Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

**Associação entre polimorfismos de nucleotídeo único
relacionados aos genes da proteína C reativa, TNF- α e
IL-10 e ácidos graxos plasmáticos e seus efeitos sobre um
padrão inflamatório sistêmico em estudo de base
populacional – ISA-Capital**

ÉRICA OKI

**Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação Nutrição em
Saúde Pública da Faculdade de Saúde
Pública da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências.**

**Área de concentração: Nutrição em
Saúde Pública**

**Orientador: Prof. Dr. Marcelo Macedo
Rogero**

São Paulo
2015

Associação entre polimorfismos de nucleotídeo único relacionados aos genes da proteína C reativa, TNF- α e IL-10 e ácidos graxos plasmáticos e seus efeitos sobre um padrão inflamatório sistêmico em estudo de base populacional – ISA-Capital

Érica Oki

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação Nutrição em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Nutrição em Saúde Pública

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Macedo Rogero

**São Paulo
2015**

DEDICATÓRIA

*À minha família, base da minha vida, que mesmo longe sempre me apoiou com
um amor sem fim.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por tudo em minha vida, por cada segundo vivido, por cada experiência adquirida, por cada força interior dada, pelos caminhos guiados, por tudo enfim.

Aos meus pais, bachan e dichan, pela compreensão de eu ficar longe e pela recepção alegre e cheia de amor quando volto para casa, pelo apoio em todas as escolhas de minha vida e pelo amor incondicional.

Ao meu irmão, Fábio, que por ser estatístico foi alvo de muitas perguntas e dúvidas. Mas tenha certeza que suas explicações foram de grande importância para o meu aprendizado.

Ao meu professor orientador, Marcelo, pela amizade, paciência, ensinamentos, dedicação, por ter acreditado em mim e me dado esta maravilhosa oportunidade.

À Marina, grande parceira, amiga, confidente e com tantas outras qualidades. Obrigada pela amizade, esse mestrado não teria sido o que foi sem você junto.

À Naice, pela grande amizade, companheirismo, conselhos e por ser grande incentivadora das minhas buscas profissionais acadêmicas. Sem você, não teria chegado aonde cheguei.

Ao Massa, por todo o apoio, carinho e por toda a compreensão, principalmente nessa reta final do mestrado.

À professora Dirce e professora Regina por disponibilizar dados do ISA-Capital, tornando possível esse mestrado.

Aos professores colaboradores, José Maria Pacheco e Silva e Inar Alves Castro, pela grande contribuição que fizeram para o presente trabalho.

Ao Augusto, pela amizade, paciência, dedicação, eficiência e por todo genial ensinamento que nos foi passado.

Às técnicas do laboratório, Ivanir, Rosana e a nossa quase mãe Geni, pela paciência, dedicação, ensinamentos e amizade ao longo desse mestrado.

Às companheiras do grupo de pesquisa: Ângela, Tati, Moniquinha, Bruna, Vanessa e Rezinha, por compartilhar estudos, aprendizados e amizade.

Às minhas amigas de bandejões, happy hours, loucuras e muitas risadas: Julia, Cá Pruper, Marcella, Flavia, Diana, Thais, Alexandra, Patrícia, Camila Morgado, Camila Rocha, Bianka, Nidi Dias. Obrigada pela amizade e por me acolher em seus laboratórios.

Aos secretários da Pós-Graduação, Alessandra e Diego, e do Departamento de Nutrição, Eduardo, pela alta eficiência e paciência.

Às minhas companheiras da Rep GS, Luli, Sua e Hindira por fazer da minha vida, fora da faculdade, leve e graciosa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida (processo nº 2013/01741-4), permitindo meu sustento e dedicação exclusiva à pesquisa.

À todos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão do presente trabalho.

RESUMO

Oki, E. **Associação entre polimorfismos de nucleotídeo único relacionados aos genes da proteína C reativa, TNF- α e IL-10 e ácidos graxos plasmáticos e seus efeitos sobre padrão inflamatório sistêmico em estudo de base populacional – ISA-Capital.** [Defesa de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 2015.

Introdução: Variações genéticas podem influenciar a relação entre ácidos graxos (AG) do plasma e concentração plasmática de biomarcadores inflamatórios. **Objetivo:** Verificar a associação entre polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) presentes nos genes da proteína C reativa (PCR), fator de necrose tumoral (TNF)- α e interleucina (IL)-10 e AG do plasma e seus efeitos sobre a concentração plasmática de biomarcadores inflamatórios em um estudo de base populacional ISA-Capital. **Métodos:** Foram coletadas informações sociodemográficas, de estilo de vida, de atividade física (IPAQ longo), hábito de fumar e beber, bem como amostras de sangue de 281 indivíduos (20 a 59 anos), oriundos de um estudo de base populacional (ISA-Capital). A partir do plasma, foram determinadas as concentrações de IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , IL12p70, adiponectina, PCR, proteína quimiotática para macrófagos solúvel (sMCP)-1, molécula de adesão intercelular solúvel (sICAM)-1 e molécula de adesão celular vascular solúvel (sVCAM)-1 por meio da técnica multiplex de imunoensaio e o perfil de ácidos graxos por cromatografia gasosa. O DNA genômico foi extraído e realizada a genotipagem dos SNP presentes no gene da PCR (rs1205, rs1417938, rs2808630), TNF- α (rs1799964, rs1799724, rs1800629 e rs361525) e IL-10 (rs1800871, rs1800896 e rs1800872) pela técnica TaqMan Open Array. Foi realizada análise multivariada de cluster com base nos 11 biomarcadores inflamatórios, permitindo agrupar os indivíduos em grupo “inflamado” e cluster “não inflamado”. **Resultados:** Os indivíduos que possuíam os genótipos GA+AA do SNP -238 G>A (rs361525) do gene do TNF- α apresentaram concentrações plasmáticas de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e IL-12 aumentadas quando comparados com indivíduos homozigotos dominantes. Além disso, homozigotos recessivos do SNP e/i *boundary* C>T (rs1554286) do gene da IL-10 apresentaram maior concentração plasmática de IL-1 β e de TNF- α e menor de MCP-1 em relação aos indivíduos homozigotos

dominantes. O grupo “inflamado” apresentou idade, circunferência da cintura, pressão arterial significativamente maiores que o grupo não inflamado. Em relação aos AG do plasma, o grupo inflamado apresentou concentração plasmática de AG palmítico (C16:0), razões AG saturados (SFA)/AG ômega-6 (n-6) e SFA/ AG poli-insaturados (PUFA) e atividade estimada da enzima esteroil CoA desaturase (SCD) aumentadas e concentrações plasmática de PUFA, n-6 e AG araquidônico (AA) e atividade estimada da enzima delta-5-desaturase (D5D) reduzidas em comparação com o grupo não inflamado. Interações SNP-AG plasmáticos estatisticamente significante foram detectadas entre o SNP +1919 A>T (rs1417938) do gene da PCR e C16:1n-7, SFA/n-6 e SFA/PUFA; entre o SNP +3872 G>A (rs1205) do gene da PCR e C16:1n-7; entre o SNP *e/i boundary* C>T (rs1554286) do gene da IL-10 e atividade estimada da enzima D6D; e entre o SNP -1082 A>G (rs1800896) do gene da IL-10 e C18:0, C14:0 e atividade estimada da enzima D5D. **Conclusão:** Os SNP analisados possuem associações com biomarcadores inflamatórios e os ácidos graxos plasmáticos palmítico, SFA/n-6, SFA/PUFA, SCD-18 foram associados positivamente com um padrão inflamatório, enquanto PUFA, n-6, ácido araquidônico e D5D foram negativamente associados. Dentre as interações encontradas, o AG palmitoleico e a razão SFA/PUFA interagiram com +1919 A>T (rs1417938), e os AG esteárico e mirístico e D5D com -1082 A>G.

Descritores: polimorfismos de nucleotídeo único, biomarcadores inflamatórios, lipídios, nutrigenética.

ABSTRACT

Oki, E. **Association between single nucleotide polymorphism in genes of CRP, TNF- α and IL-10 and plasma fatty acids and their effect to a systemic inflammatory pattern at a population-based study – ISA-Capital.** [final examination of Master degree in Public Health Nutrition]. São Paulo: School of Public Health of the University of São Paulo; 2015.

