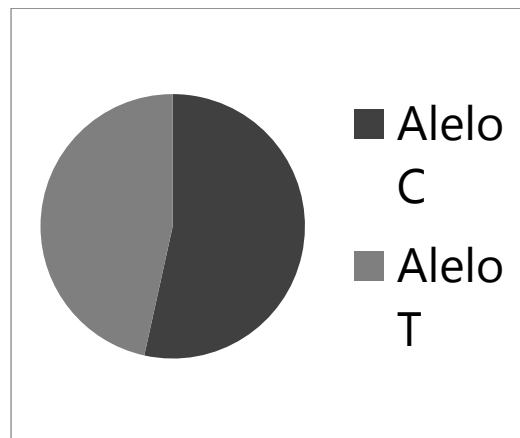
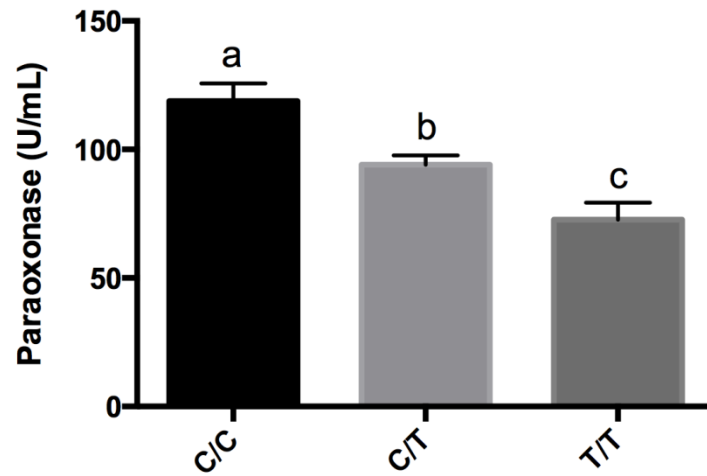


Figura 5. Frequência dos alelos C e T.

Quanto a distribuição genotípica, o fragmento de 240pb indica o genótipo TT, o de 212/28pb indica CC e quando ambos estão presentes, 212/28 e 240pb CT. Podem-se observar índices genotípicos de 27,6% C/C; 51,7% C/T e 20,7% T/T.

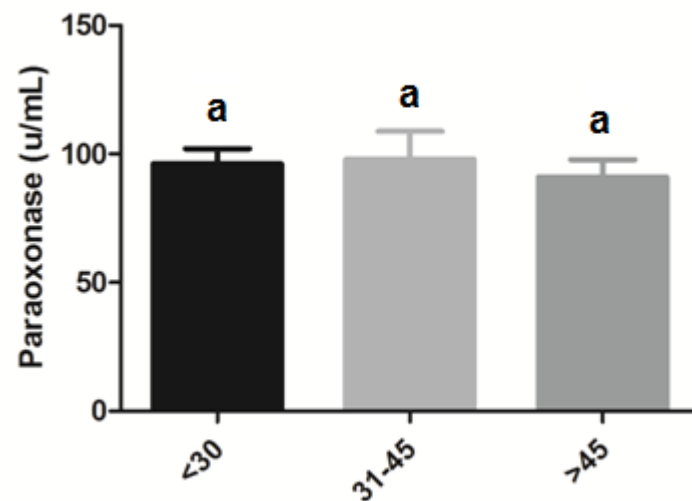
Ao relacionar a atividade enzimática com o genótipo, foi observada uma relação linear entre a presença do alelo C e atividade de PON1, pois quanto maior a presença do alelo favorável C, maior o nível de atividade da PON1 (Figura 6), o que representa a diferença entre os genótipos CC, CT e TT.



Legenda: Letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$)

Figura 6. Relação da atividade da PON1 com variantes genóticas.

Através do teste ANOVA não foi possível correlacionar a idade das mulheres com a atividade enzimática da PON1 (Figura 7)



Legenda: Letras iguais indicam que não há diferença estatística ($P > 0,05$)

Figura 7. Relação da idade com a atividade da PON

O presente trabalho apresentou uma distribuição genotípica entre as mulheres de 27,6% do genótipo C/C, 51,7% do genótipo C/T e 20,7% do genótipo T/T, observou-se ainda uma predominância do alelo C na população e uma relação linear positiva entre a presença deste alelo C favorável e a atividade da PON1.