Introduction: Genetics variation can influence the relation between fatty acids (FA) and inflammatory biomarkers levels. **Objective:** To verify the association between Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) in adiponectin, C-Reactive Protein (CRP), Tumor Necrosis Factor (TNF)- α and Interleukin (IL)-10 genes and plasma fatty acids and their effects to a systemic inflammatory pattern at a population-based study. **Methods:** Sociodemographics information, life style, physical activity (IPAQ long form), smoking and drinking habits, as well as blood samples of 281 individuals (20 years – 59 years) participants of a population based study (ISA-Capital). Plasma IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , IL12p70, adiponectin, CRP, soluble monocyte chemoattractant protein-1 (sMCP-1), soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) and soluble vascular cell adhesion molecule 1 (sVCAM-1) levels were measured using a multiplex immunoassay and the fatty acid profile was measured by gas chromatography. The DNA was extracted and genotyping of SNP in CPR gene (rs1205, rs1417938, rs2808630), TNF- α (rs1799964, rs1799724, rs1800629 e rs361525) and IL-10 (rs1800871, rs1800896 e rs1800872) was analyzed by TaqMan Open Array. Multivariate cluster analysis was applied on 11 inflammatory biomarkers, allowing to group individuals in inflammatory (INF) or non-inflammatory (NINF) group. **Results:** Individuals with GA+AA genotypes of SNP -238 G>A (rs361525) of TNF- α gene had higher levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 and IL-12 compared to GG genotype. Besides that, recessive homozygous of SNP *e/i boundary* C>T (rs1554286) of IL-10 gene presented higher level of IL-1 β and TNF- α and lower level of sMCP-1 in relation to dominant homozygous. The INF group had significantly higher age, waist circumference, blood pressure, and total cholesterol than NINF group. Concerning fatty acid profile, INF group had palmitic acid (C16:0), saturated fatty acid (SFA)/omega-6 (n-6) polyunsaturated fatty acid (PUFA) ratio, SFA/PUFA and estimated enzyme activity of stearoyl-CoA desaturase (SCD) levels higher and PUFA, n-6, arachidonic

acid and estimated enzyme activity of delta-5 desaturase (D5D) levels lower than NINF group. Significantly interactions were found between of SNP +1919 A>T (rs1417938) of PCR and C16:1n-7, SFA/n-6 and SFA/PUFA; between SNP +3872 G>A (rs1205) of PCR gene and C16:1n-7; between SNP e/i *boundary* C>T (rs1554286) of IL-10 and estimated enzyme activity of delta-6 desaturase (D6D); and between SNP -1082 A>G (rs1800896) of IL-10 gene and C18:0, C14:0 and estimated D5D activity. **Conclusion:** The SNP analyzed have associations with inflammatory biomarkers, and plasma palmitic, SFA/n-6, SFA/PUFA, SCD-18 were positively associated with inflammatory pattern, while PUFA, n-6, arachidonic acid and D5D were negatively associated. Interactions were founded with palmitoleic and SFA/PUFA with +1919 A>T (rs1417938), and stearic and myristic acids and D5D with 1082 A>G.

Descriptors: single nucleotide polymorphism, inflammatory biomarkers, lipids, nutrigenetics.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 DOENÇAS CRÔNICAS NÃO TRANSMISSÍVEIS, OBESIDADE E PADRÕES DE DIETA	15
1.2 DOENÇAS CRÔNICAS NÃO TRANSMISSÍVEIS, OBESIDADE E INFLAMAÇÃO ..	17
1.3 INFLAMAÇÃO E LIPÍDIOS	20
1.4 POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO E INFLAMAÇÃO	24
2 HIPÓTESE DO ESTUDO	29
3 OBJETIVOS	30
3.1 OBJETIVO GERAL.....	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4 MÉTODOS.....	31
4.1 AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA	32
4.2 AFERIÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL	32
4.3 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE MATERIAL BIOLÓGICO...	33
4.3.1 Uso de Medicamentos	33
4.3.2 Análise de biomarcadores inflamatórios e perfil lipídico.....	33
4.3.3 Análise dos ácidos graxos do plasma	34
4.3.4 Genotipagem.....	36
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
6 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA	40
7 RESULTADOS	41
7.1 DESCRIÇÃO DOS DADOS.....	41
8 ASSOCIAÇÃO ENTRE PRESENÇA DE SNP SOBRE A CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS	46
8.1.1 SNP do gene do TNF- α	46
8.1.2 SNP do gene da PCR.....	50
8.1.3 SNP do gene da IL-10	53
8.2 ANÁLISE MULTIVARIADA DE CLUSTER.....	56
8.2.1 Descrição dos grupos formados.....	56
8.2.2 Associação entre os grupos inflamados e ácidos graxos plasmáticos	59
8.2.3 Associação entre SNP e grupos formados pela Análise Multivariada de Cluster.....	61
8.3 INTERAÇÃO ENTRE ÁCIDOS GRAXOS DO PLASMA E PRESENÇA DE SNP SOBRE A CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS	63
8.3.1 SNP do gene do TNF- α	63
8.3.2 SNP do gene da PCR.....	69
8.3.3 SNP do gene da IL-10	72
9 DISCUSSÃO	75
10 CONCLUSÃO.....	84
REFERÊNCIAS	85
ANEXO 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características antropométricas, biomarcadores inflamatórios da população estudada. ISA-capital, São Paulo, 2008-2010.	41
Tabela 2 - Distribuição da população segundo características extraídas do inquérito de saúde. ISA-capital, São Paulo, 2008-2010.	42
Tabela 3 - Frequência dos genótipos e dos alelos de cada SNP com seu respectivo valor de χ^2	43
Tabela 4 - Associação entre SNP do TNF- α -857 C>T (rs1799724) e concentração plasmática de biomarcadores inflamatórios.....	46
Tabela 5 - Associação entre SNP do TNF- α -238 G>A (rs361525) e concentração plasmática de biomarcadores inflamatórios.....	47
Tabela 6 - Associação entre SNP do TNF- α -1031 T>C (rs1799964) e concentração plasmática de biomarcadores inflamatórios.	48
Tabela 7 - Associação entre SNP do TNF- α -308 G>A (rs1800629) e concentração de biomarcadores inflamatórios.	49
Tabela 8 - Associação entre SNP da PCR +5237 A>G (rs2808630) e concentração de biomarcadores inflamatórios.	50
Tabela 9 - Associação entre SNP da +1919 A>T (rs1417938) e concentração plasmática de biomarcadores inflamatórios.	51
Tabela 10 - Associação entre SNP da PCR +3872 A>G (rs1205) e concentração de biomarcadores inflamatórios.	52
Tabela 11 - Associação entre SNP e/i <i>boundary</i> C>T (rs1554286) da IL-10 e concentração plasmática de biomarcadores inflamatórios.	54
Tabela 12 - Associação entre SNP -1082 A>G (rs1800896) da IL-10 e concentração plasmática de biomarcadores inflamatórios.	55
Tabela 13 - Concentração plasmática de biomarcadores inflamatórios segundo grupos formados. ISA-capital, São Paulo, 2008-2010.	56
Tabela 14 - Características antropométricas e bioquímicas segundo grupos formados. ISA-capital, São Paulo, 2008-2010.	57
Tabela 15 - Distribuição de indivíduos segundo grupos formados e características extraídas do inquérito de saúde. ISA-capital, São Paulo, 2008-2010.	58
Tabela 16 - Ácidos Graxos do plasma segundo grupos formados. ISA-capital, São Paulo, 2008-2010.	59
Tabela 17 - Associação entre SNP do gene do TNF- α e grupos formados.	61
Tabela 18 - Associação entre SNP do gene da PCR e grupos formados.	61
Tabela 19 - Associação entre SNP do gene da IL-10 e grupos formados.	62
Tabela 20 - OR (IC95%) para grupo inflamado no percentil maior (acima da mediana) de AG do plasma, estratificado por genótipos dos SNP do gene do TNF- α	65
Tabela 20 - OR (IC95%) para grupo inflamado no percentil maior (acima da mediana) de AG do plasma, estratificado por genótipos dos SNP do gene do TNF- α (continuação).	66
Tabela 21 - OR (IC95%) para grupo inflamado no percentil maior (acima da mediana) de AG do plasma, estratificado por genótipos dos SNP do gene do TNF- α	67

Tabela 21 - OR (IC95%) para grupo inflamado no percentil maior (acima da mediana) de AG do plasma, estratificado por genótipos dos SNP do gene do TNF- α (continuação).....	68
Tabela 22 - OR (IC95%) para grupo inflamado no percentil maior (acima da mediana) de AG do plasma, estratificado por genótipos dos SNP do gene da PCR.	70
Tabela 22 - OR (IC95%) para grupo inflamado no percentil maior (acima da mediana) de AG do plasma, estratificado por genótipos dos SNP do gene da PCR (continuação)	71
Tabela 23 - OR (IC95%) para grupo inflamado no percentil maior (acima da mediana) de AG do plasma, estratificado por genótipos dos SNP do gene da IL-10.....	73
Tabela 23 - OR (IC95%) para grupo inflamado no percentil maior (acima da mediana) de AG do plasma, estratificado por genótipos dos SNP do gene da IL-10 (continuação).....	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desequilíbrio de ligação (R^2) entre os SNP do gene do TNF- α	44
Figura 2 - Desequilíbrio de ligação (R^2) entre os SNP do gene da PCR.....	44
Figura 3 - Desequilíbrio de ligação (R^2) entre os SNP do gene da IL-10.	45

LISTA DE ABREVIATURAS

AG	Ácidos Graxos
AGL	Ácidos Graxos Livres
MUFA	Ácidos graxos monoinsaturados
PUFA	Ácidos graxos poliinsaturados
SFA	Ácidos graxos saturados
ALA	Ácido α -linolênico
AP-1	Proteína ativadora-1
COX	Ciclooxigenase
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DCV	Doenças cardiovasculares
DHA	Ácido docosaexaenoico
DM2	Diabete melito do tipo 2
EPA	Ácido eicosapentaenoico
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
GPR	Receptor de proteína acoplado à proteína G
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICAM	Molécula de adesão intercelular
IL	Interleucina
IMC	Índice de massa corpórea
IPAQ	Questionário internacional de atividade física
LA	Ácido linoleico
LOX	Lipooxigenase
LT	Leucotrieno
MCP	Proteína quimiotática para monócito
MPM	Multiple Pass Method
n-3	Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3
n-6	Ácidos graxos poliinsaturados ômega-6
NF κ B	Fator de transcrição nuclear κ B
PAI-1	Inibidor do fator ativador de plasminogênio 1
PCR	Proteína C Reativa
PCR	Reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction)
PE	Ficoeritrina
PG	Prostaglandina
PNAD	Pesquisa Nacional por Amostra Domiciliar
POF	Pesquisa de Orçamento Familiar
PPAR	Receptor de Proliferador de Peroxissomo
PREDIMED	Prevencion com Dieta Mediterranea
QFA	Questionário de frequência alimentar
R24H	Recordatório de 24 horas
RI	Resistência à ação da insulina
SM	Síndrome Metabólica
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único (Single nucleotide polymorphism)
TARF	Turkish Adult Risk Factor Study
TG	Triacilglicerol
TLR	Receptor do tipo Toll (Toll like receptor)

TNF	Fator de necrose tumoral
TX	Tromboxanos
VCAM	Molécula de adesão vascular
VIGITEL	Vigilância de Fatores de Risco e Proteção de Doença Crônica por Inquérito Telefônico
SCD	Estearoil-CoA Desaturase
D5D	Delta-5-Desaturase
D6D	Delta-6-Desaturase
JNK	c-Jun N-terminal quinase
Th	Linfócitos T helper
Treg	Linfócitos T reguladoras
IKK	Quinase do inibidor do kappa B
RE	Retículo Endoplasmático
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇAS CRÔNICAS NÃO TRANSMISSÍVEIS, OBESIDADE E PADRÕES DE DIETA

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), que englobam, por exemplo, as doenças cardiovasculares (DCV), câncer, diabetes melito tipo 2 (DM2) e doenças respiratórias crônicas, foram responsáveis por cerca de 36 milhões das 56 milhões de mortes totais ocorridas em 2012 no mundo, correspondendo a 64% das mortes. A projeção para 2030 é de 52 milhões de mortes causadas pelas DCNT (WHO, 2014). No Brasil, as mortes por DCNT foram maiores que a média mundial, representando 74% do total das causas de mortes (WHO, 2014). Esse cenário gera grande impacto na sociedade, uma vez que eleva as mortes prematuras, diminui a qualidade de vida e acarreta em ônus econômicos para os indivíduos, famílias e a sociedade em geral (MALTA, 2014).

O aumento da prevalência das DCNT ocorre como consequência da transição demográfica, epidemiológica e nutricional observada no último século, adquirindo novos estilos de vida (HABIB e SAHA, 2010). A ingestão de alimentos com alta densidade energética e baixa densidade nutricional, aliada à ingestão de álcool, ao uso do tabaco e ao sedentarismo contribuem para a crescente prevalência das DCNT (WHO, 2010).

Com o advento da modernização da sociedade, mudanças ocorridas no ambiente em que vivemos e o estilo de vida adotado, resultaram na adoção de um padrão de dieta caracterizado pelo alto consumo de açúcares, ácidos graxos saturados e trans, denominado dieta ocidental (POPKIN et al., 2011; DIXON, 2010). Dentro do cenário brasileiro, dados comparativos entre aquisições alimentares domiciliares realizadas pelas POF mostram uma tendência secular na mudança do padrão alimentar da população. Os inquéritos realizados entre 1974/1975 e 2002/2003 mostraram tendência desfavorável, com aumento do consumo de açúcar e de lipídios, principalmente saturados, bem como aumento de até 400% no consumo de produtos industrializados, como biscoitos e refrigerantes. Houve declínio

relacionado à ingestão de alimentos básicos e tradicionais, como, arroz, feijões e outras leguminosas, raízes e tubérculos e ovos, bem como redução do consumo de frutas e hortaliças (LEVY-COSTA et al., 2005). Esta tendência de aumento do consumo de alimentos industrializados em detrimento de alimentos básicos foi também observada na POF realizada entre 2008 e 2009 (LEVY et al., 2012), com uma piora na qualidade da dieta quando consumida fora do domicílio (BEZERRA et al., 2013). Cabe destacar que esses fatos corroboram para o atual cenário epidemiológico brasileiro das DCNT.

A obesidade tem se destacado no cenário epidemiológico mundial, sendo considerada um problema crescente de saúde pública na atualidade, bem como importante fator de risco para o desenvolvimento das DCNT, como diabetes, doença arterial coronariana (DAC), acidente vascular cerebral (AVC), alguns cânceres, apnéia do sono obstrutiva, osteoartrite e hipertensão arterial (DIXON, 2010; WHO, 2014). Dados do Brasil, a partir dos resultados na Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) de 2003/2004 (IBGE, 2004), o excesso de peso (índice de massa corporal (IMC) ≥ 25 kg/m²) apresentava-se prevalente em 40,6% e a obesidade (IMC ≥ 30 kg/m²) em 11,1% dos adultos (≥ 20 anos). Na POF de 2008/2009 (IBGE, 2011), a prevalência do excesso de peso elevou-se para 49% em indivíduos adultos e a obesidade para 14,8% dos mesmos. Dados mais recentes divulgados pelo Ministério da Saúde referentes aos dados preliminares da Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL) de 2014 mostram que o excesso de peso vem aumentando desde o início do monitoramento, atingindo 52,5% da população, enquanto a obesidade mantém-se estável nos últimos três anos, com 17,9% da população (BRASIL, 2015).

Esta tendência aumentada do excesso de peso é também verificada em várias regiões do mundo (LOW, CHIN, DEURENBERG-YAP, 2009; WHO, 2014), sendo que a prevalência mundial da obesidade dobrou entre 1980 a 2014. Em 1980, a prevalência mundial de obesidade era de 5% para os homens e de 8% para as mulheres. Em 2014, esses valores aumentam para 11% e 15% para homens e mulheres, respectivamente, correspondendo a mais de meio bilhão de indivíduos com IMC >30 kg/m² (WHO, 2012; WHO, 2014). Em 2030, estima-se que a obesidade poderá atingir 45% da população mundial (KELLY et al., 2008).

1.2 DOENÇAS CRÔNICAS NÃO TRANSMISSÍVEIS, OBESIDADE E INFLAMAÇÃO

O aumento de gordura corporal representa relevante fator de risco para DCNT, uma vez que o excesso de peso e obesidade estão intimamente associados com o aumento da concentração plasmática de biomarcadores inflamatórios. Nesse contexto, é possível constatar a presença de um quadro de inflamação crônica, sistêmica e de baixa intensidade (inflamação subclínica) nas DCNT (CALDER et al., 2011), que está intimamente relacionada com o desenvolvimento da resistência à ação da insulina (RI), do DM2, da aterosclerose e da síndrome metabólica (SM) (HOTAMISLIGIL, 2006).

Essa inflamação subclínica na obesidade caracteriza-se por ser metabólica, pelo consumo em excesso de nutrientes, a qual promove modificação da composição celular presente nos tecidos para um perfil de células pró-inflamatórias e é crônica, culminando em uma homeostase metabólica anormal, cujo fato a difere da inflamação aguda, que tende a ser resolutive (GREGOR e HOTAMISLOIGIL, 2011; LEE e LEE, 2014).

O tecido adiposo possui adipócitos que secretam adipocinas e citocinas, além de hormônios, e possui também uma população de células imunes residentes. O tecido adiposo branco visceral de um indivíduo magro possui adipócitos com tamanhos menores e células imunes como células T helper (Th)2, células T reguladoras (Treg), eosinófilos e macrófagos com fenótipo M2. Essas células secretam citocinas anti-inflamatórias como a interleucina (IL)-4, IL-10, IL-13, os quais formam um ambiente com fenótipo que promove adequada sensibilidade à ação da insulina (OSBORN e OLEFSKY, 2012). Entretanto, com o excesso da ingestão calórica, os adipócitos hipertrofiam e ocorre uma microhipóxia devido a menor perfusão de sangue e, conseqüentemente de oxigênio no tecido adiposo. Nessa condição, o tecido adiposo ativa vias inflamatórias, como a via da c-Jun N-terminal quinase (JNK) e da quinase do inibidor do kappa B (IKK)- β , bem como há aumento do estresse do retículo endoplasmático (RE). A ativação dessas vias inflamatórias induz a secreção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, como a proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) e leucotrieno (LT) B4, recrutando monócitos que se diferenciam em macrófagos (fenótipo

proinflamatório M1), além de outras células imunes, intensificando a inflamação no tecido adiposo. Além disso, a obesidade altera o padrão de células imunes residentes, diminuindo a população de eosinófilos, de linfócitos Treg e Th2 e aumento das células Th1, T citotóxicas e células B tornando o ambiente de anti-inflamatório para pró-inflamatório, culminando em RI nas células adiposas, provocando, em consequência, um aumento da liberação de ácidos graxos livres (AGL). As citocinas liberadas principalmente pelas células imunes possuem ações autócrinas, parácrinas e sistêmicas e, juntamente com o AGL, acarreta em distúrbios metabólicos em outros tecidos (SHENK, SABERI, OLEFSKY, 2008; OSBORN e OLEFSKY, 2012).

O padrão de inflamação também está relacionado à localização do tecido adiposo branco, uma vez que o tecido adiposo visceral apresenta células adiposas maiores e elevada capacidade de expressão de adipocinas pró-inflamatórias e da atividade lipolítica, o que favorece a ocorrência da RI. Por outro lado, células do tecido adiposo subcutâneo apresentam menor tamanho celular e capacidade de secreção de adipocinas com ação pró-inflamatórias, bem como maior sensibilidade à ação da insulina e capacidade de captação de ácidos graxos (AG) (IBRAHIM, 2010).

A obesidade também está associada com a inflamação em outros tecidos, como o tecido hepático, no qual o metabolismo lipídico alterado e a RI, promove o acúmulo de lipídios devido ao aumento da lipogênese *de novo*, diminuição da oxidação lipídica e aumento da captação de AGL secretados pelo tecido adiposo branco, culminando na doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA). Com o desenvolvimento da DHGNA, ocorrem várias outras alterações hepáticas, como aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias, ativação das células de Kupffer, disfunção mitocondrial, com diminuição da capacidade oxidativa, danos oxidativos, apoptose, secreção de fatores pró-fibrinogênicos entre outros múltiplos fatores que, coletivamente, estimulam a inflamação, apoptose e fibrose no fígado (JUNG e CHOI, 2014).