Como descrito na literatura, entre diversas populações étnicas analisadas o alelo C é o predominante, divergindo quanto à frequência de cada alelo. Na população africana o percentual é de 93% do alelo C e 7% do alelo T, já na população europeia esse percentual praticamente se equipara, sendo 51% do alelo C e 49% do alelo T. Ao comparar com o perfil alélico do grupo componente do estudo, que foi de 53,5% para o alelo C e 46,6% para o alelo T, podemos notar uma semelhança com o padrão geral, mas as pequenas divergências de proporção genotípica podem estar relacionadas com a diversidade étnica de que a população brasileira é composta. Esse dado se faz importante para traçar um perfil referente a população brasileira, já que existem poucos estudos que abordem este polimorfismo, tanto na América do Sul quanto no Brasil (ALLEBRANDT, 2002).

Abordagens relacionam os polimorfismos da região codificante e da região promotora com a variabilidade na atividade sérica da enzima, sendo o polimorfismo -107 o que apresentou o maior efeito significativo independente sobre a atividade da PON1 (BROPHY et al., 2001, COSTA et al., 2005). Além disso, o alelo C foi considerado como favorável, pois está associado com maior nível de atividade da enzima (CAMPO et al., 2004). Este padrão se manteve nas amostras deste estudo, porém o nível de atividade também pode estar relacionado com outras variáveis que não foram abordadas, como consumo de gorduras saturadas e colesterol. É importante observar que a atividade média de PON1 no presente estudo é diferente do descrito por CAMPO et al. (2004), e isto pode ser devido a especificidades do teste usado para medição da mesma. Mas o importante é que as mesmas diferenças em nível de atividade foram detectadas entre os genótipos.

Muitos estudos relatam que a concentração sérica de PON1 também pode ser alterada pela idade do indivíduo, sendo a causa provável o aumento do estresse oxidativo em associação ao envelhecimento celular (COSTA et al., 2005). Os resultados obtidos através do confronto dos dados referentes a idade (divididas em faixas etárias) e atividade da PON1 não demonstraram associação entre elas, portanto não podendo ser considerada como uma variável de forte

correlação, sugerindo que de fato, o genótipo presente no indivíduo é a variável que maior influencia a atividade enzimática da PON1, como relatado por Kim (2013).

3 Considerações finais

Através dos resultados obtidos podemos concluir que o polimorfismo T(-107)C na região promotora alterou a expressão enzimática da PON1, sendo que a presença do alelo C favorável aumenta o nível da expressão, não havendo relação quanto a idade das mulheres. Ainda se faz necessário mais correlações com outras variáveis não abordadas, assim como ampliar as análises para um grupo maior de voluntários a fim de obter resultados mais fidedignos.

Referências

ABREU, L.G; SANTANA, L.F; NAVARRO, P. A. A. S; REIS, R. M; FERRIANI, R.A; MOURA, M.D. A taxa de gestação em mulheres submetidas a técnicas de reprodução assistida é menor a partir dos 30. Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia vol.28 n:1 Rio de Janeiro, 2006.

ALLEBRANDT, K.V.; SOUZA, R.L.R.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Variability of the paraoxonase gene (PON1) in euro- and afro-brazilians. *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, v. 180, p. 151-156, 2002.

BROWNE, R.W, SHELLY, W.B, BLOOM, M.S, OCQUE, A.J, SANDLER, J.R, HUDDLESTON, H.G, FUJIMOTO, V.Y. Distributions of high-density lipoprotein particle components in human follicular fluid and sera and their associations with embryo morphology parameters during IVF. *Hum Reprod.* 23:1884-1894. 2008

BROPHY, V.H; JAMPSA R. L; CLENDENNING, J.B; MCKINSTY, L.A; JARVIK; G.P; FURLONG, C. E. Effects of 5 Regulatory-Region Polymorphisms on Paraoxonase-Gene (PON1) Expression. *Am. J. Hum. Genet.* 68:1428–1436, 2001.

CAMPO, S; SARDO, M.A; TRIMARCHI, G; BONAIUTO, M; FONTANA, L; CASTALDO, M; BONAIUTO, A; SAITTA, C; BITTO, A; MANDUCA, B; RIGGIO, S; SAITTA, A. Association between serum paraoxonase (PON1) gene promoter T(-107)C polymorphism, PON1 activity and HDL levels in healthy Sicilian octogenarians. *Experimental Gerontology.* 39: 1089-1094, 2004. CORREIA, J.D. Modulação Dietética das Paraoxonases: Revisão de Estudos em humanos. Porto Alegre, 2009.

COSTA, L.G; VITALONE, A; COLE, T.B; FURLONG, C. E. Modulation of paraoxonase (PON1) activity. *Biochemical Pharmacology* 69: 2005 541–550, 2005.

FAVARIN, M.E. Avaliação do polimorfismo genético e atividade da enzima paraoxonase em pacientes hipercolesterolêmicos. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, 2004.

FERRÉ, N; CAMPS, J; FERNÁNDEZ-BALLART, J; ARIJA, V; MURPHY, M.M; CERUELO, S; BIARNÉS, E; VILELLA, E; TOUS, M; JOVEN, J. Regulation of Serum Paraoxonase Activity by Genetic, Nutritional, and Lifestyle Factors in the General Population. *Clinical Chemistry* vol. 49 no. 9: 1491-1497, 2003.

FERRI, L. A. F. Polimorfismos no gene paraoxonase1 como preditores de efeitos cardiovasculares em pacientes com doença coronária estável. 164f. Tese de Doutorado - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

FERNANDES, A.B. Evolução Molecular dos genes PON1, PON2 e PON3. Monografia para obtenção de título em Bacharel em Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 2007.

HOFER, S. E.; BENNETTS, B.; CHAN, A. K.; HOLLOWAY, B.; KARSCHIMKUS, C.; JENKINS, A. J.; SILINK, M.; DONAGHUE, K. C. Association between PON 1 polymorphisms, PON activity and diabetes complications. *J Diabetes Complications*, 20(5): 322-8, 2006.

KIM, D.S, MADEN, S.K, BURT, A.A, RANCHALIS, J.E, FURLONG, C.E, JARVIK, G.P. Dietary fatty acid intake is associated with paraoxonase 1 activity in a cohort-based analysis of 1,548 subjects. *Lipids Health Dis* 12: 183. doi: 10.1186/1476-511X-12-183. 2013.

KULIE, T; SLATTENGREN, A; REDMER, J; COUNTS, H; EGLASH, A; SCHRANGER, S. Obesity and Women's Health: An Evidence-Based Review. *J Am Board Fam Med* vol. 24 no. 175-85, 2011.

LI, H.L; LIU, D.P; LIANG, C.G. Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress, and diseases. *J. Mol. Med.* 81(12): 766-79), 2003.

LORENÇATTO, C; VIEIRA, M. J. N; PINTO, C. L. B; PETTA, C. a. Avaliação da frequência de depressão em pacientes com endometriose e dor pélvica. *Revista da Associação Médica Brasileira* vol.48 n.3 São Paulo, 2002.

MACEDO, C.G. Estudo das paraoxonases 1, 2 e 3 em pacientes portadores de anemia falciforme. *Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paula, São Paulo, 2013.*

MOHAMMADI, E.; RAFRAF, M. Benefits of Omega-3 Fatty Acids Supplementation on Serum Paraoxonase 1 Activity and Lipids Ratios in Polycystic Ovary Syndrome. *Health promotion Perspectives*, vol. 2, No. 2. P: 197-204, 2012.

RINCON JA ; MADEIRA EM ; CAMPOS FT ; MION B ; SILVA JF ; ABSALON MEDINA VA ; BUTLER WR ; CORRÊA MN ; PEGORARO LMC ; SCHNEIDER, A . Effect of paraoxonase 1 (PON1) during oocyte maturation and subsequent development of IVP bovine embryos.In: 28 Reunião Anual da Sociedade Brasileira

de Tecnologia de Embriões. *Animal Reproduction*, 2014. v. 11. p. 425-425. Natal – RN, 2014.

RODRIGUES, F. O. P; CREMONEZI, C. J; TRONCON, F.R; ARRUDA, I. L; WANDA, D.R; GARCIA, P. Metabolic and Nutritional Interfaces in Polycystic Ovary Syndrome: Considerations Regarding Obesity and Dietary Macronutrients. *Revista Chil. Nutr* Vol. 36, Nº3, 2009.

SILVA, A. L. B; SEIBEL, S. A; CAPP, E; CORLETA, H. E; Miomas e infertilidade: bases fisiopatológicas e implicações terapêuticas. *Revista Brasileira de Saúde Materna*.Vol. 1 p. 13-18.Recife, 2005.

1000 Genomes A Deep Catalog of Human Genetic Variation. Disponível em:
<http://browser.1000genomes.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=7:94953395-94954395;v=rs705379;vdb=variation;vf=564384>