No músculo esquelético, depósitos de lipídios intramusculares são acumulados e recrutam macrófagos para esses locais. Similarmente ao que ocorre no tecido adiposo, os

macrófagos infiltrados no músculo esquelético secretam citocinas pró-inflamatórias, resultando em inflamação e RI. Há um profundo impacto da RI no músculo esquelético, uma vez que este representa o principal local de captação de glicose, o que acarreta em aumento da glicemia. Nas ilhotas pancreáticas, também há acúmulo de macrófagos e, portanto, inflamação e RI. O impacto da inflamação nesse tecido resulta na redução da secreção de insulina e desencadeia a apoptose das células β , progredindo para o DM2 (LUMENG e SALTIEL, 2011; OSBORN e OLEFSKY, 2012).

O conceito de que a inflamação está relacionada com a obesidade e outras doenças metabólicas é bem aceito, contudo, a origem da resposta inflamatória na obesidade ainda necessita ser explorada. GREGOR e HOTAMISLIGIL (2011) propuseram algumas hipóteses para explicar a origem da inflamação associada à obesidade. Uma interessante hipótese seria a de que em sucessivos períodos alternados de jejum e alimentação, uma resposta inflamatória ocorreria de forma pulsátil no período pós-prandial. Na obesidade, ao invés da inflamação retornar aos níveis basais, como na situação normal, o constante estímulo alimentar resultaria em uma resposta inflamatória mais consistente e aumentada. A partir de um determinado limiar, as células do sistema imune seriam recrutadas e ativadas, alterando o padrão de secreção e intensificando a inflamação no tecido adiposo.

1.3 INFLAMAÇÃO E LIPÍDIOS

Nos últimos 30 anos, as evidências demonstram que não apenas a quantidade de AG da dieta é importante para o desenvolvimento das doenças metabólicas, mas também a qualidade desses AG. Nesta relação entre DCNT e inflamação, AG oriundos da alimentação contribuem para efeitos pró-inflamatórios ou anti-inflamatórios no organismo, de acordo com a sua estrutura química (ALCOCK et al., 2012; LESNÁ et al., 2013). Este fato é de extrema importância, uma vez que a atual dieta ocidental se caracteriza pela elevada ingestão de lipídios (NETTLETON et al., 2013).

Os ácidos graxos saturados (SFA) estão relacionados com o aumento do risco cardiovascular, elevação da concentração plasmática de biomarcadores inflamatórios, como, por exemplo, a proteína C reativa (PCR) e a IL-6 (FERNÁNDEZ-REAL, et al., 2003; KING, EGAN, GEESEY, et al. 2003; KLEIN-PLATAT et al., 2005; DEVARAJ et al., 2006; GOLZARAND et al., 2010), bem como aumento da expressão de genes pró-inflamatórios no tecido adiposo branco (Van DIJIK et al., 2009). Não apenas os saturados totais, mas determinados SFA têm demonstrado efeitos sobre a inflamação. Em estudo *cross-over* aleatorizado em homens (BAER et al., 2004), após o consumo de dieta enriquecida com ácido esteárico (C18:0) (8% em relação ao valor calórico total (VCT)), constatou-se aumento significativo da concentração plasmática de fibrinogênio, PCR e IL-6 em comparação à dieta com carboidratos (54,6% do valor calórico total (VCT), sendo 8,5% correspondente a carboidratos digeríveis). Após consumo de uma dieta adicionada com uma combinação de láurico (C12:0), mirístico (C14:0) e esteárico (C18:0) (8% VCT) verificou-se aumento da concentração plasmática de IL-6. Os AG láurico e mirístico da dieta também foram positivamente associados com a concentração plasmática de PCR, em um estudo transversal com indivíduos participantes do EPIPorto Study (SANTOS et al., 2013). FOROUHI et al. (2014), em estudo caso-coorte da *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition Study (EPIC)-InterAct study*, avaliando resultados de 27.296 indivíduos, verificaram que os AG mirístico, palmítico e esteárico presentes nos fosfolipídios plasmáticos foram positivamente associados com o desenvolvimento de DM2.

Um dos mecanismos relacionados à ativação da resposta inflamatória induzida pelos SFA decorre da capacidade desses nutrientes se ligarem aos receptores do tipo Toll (TLR)-4 em diferentes tipos celulares, como adipócitos e macrófagos (Van DIJK et al., 2009; BAKER, HAYDEN, GHOSH, 2011). O TLR-4 reconhece lipopolissacarídeos (LPS), estrutura presente em bactérias gram-negativas, culminando na ativação do fator de transcrição designado fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B), o que resulta no aumento da expressão de genes que codificam citocinas com ação pró-inflamatória (OSPELT e GAY, 2010). O lipídio A, porção lipídica endotóxica do LPS, contém AG láurico, mirístico e palmítico, que poderia se ligar e ativar o TLR-4 (FESSLER; RUDEL; BROWM, 2009). Além disso, a alta disponibilidade de SFA, como o AG palmítico, resulta em síntese de ceramida, um produto intermediário do metabolismo de ácidos graxos, o qual inibe a via Akt/PKB, e ativa vias inflamatórias como IKK e JNK, resultando em RI (SCHENK; SABERI; OLEFSKY, 2008).

Enquanto os SFA estão relacionados com aumento a concentração de biomarcadores pró-inflamatórios, os ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) possuem característica anti-inflamatória. A dieta mediterrânea caracteriza-se pela alta ingestão de frutas, hortaliças, grãos integrais, leguminosas, nozes, peixes e baixa ingestão de carnes vermelhas, sendo a principal fonte de lipídios, o azeite de oliva (CALDER et al., 2012). Vários estudos clínicos evidenciaram que esse padrão de dieta promove redução da concentração plasmática da PCR de alta sensibilidade, da IL-6, da IL-8, da IL-18 e do fibrinogênio (GALLAND, 2010). Em pacientes participantes do estudo *Prevencion com Dieta Mediterranea* (PREDIMED), este padrão alimentar promoveu diminuição da concentração plasmática da IL-6, molécula de adesão intercelular (ICAM)-1, molécula de adesão celular vascular (VCAM)-1 e PCR (URPI-SARDA et al., 2012). Em outro estudo, realizado em homens com SM, após ingestão da dieta mediterrânea, por 5 semanas, sem perda de peso, foi verificada redução da concentração plasmática da PCR (RICHARD et al., 2012), demonstrando seu efeito benéfico na redução do risco cardiovascular. Além disso, os MUFA estão associados com redução da adiposidade e melhora do perfil de secreção de adipocinas e da sensibilidade à ação da insulina no tecido adiposo (SIRIWARDHANA et al., 2013).

Os ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) possuem duas famílias principais, a família ômega-3 (n-3) e a família ômega-6 (n-6). O ácido α -linolênico (ALA) e ácido linoleico (LA), pertencentes às famílias do n-3 e n-6, respectivamente, não são sintetizados pelo organismo humano, sendo necessário o consumo pela alimentação. O ácido eicosapentaenoico (EPA) e docosaexaenóico (DHA), pertencentes à família n-3, podem ser formados a partir do ALA, enquanto o ácido araquidônico (AA), da família n-6, pode ser formado a partir do LA. Esta conversão é realizada por meio das enzimas elongases e dessaturases. Cabe ressaltar que estas mesmas enzimas são utilizadas para a conversão do ALA para EPA assim como do LA para AA, havendo, portanto, uma competição entre estes dois AGP. Contudo, a primeira conversão realizada pela delta-6-dessaturase (D6D) possui preferência pelo ALA. Este fato é importante dado que o consumo do ALA nos dias atuais é muito menor que o do LA. A proporção do consumo de n-6 pela população ocidental em relação à n-3 (n-6:n-3) pode chegar a 20:1, sendo que a recomendação é entre 5:1 a 10:1 (NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC, 2005; SIMOPOULOS, 2008; CALDER, 2013).

O AA é constituinte das membranas celulares e atua como precursor de eicosanoides que possuem ação pró-inflamatória, como os da série par, ou seja, as prostaglandinas (PG) da série 2 (PGD₂, PGE₂, PGF₂), LT da série 4 (LTA₄, LTB₄, LTC₄, LTD₄, LTE₄) e tromboxanos (TX) da série 2 (TXA₂, TXB₂). Por outro lado, o EPA atua como precursor de eicosanoides que apresentam menor atividade inflamatória, com geração dos eicosanoides de série ímpar, como as PG e TX da série 3 e LT da série 5 (CALDER, 2012). Além disso, os eicosanoides derivados do EPA, assim como os derivados do AA, são sintetizados a partir das reações catalisadas pelas enzimas ciclooxygenase (COX)-2 e 5-lipooxygenase (LOX). Desse modo, o aumento da ingestão de um dos ácidos graxos (n-3 ou n-6) e da sua incorporação à membrana celular, acarreta em maior competição desses ácidos graxos pelas enzimas supracitadas (NATHOO; BARNETT; GOLUBIC, 2004). As membranas celulares são compostas, principalmente, de AA ao invés de EPA, o que evidencia a maior capacidade celular de síntese de eicosanoides com ação pró-inflamatória (SCHMITZ e ECKER, 2008).

Os ácidos graxos EPA e DHA estão também relacionados com redução da adiposidade, da inflamação no tecido adiposo e melhora na resposta à ação da insulina. Há

vários mecanismos de ação no tecido adiposo, incluindo a ativação do receptor ativado por proliferador de peroxissomos (PPAR)- γ e do receptor acoplado a proteína G (GPR)-120, produção de resolvinas e protectinas e redução da síntese de eicosanoides pró-inflamatórios derivados do AA (SIRIWARDHANA et al., 2013).

1.4 POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO E INFLAMAÇÃO

Os genes são ativados e desativados de acordo com os vários estímulos externos e internos, sendo os nutrientes um dos mais influentes moduladores da expressão gênica. Desse modo, a expressão gênica é dependente e regulada por macronutrientes e micronutrientes, bem como por fitoquímicos presentes nos alimentos (RAQIB e CRAVIOTO, 2009).

Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) são pequenas variações genéticas presentes no genoma. Esses compreendem a troca de uma base por outra no DNA que, em muitos casos, resulta em alteração na síntese da proteína ou, ainda, em proteínas com funções alteradas. Ocorrem pelo menos em 1% da população, contudo, os SNP mais comuns são encontrados em 40-50% da população. Os polimorfismos presentes na região promotora do gene, provavelmente estão mais associados com riscos de desenvolvimento e resistência a determinadas DCNT. A identificação de SNP nos genes de interesse possibilita estabelecer relações entre os fatores genéticos e a alimentação (GABOON, 2011; FENECH et al., 2011).

O fator de necrose tumoral (TNF)- α é uma citocina multi-funcional que pode regular várias células e processos biológicos como função imune, diferenciação celular, proliferação, apoptose e metabolismo energético. Considerada uma citocina pró-inflamatória, cuja ligação ao seu respectivo receptor de membrana desencadeia uma gama de efeitos biológicos intracelulares, sendo grande parte desses efeitos relacionada à ativação dos fatores de transcrição NF- κ B e proteína ativadora-1 (AP-1), resultando na transcrição de genes que codificam proteínas com ação pró-inflamatória. Aliado a esse fato, o TNF- α ativa vias de sinalizações intracelulares que provocam a inibição da via da insulina, sendo, portanto, inversamente correlacionado com o aumento da sensibilidade à ação da insulina (CAWTHORN e SETHI, 2008). Foram identificados alguns SNPs e outros polimorfismos no *locus* do TNF- α que influenciam a expressão gênica do TNF- α e sua associação com DCNT. Dentre esses, destacam-se os SNP presentes na região promotora do TNF- α , entre eles: -1031T>C (rs1799964), -863C>A (rs1800630), -857C>A (rs1799724), -851C>T (rs1799724), -376G>A (rs1800750), -308G>A (rs1800629) e -238G>A (rs361525). Dentre estas variações, o SNP localizado no *locus* -308 está relacionado com maior expressão do

TNF- α (ELAHI et al., 2009). Além disso, LI (2012) constatou, a partir de uma meta análise, relação significativa positiva entre o polimorfismo -308 G>A e hipertensão essencial em chineses, com particular suscetibilidade observada para o alelo A. Pacientes com artrite reumatoide e que possuem o alelo C do SNP do TNF- α -1031 T>C, apresentam maior concentração de partículas de LDL pequenas e densas e maior suscetibilidade de oxidação, o que caracteriza maior risco cardiovascular para esses indivíduos (VALLVÉ et al., 2008).

No âmbito da nutrigenética, particularmente, estudos relacionados com lipídios, poucos são aqueles que avaliaram a interação entre os SNP presentes no gene do TNF- α e ingestão de lipídios ou outro biomarcador de AG. JOFFE et al. (2010), em estudo caso controle com 105 mulheres negras eutróficas ($IMC \leq 25$) e 118 mulheres negras obesas ($IMC \geq 30$), originárias da África do Sul, verificaram que o SNP -308 G>A mostrou interação com ingestão de lipídios (%VCT) no risco para obesidade. As carreadoras do alelo variante A apresentaram menor risco para obesidade com ingestão de 30% do VCT de lipídios totais, entretanto, esse efeito se mostrou dose-dependente, ou seja, ao atingir o consumo de lipídios de 40,6% do VCT, o risco para obesidade se iguala ao genótipo GG. Além disso, interações também foram encontradas entre o SNP avaliado e a ingestão de α -linolênico (ALA, % do VCT) sobre a razão TC:HDL, sendo que indivíduos GA+AA diminuem a razão conforme há aumento da ingestão de ALA. Constatou-se, também, interação entre SNP -308 G>A e ingestão de PUFA (%VCT) sobre a concentração de LDL colesterol, uma vez que indivíduos GA+AA aumentam a concentração plasmática de LDL colesterol conforme há aumento do consumo de PUFA. Em um ensaio clínico aleatorizado, duplo cego e prospectivo, realizado com homens e mulheres espanhóis, com idade entre 20 a 75 anos, participantes do estudo CARDIOPREV, constatou-se que os indivíduos que possuíam o genótipo GG do SNP -308 G>A, no momento *baseline*, apresentaram concentrações de TG e PCR de alta sensibilidade maiores que os carreadores do alelo A. Entretanto, após 12 meses com consumo de uma dieta mediterrânea, não houve mais diferença entre os genótipos, sendo que o delta dos indivíduos GG foi significativamente maior, ou seja, foram mais responsivos em diminuir a concentração de TG e PCR de alta sensibilidade (GOMEZ-DELGADO et al., 2014).

A IL-10 é uma citocina secretada por vários leucócitos, como células dendríticas, macrófagos, mastócitos, *natural killers*, eosinófilos, neutrófilos e células T CD4⁺, T CD8⁺ e B. Sua ação decorre da ativação da via de sinalização do STAT3, culminando em suas funções biológicas. Possui um papel importante na imunidade inata e adaptativa, com atividade supressora de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α e IL-12 (OUYANG et al., 2011; HOFFMAN et al., 2012).

A capacidade de síntese da IL-10 difere entre os indivíduos, sendo regulada, em parte, por três SNP localizados nas posições -1082 G>A (rs1800896), -819 C>T (rs1800871) e -592 C>A (rs1800872), os quais também estão associados com fatores de risco ligados à aterosclerose e DM2 (KARACA et al., 2011; HEISKANEN et al., 2010). Esses três SNP formam haplótipos, dos quais três formas (GCC, ACC e ATA) têm sido descritas em populações caucasianas (TURNER et al., 1997). Baseados nestes haplótipos, indivíduos podem ser divididos em capacidade alta de síntese de IL-10 (GCC/GCC), capacidade intermediária de síntese de IL-10 (GCC/ACC, GCC/ATA) e capacidade baixa de síntese de IL-10 (ATA/ATA, ACC/ATA, ACC/ACC) (EDWARDS-SMITH et al., 1999; HULKKONEN et al., 2001). A partir de uma meta-análise, WANG et al. (2012) verificaram que indivíduos com genótipo GA e AA do polimorfismo da IL-10 -1082 G>A possuíam risco 1,12 vezes maior para DCV que o genótipo dominante em caucasianos. Além disso, nesse mesmo polimorfismo, YIN et al. (2013), também em meta análise, verificaram que o genótipo GA e GG apresentou maior associação para risco ao DM2.

Não foram encontrados até o momento estudos que avaliam SNP do gene da IL-10 e interações com AG. Contudo, no estudo caso controle aninhado, a coorte de ANDERSEN et al. (2012), com indivíduos com idade entre 50-64 anos, participantes da coorte Diet, Cancer and Health, Dinamarca, verificaram que os indivíduos carreadores do alelo A do SNP -592 C>A apresentaram redução do risco para câncer colorretal com aumento da ingestão de fibras alimentares. Ao analisar por tercil de ingestão de fibras, os indivíduos carreadores do alelo A que estavam abaixo do primeiro tercil de consumo (<17 g/dia) apresentaram risco aumentado para câncer colorretal em comparação ao genótipo dominante, perdendo a significância estatística no segundo e terceiro tercil de ingestão (p de interação=0,02). Portanto, no que

tange ao câncer colorretal, os indivíduos carreadores do alelo A possuem maior risco para câncer colorretal em comparação ao genótipo GG, sendo que tal risco pode ser atenuado com o aumento da ingestão de fibras alimentares.

A PCR é uma proteína de fase aguda produzida principalmente no fígado, em resposta às citocinas inflamatórias IL-6, IL-1 e TNF- α . Correlaciona-se positivamente com o peso corporal e a resistência à ação da insulina (SHOELSON et al., 2007). Diversas evidências sugerem que a proteína C reativa pode ser considerada como fator de risco para DCV, uma vez que esta proteína induz diretamente o desenvolvimento da aterosclerose. A constatação que a PCR não é apenas produzida no fígado, mas também no interior de placas ateroscleróticas por células vasculares ativadas, sugere papel duplo dessa proteína, como um agente com ação sistêmica e tecidual. Cabe ressaltar que a proteína C reativa pode aumentar as respostas inflamatórias e pró-trombóticas, uma vez que aumenta a expressão da MCP-1, da endotelina-1, do PAI-1 e de moléculas de adesão presentes na superfície de células endoteliais. Diferentes SNP estão presentes no gene que codifica a PCR, como, por exemplo, o rs2808630, rs1205, rs1800947, rs1417938 e rs3093059, os quais podem influenciar nas concentrações deste biomarcador inflamatório, entretanto, fatores ambientais estão também fortemente associados nas alterações plasmáticas (HAGE e SZALAI, 2007; DANIK e RIDKER, 2007).

KOLZ et al. (2007), em estudo multicêntrico conduzido na Europa, avaliaram a associação entre alguns polimorfismos do gene da PCR e a concentração plasmática do seu biomarcador em 1003 pacientes participantes do *AIRGENE Study* com histórico de infarto do miocárdio. O genótipo com alelo mutante (GG+GC) do SNP 837C>G (rs1800947) apresentou concentração de PCR estatisticamente menor em relação ao genótipo dominante (CC), enquanto a análise do SNP rs1205 evidenciou menor concentração plasmática de PCR (1,02 mg/L) no genótipo recessivo (TT) em relação aos indivíduos heterozigotos (CT) (1,26mg/L) e com o genótipo dominante (CC) (1,66 mg/L). Em 897 indivíduos turcos, participantes do *Turkish Adult Risk Factor Study* (TARF), os SNP da PCR avaliados apresentaram interação com o sexo e a concentração plasmática da PCR. O genótipo AA do rs3091244 apresentou maior concentração sérica da PCR no sexo feminino, enquanto que no sexo masculino, a

maior concentração sérica foi observada para o genótipo TA. A partir da análise do SNP da PCR designado rs1130864, constatou-se que o genótipo recessivo TT, no sexo feminino, apresentou maiores concentrações plasmáticas da PCR, ao passo que no sexo masculino este fato foi observado para o genótipo dominante CC. Para ambos os rs1800947 e rs1205, o genótipo dominante GG apresentou maiores concentrações séricas apenas para o sexo feminino (KOMURCU-BAYRAK et al., 2009).

Estudos com interação entre SNP presentes no gene da PCR e ácidos graxos também são escassos. NIENABER-ROUSSEAU et al. (2014) investigaram, em um estudo transversal, a interação entre 12 SNP no gene da PCR e dieta sobre a concentração plasmática de PCR em indivíduos sul africanos negros, participantes do estudo *South African arm of the Prospective Urban and Rural Epidemiology (PURE)*, com idade entre 35 e 70 anos. Foram encontradas interações estatisticamente significantes entre a ingestão de MUFA e SFA e o SNP rs2808630, sendo que indivíduos homozigotos recessivos apresentaram associação direta entre MUFA, SFA e a concentração plasmática de PCR, enquanto em indivíduos homozigotos dominantes e heterozigotos essa associação não foi significativa.

2 HIPÓTESE DO ESTUDO

A presença de SNP nos genes da PCR, TNF- α e IL-10, os ácidos graxos plasmáticos e suas ações em conjunto influenciam a concentração plasmática de biomarcadores relacionados à resposta inflamatória.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a associação entre SNP presentes nos genes da PCR, TNF- α e IL-10 e ácidos graxos do plasma e seus efeitos sobre a concentração plasmática de biomarcadores inflamatórios em estudo de base populacional – ISA-Capital.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a associação entre SNP presentes nos genes da PCR, TNF- α e IL-10 e a concentração plasmática de biomarcadores inflamatórios (adiponectina, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL12p70, MCP-1, PCR, TNF- α , sICAM-1 e sVCAM-1).
- Verificar a associação entre ácidos graxos do plasma e a concentração plasmática de biomarcadores inflamatórios (adiponectina, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, MCP-1, PCR, TNF- α , sICAM-1 e sVCAM-1).
- Avaliar a interação entre ácidos graxos do plasma e SNP presentes nos genes da PCR, TNF- α e IL-10 sobre a concentração plasmática de biomarcadores inflamatórios (adiponectina, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, MCP-1, PCR, TNF- α , sICAM-1 e sVCAM-1).

4 MÉTODOS

O presente estudo utiliza dados oriundos do inquérito de saúde ISA-Capital 2008, o qual tem delineamento transversal, de base populacional, realizado por meio de inquérito domiciliar. Foram utilizados amostras de DNA e de plasma e dados oriundos do projeto “Homocisteína, polimorfismos do gene MTHFR, fatores dietéticos e risco cardiovascular: estudo de base populacional – ISA-Capital”, o qual foi financiado pelo CNPq (processo no. 461176/2008-0) e pela FAPESP (processo no. 2009/15831-0).

A amostragem do estudo é estratificada, por conglomerados, em dois estágios: setores censitários e domicílio. A amostra utilizada, composta por 3.271 participantes, foi uma subamostra da Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios (PNAD), a qual foi publicada em 2006, e realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), no município de São Paulo. Para responder ao inquérito dietético foi calculada uma subamostra desta população, estimada em 900 participantes, dividida em três grupos de 300 indivíduos de ambos os sexos, segundo os domínios de idade: 12 a 19 anos, 20 a 59 anos e 60 anos ou mais. O tamanho mínimo de 300 indivíduos possibilita estimar uma prevalência de 0,5 com erro de 0,07, níveis de confiança de 95% e um efeito de delineamento de 1,5.

A primeira coleta de dados foi realizada em 2008. As informações sobre hábito de fumar, etilismo, prática de atividade física e raça (autorreferida), utilizadas no presente projeto, foram obtidas nos domicílios, por meio de questionários aplicados por entrevistadores previamente treinados, respondidos pelos moradores sorteados. O questionário abrangia questões sobre variáveis demográficas, socioeconômicas, de estilo de vida (atividade física, pelo Questionário Internacional de Atividade Física (IPAQ) longo, tabagismo e etilismo), morbidade referida, história familiar de doenças, uso de suplementos e medicamentos.

Em 2009, foi feito um novo contato telefônico para agendamento da coleta de sangue. No dia agendado, foram coletadas amostras de sangue (20 mL de sangue venoso), além das aferições das medidas antropométricas e pressão arterial. Para o presente estudo, apenas indivíduos com idade entre 20 a 59 anos foram incluídos (n=302). Aqueles que estavam em

uso de anti-inflamatórios, antirretrovirais ou inibidores da absorção lipídica foram excluídos (n=20), totalizando 281 indivíduos para a inclusão das análises.

4.1 AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA

Para avaliação do peso corporal foi utilizada uma balança eletrônica do tipo plataforma, com capacidade para 150 kg, sensibilidade de 100 gramas, da marca TANITA® (Tanita, Tokyo, Japão). Os indivíduos foram pesados com roupas leves e descalços, posicionados em postura ereta, com os pés inteiramente compreendidos na plataforma da balança, de forma paralela, com braços ao longo do corpo e olhar no horizonte. Para a aferição da altura foi utilizado um estadiômetro com escala em milímetros, da marca Seca bodymeter 208® (SECA, Hamburgo, Alemanha), o qual foi fixado na parede. As medidas de altura e peso foram utilizadas para o cálculo de IMC, segundo a seguinte fórmula: peso (kg)/altura (m)². A medida da circunferência da cintura foi realizada com a fita métrica posicionada sobre o ponto médio entre o último arco costal e a crista ilíaca do indivíduo em pé, com a leitura feita no momento da expiração. Estes dados foram coletados por pesquisadores de campo previamente treinados.

4.2 AFERIÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL

A pressão arterial foi obtida por meio de aparelho automático (Omron model HEM-712C, Omron Health Care, Inc, USA). Três medidas de pressão arterial foram realizadas com adequação do manguito à circunferência braquial. Os valores finais de pressão sistólica e diastólica (em mmHg) foram considerados aqueles que representam a média aritmética das duas últimas medidas.

4.3 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE MATERIAL BIOLÓGICO

Os indivíduos foram instruídos a realizar jejum de 12 h. Anteriormente à coleta de sangue, foi preenchido o “controle da coleta domiciliar”, que entre outras questões, abrangia informações sobre uso de medicamento. A coleta de sangue foi realizada por profissionais especializados, com utilização de materiais descartáveis, no domicílio dos participantes, com agendamento prévio, de acordo com a disponibilidade dos mesmos, condicionada à assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido pelo participante ou responsável legal (Anexo 1). Foram coletados 20 mL de sangue, em tubos secos e com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), por meio de punção venosa. Os tubos foram armazenados em isopor com gelo reciclável e transportados à Faculdade de Saúde Pública – USP. Posteriormente, 15 mL do sangue periférico foram centrifugados e processados em alíquotas de soro e de plasma e, em seguida, armazenados em freezer (-80 °C). Para o processo de extração do DNA, foi utilizado o sangue restante (5 mL) coletado em tubos contendo o anticoagulante EDTA.

4.3.1 Uso de Medicamentos

Os nomes dos medicamentos em uso no dia da coleta de sangue foram tabulados e, com base nas informações contidas nas bulas, categorizados por classe terapêutica. Aqueles indivíduos que estavam em uso de medicamentos com ação antiinflamatória (incluindo suplementação de óleo de peixe), antirretroviral ou inibidores da absorção de lipídios foram excluídos da amostra (n=20).

4.3.2 Análise de biomarcadores inflamatórios e perfil lipídico

Para a dosagem das concentrações plasmáticas de LDL colesterol, triacilglicerol, colesterol total e HDL colesterol foi utilizado um ensaio colorimétrico enzimático, usando

equipamento Roche Modular Auto Analyzer (Roche Diagnostics, Mannheim, EUA). As concentrações plasmáticas dos biomarcadores inflamatórios IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , IL-12p70, adiponectina, MCP-1, sICAM-1 e sVCAM-1 foram determinadas com o auxílio do kit Multiplex para imunoensaio (Milliplex, Merck Millipore, MA, USA). Essa tecnologia utiliza microesferas identificadas por graduação de cores (criada por proporções precisas de dois fluoróforos) e revestidas com anticorpos específicos para cada um dos biomarcadores inflamatórios, de forma que cada coloração de esfera é capaz de capturar um biomarcador. Após serem expostas às amostras de plasma, as esferas se ligam aos seus respectivos analitos e, em seguida, reagem com o anticorpo secundário, o qual é marcado com ficoeritina (PE), emitindo fluorescência diretamente proporcional à quantidade de analito capturado. O aparelho que realiza a leitura dessa fluorescência é capaz de identificar a microesfera pela graduação de cor e quantificar essa fluorescência (baseando-se em uma curva padrão), emitindo, automaticamente, uma planilha com o nome dos biomarcadores inflamatórios e sua concentração para cada amostra. Para a dosagem da PCR, foi utilizada a técnica de turbidimetria cinética, utilizando o kit IMAGE® (Beckman Coulter, Brea, CA).

4.3.3 Análise dos ácidos graxos do plasma

Para a extração dos ácidos graxos presentes no plasma, foi adicionado 1 mL de Metanol/Clorofórmio HPLC (2:1) à amostra e, em seguida, esta foi centrifugada durante 20 min, a 20.000 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um tubo PYREX. Essa etapa foi repetida 3 vezes, sendo os sobrenadantes obtidos em cada lavagem agregados e secos em concentrador de amostras (LABCONCO, Kansas City, USA).

Para a esterificação dos AG, iniciou-se com adição de 0,5 mL de Hexano HPLC, e 125 μ L de Metóxido de sódio, seguida de sonicação por 20 min. Em seguida, foi adicionado 2,5 mL de solução de NaCl saturada, sendo a amostra mantida em repouso por 10 min. Após essa etapa, foi adicionado 1 mL de Hexano PA seguido por agitação em vortex, durante 30 seg. O sobrenadante (fase hexânica) foi transferido para um tubo PYREX. Essa etapa foi repetida 4

vezes, sendo todos os sobrenadantes agregados e secos no concentrador de amostras (LABCONCO, Kansas City, USA). Após completa evaporação, os ácidos graxos esterificados foram ressuspensos em 0,25 mL de Hexano HPLC, sonificado durante 5 min, filtrado (Milipore; 0,22µm) diretamente no vial e injetado no Cromatógrafo à Gás com detector de ionização de chama.

O perfil de ácidos graxos foi determinado em cromatógrafo a gás Shimadzu, CG-2010, equipado com uma coluna capilar DB-FFAP (15 m x 0,100 mm x 0,10 µm - J and W Scientific, Agilent Technologies). O hidrogênio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 0,27 mL/min, com vazão de 35 cm/s e pressão de 187,8 kPa. As taxas de fluxo de ar sintético de 300 mL/min, N₂ e H₂ foram de 30 mL/min. As temperaturas do injetor e do detector foram ajustadas para 250 °C e 260 °C, respectivamente. A programação de temperaturas da coluna foi de 100 °C inicial, com retenção de 0,5 min, rampa de 25 °C/min a 195 °C, 3 °C/min a 205 °C, 8 °C/min a 230 °C, com retenção de 4 min, 50 °C/min a 245 °C, restando por 0,5 min. A razão Split utilizada no injetor foi de 1:150.

O padrão externo utilizado foi composto de uma mistura formada por 37 ésteres metil de ácidos graxos (FAME 37, código 47885, Sigma Chemical Co). O volume de injeção foi de 2 µL, em injetor automático AOC 20i. Os ácidos graxos foram identificados por meio da comparação dos tempos de retenção do padrão externo com as amostras e sua quantificação foi realizada por meio de padrão interno *methyl tricosanoate* (C23:0, T9900, Sigma Chemical Co). Os ácidos graxos analisados foram: mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1n-7), esteárico (C18:0), oleico (C18:1n-9), linoleico (LA, C18:2n-6), α-linolênico (ALA, C18:3n-3), dihomog-γ-linoleico (DGLA, C20:3n-6), araquidônico (AA, C20:4n-6), eicosapentaenoico (EPA, C20:5n-3), docosapentaenoico (DPA, C22:5n-3) e docosaexaenoico (DHA, C22:6n-3). Os resultados foram expressos como percentual total de ácidos graxos presentes na amostra.

4.3.4 Genotipagem

4.3.4.1 Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído do sangue total utilizando-se o método de *salting out*, descrito por Miller et al. (1988). Após a extração, a viabilidade do material extraído foi visualizada em gel de agarose 1% e a concentração foi obtida por leitura em espectrofotômetro Nanodrop 8000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

4.3.4.2 Genotipagem

Foi realizada a genotipagem dos SNP descritos no **Quadro 1**. Todas as etapas do ensaio de genotipagem foram realizadas pela empresa Helixxa Importação, Exportação e Serviços Genômicos Ltda (Campinas, SP), a qual realizou a quantificação do DNA extraído de 301 amostras de sangue total humano, o qual foi coletado com o anticoagulante EDTA. Posteriormente, foi realizado o ensaio de genotipagem por meio do sistema Taqman Open Array (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA). Cabe destacar que o ensaio em questão contou com 20% de repetições das análises dos SNP.

O sistema Taqman® Open Array® (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) fundamenta-se no método de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, utilizando sondas Taqman® de sequências específicas. As sondas são oligonucleotídeos específicos para uma dada sequência do DNA que será amplificado, no caso, para um SNP de interesse. Localizadas nas extremidades da sonda estão um fluoróforo (na região 5' da sonda), sendo denominado como molécula repórter ou doadora, e uma molécula *quencher* (localizado na região 3' da sonda). A molécula repórter doa energia na forma de luz que é captada pela molécula *quencher*, que neutraliza a fluorescência emitida. Durante o ensaio da PCR em tempo real, a sonda hibridiza a sequência complementar com o alelo do SNP de interesse na fita simples do DNA em amplificação. A enzima Taq DNA polimerase cliva essas sondas hibridizadas, degradando-as. Portanto, ocorre a separação da molécula *quencher* da molécula repórter, aumentando exponencialmente a fluorescência, que uma vez gerada é detectada pela plataforma instrumental, indicando a presença do alelo na amostra. Quando a sonda não

possui uma ligação perfeita com a região de interesse do DNA amplificado não há clivagem pela enzima Taq DNA polimerase e, dessa forma, não há emissão de fluorescência. O sistema Taqman® Open Array® apresenta automatização de vários processos descritos acima, possuindo uma baixa manipulação e diminuindo a chance de erros da análise. Além disso, utiliza tecnologia para realizar análises com um volume na ordem de nanolitros, o que reduz a quantidade de amostra necessária para a análise, bem como possibilita a realização de um ensaio com maior precisão e rapidez.

Quadro 1. Descrição dos polimorfismos de nucleotídeos únicos.

Gene	Símbolo	Polimorfismo	dbSNP
Fator de Necrose Tumoral- α	TNF- α	-857 C $\rightarrow$ T	rs1799724
Fator de Necrose Tumoral- α	TNF- α	-1031 T $\rightarrow$ C	rs1799964
Fator de Necrose Tumoral- α	TNF- α	-308 G $\rightarrow$ A	rs1800629
Fator de Necrose Tumoral- α	TNF- α	-238 G $\rightarrow$ A	rs361525
Interleucina-10	IL-10	e/i boundary C $\rightarrow$ T	rs1554286
Interleucina-10	IL-10	-819 C $\rightarrow$ T	rs1800871
Interleucina-10	IL-10	-592 C $\rightarrow$ A	rs1800872
Interleucina-10	IL-10	-1082 A $\rightarrow$ G	rs1800896
Interleucina-10	IL-10	Intron1 +504 G $\rightarrow$ T	rs3024490
Proteína C reativa	CRP	3872 A $\rightarrow$ G	rs1205
Proteína C reativa	CRP	1919 A $\rightarrow$ T	rs1417938
Proteína C reativa	CRP	5237 A $\rightarrow$ G	rs2808630

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste do qui-quadrado com correção de continuidade foi realizado para determinar se a distribuição genotípica da população segue o equilíbrio de Hardy-Weinberg. A partir dos AG do plasma analisados, foram agrupados em: SFA (C14:0+C16:0+C18:0), MUFA (C16:1+C18:1), PUFA (n-6+n-3), n-3 (C18:3+HUFA), n-6 (C18:2+C20:3+C20:4). A partir das frações de AG do plasma, também foram analisadas as seguintes razões: n-6/n-3, SFA/n-6, SFA/n-3, SFA/PUFA, AA/EPA, C16:1/C16:0 (atividade estimada da enzima SCD-1, designada SCD-16), C18:1/C18:0 (atividade estimada da enzima SCD, designada SCD-18), C20:3 n-6/C18:2 n-6 (atividade estimada da enzima D6D), AA/C20:3 n-6 (atividade estimada da enzima D5D). As variáveis referentes aos biomarcadores inflamatórios PCR, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, adiponectina e aos AG mirístico, palmítico, MUFA, palmitoleico, oleico, n-3 PUFA, ALA, EPA, DPA, DHA e n-3 HUFA, razão AA/EPA, SCD-16, SCD-18, D5D e D6D foram transformados por Log_n para assumirem uma distribuição gaussiana.

Para determinação do desequilíbrio de ligação entre SNP de um mesmo gene e estimativa de blocos haplotípicos foi utilizado o *software Haploview*, versão 4.2 (Broad Institute, Boston, EUA).

Para atender ao primeiro objetivo específico foi utilizada regressão linear múltipla. A variável polimorfismo foi analisada no modelo dominante, com duas categorias quando o homozigoto recessivo possuía frequência menor que 10% da população (homozigotos dominantes e heterozigotos + homozigotos recessivos) e codominante, com três categorias, quando o homozigoto recessivo possuía frequência maior que 10% da população, sendo sempre considerada como principal em todas as modelagens. Os modelos foram ajustados para sexo, idade, IMC, hábito de fumar (sim/não), prática de atividade física moderada (sim/não), etilismo (sim/não) e cor da pele (caucasianos/não caucasianos).

Para o segundo objetivo específico, foi realizado a análise multivariada de Cluster (*K-means*) sobre os dados normalizados dos biomarcadores inflamatórios (k=11) para agrupar os indivíduos (n=262) em dois grupos: “não inflamados” (n=169) e “inflamados” (n=93). Todos

SNP foram utilizados com duas categorias e os ácidos graxos do plasma foram dicotomizados na mediana de cada distribuição.

Para a comparação entre os dois grupos foram utilizados o teste χ^2 , para variáveis categóricas, o teste t de *Student*, para variáveis contínuas. Para verificar a associação entre os grupos formados pela análise de cluster, SNP e AG do plasma, foi realizada regressão logística estratificada por cada genótipo, tendo os AG do plasma como variável principal. Para ajustar o modelo foram consideradas as variáveis sexo, idade, IMC e hábito de fumar (sim/não). Para verificar a significância da interação entre SNP e AG do plasma, foi adicionado um termo de interação (produto entre SNP e AG plasma dicotomizado) no modelo ajustado.

Para avaliar o terceiro objetivo específico, foi verificada a diferença entre as médias de AG plasmáticos entre os grupos inflamado e não inflamado pelo teste t de *Student*, seguido de regressão linear múltipla, ajustado por idade, sexo, IMC, hábito de fumar, etilismo e atividade física.

6 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

O estudo que originará os dados para o presente projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de saúde Pública-USP, protocolo de pesquisa número 2001. O projeto citado foi elaborado respeitando os aspectos éticos e requisitos da resolução 196/96 e garantindo a confidencialidade dos dados. A participação foi voluntária, após consentimento esclarecido. O presente projeto não prevê coleta de dados adicionais, mas sim análises distintas das previstas no projeto original.

7 RESULTADOS

7.1 DESCRIÇÃO DOS DADOS

Dos 302 adultos que compunham a amostra original, 20 faziam uso de medicamentos antiinflamatórios, antirretrovirais e/ou inibidores da absorção intestinal de lipídios e, portanto, foram excluídos das análises estatísticas. As Tabelas 1 e 2 apresentam a descrição da população do presente estudo, sendo que a Tabela 1 apresenta a mediana e o intervalo interquartil (IQ) das variáveis contínuas do presente estudo e a Tabela 2 apresenta frequência e porcentagem das variáveis categóricas.

Tabela 1 - Características antropométricas, biomarcadores inflamatórios da população estudada. ISA-capital, São Paulo, 2008-2010.

Variáveis	Mediana	IQ	
		P25	P75
Idade (anos)	40,00	27,00	49,00
<i>Antropometria</i>			
IMC (Kg/m ²)	25,51	22,51	29,27
Circunferência da cintura (cm)	92,00	82,00	101,00
<i>Biomarcadores Inflamatórios</i>			
PCR (mg/L)	2,10	0,90	4,50
TNF- α (pg/mL)	4,58	3,49	6,09
IL-8 (pg/mL)	2,45	1,73	3,48
IL-6 (pg/mL)	2,01	1,20	2,90
IL-1 β (pg/mL)	0,38	0,20	0,75
IL-12 (pg/mL)	3,87	2,10	6,14
IL-10 (pg/mL)	15,04	9,51	23,30
MCP-1 (pg/mL)	207,00	146,00	249,00
Adiponectina (ng/mL)	6433,15	3927,72	9261,50
sVCAM-1 (ng/mL)	868,22	724,57	1008,26
sICAM-1 (n-1g/mL)	137,83	106,26	171,35

Tabela 2 - Distribuição da população segundo características extraídas do inquérito de saúde. ISA-capital, São Paulo, 2008-2010.

Variáveis	N	%
<i>Sexo</i>		
Masculino	106	37,72
Feminino	175	62,28
<i>Hábito de fumar</i>		
Fumante	69	24,56
Não fumante	212	75,44
<i>Prática de atividade física moderada</i>		
Praticante	33	11,74
Não praticante	248	88,26
<i>Hábito de beber</i>		
Bebe	149	53,02
Não bebe	132	46,98
<i>Cor de pele</i>		
Caucasianos	167	59,43
Não Caucasianos	114	40,57

A frequência alélica e genotípica considerou de 294 a 301 indivíduos, de acordo com o sucesso da genotipagem de cada SNP. As frequências, bem como o valor de χ^2 para determinação do equilíbrio de Hardy-Weinberg estão descritas na Tabela 3. Cabe destacar que todos os SNP descritos na Tabela 3 estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 3 - Frequência dos genótipos e dos alelos de cada SNP com seu respectivo valor de χ^2 .

SNP (n)	rs	Genótipo (%)	Alelo (%)	χ^2
TNF- α (299)	1799724	CC(80,6); CT(18,7); TT(0,7)	C(90,0); T(10,0)	0,81
TNF- α (301)	1799964	TT(54,8); CT(36,9); CC(8,3)	T(73,2); C(26,7)	0,93
TNF- α (301)	1800629	GG(80,7); AG(17,3); AA(2,0)	G(89,3); A(10,6)	1,88
TNF- α (300)	361525	GG(87,0); GA(12,7); AA(0,3)	G(93,3); A(6,7)	0,52
IL-10 (300)	1554286	AA(47,7); AC(43,7); CC(9,7)	A(69,0); C(31,0)	0,01
IL-10 (299)	1800871	TT(10,3); TC(46,5); CC(43,5)	T(33,3); C(66,7)	0,74
IL-10 (298)	1800872	AA(44,3); AC(45,3); CC(10,4)	A(66,9); C(33,1)	0,21
IL-10 (295)	1800896	GG(41,0); GA(45,4); AA(13,6)	G(63,7); A(36,3)	0,08
IL-10 (296)	3024490	GG(43,6); GA(45,3); AA(11,1)	G(66,2); A(33,8)	0,07
CRP (299)	1205	GG(47,2); GA(40,8); AA(12,0)	G(67,6); A(32,4)	1,33
CRP (290)	1417938	TT(49,7); TA(43,8); AA(6,5)	T(71,5); A(28,5)	1,82
CRP (300)	2808630	AA(62,3); AC(34,0); CC(3,7)	A(79,3); C(20,7)	0,55

* Considerando nível de significância 0,05 e 2 graus de liberdade. SNP que apresentarem χ^2 maior que 5,991 não estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

As Figuras de 1 a 7 foram extraídas do *software Haploview* e mostram o valor do desequilíbrio de ligação (R^2), bem como sobre a formação de blocos de haplótipos e suas frequências na população, entre os SNP de cada gene do presente projeto. Vale destacar que os SNP com desequilíbrio de ligação maior que 0,80 foram considerados “tag SNP” e, portanto, apenas um foi escolhido para participar das análises subsequentes. Desse modo, o SNP rs1554286 foi considerado tag SNP em relação aos seguintes SNP do gene da IL-10: rs1800871 ($r^2= 0,838$), rs1800872 ($r^2= 0,829$) e rs3024490 ($r^2=0,824$).

Figura 1 - Desequilíbrio de ligação (R^2) entre os SNP do gene do TNF- α . Os valores dentro dos quadrados correspondem ao valor de R^2 .

Figura 2 - Desequilíbrio de ligação (R^2) entre os SNP do gene da PCR. Os valores dentro dos quadrados correspondem ao R^2 . Os blocos de haplótipos são delineados por linhas pretas

contínuas mais densas e a descrição dos blocos encontra-se abaixo da figura, sendo que a frequência de cada haplótipo está disposta em cinza claro, antecedida por um ponto.

Figura 3 - Desequilíbrio de ligação (R^2) entre os SNP do gene da IL-10. Os valores dentro dos quadrados correspondem ao R^2 . Os blocos de haplótipos são delineados por linhas pretas contínuas mais densas e a descrição dos blocos encontra-se abaixo da figura, sendo que a frequência de cada haplótipo está disposta em cinza claro, antecedida por um ponto.

8 ASSOCIAÇÃO ENTRE PRESENÇA DE SNP SOBRE A CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS

As Tabelas 04 ao 12 mostram os resultados da associação entre a presença do SNP sobre os biomarcadores inflamatórios.

8.1.1 SNP do gene do TNF- α

Os indivíduos com o genótipo recessivo do SNP -857 C>T (rs1799724) do gene do TNF- α apresentaram menor concentração plasmática de IL-12 e maior concentração de sVCAM-1. Entretanto, após ajustar o modelo, o genótipo dominante não apresentou diferença estatisticamente significativa de sVCAM-1 em relação aos outros genótipos (Tabela 04).

Tabela 4 - Associação entre SNP do TNF- α -857 C>T (rs1799724) e concentração plasmática de biomarcadores inflamatórios.

Biomarcador Inflamatório	CC (n=225) média (DP)	CT+TT (n=53) média (DP)	p¹	p²
PCR (mg/L)*	3,73 (4,88)	3,76 (5,35)	0,86	0,98
TNF- α (pg/mL)	4,93 (1,89)	4,56 (1,94)	0,21	0,14
IL-8 (pg/mL)*	2,84 (1,76)	2,93 (1,83)	0,66	0,83
IL-6 (pg/mL)*	2,78 (3,53)	2,52 (2,52)	0,44	0,33
IL-1 β (pg/mL)*	0,61 (0,65)	0,57 (0,74)	0,19	0,14
IL-12 (pg/mL)*	5,53 (7,86)	3,95 (3,76)	0,002	0,001
IL-10 (pg/mL)	17,95 (11,01)	16,33 (12,60)	0,35	0,33
MCP-1 (pg/mL)*	211,58 (89,37)	213,98 (89,08)	0,86	0,98
Adiponectina (ng/mL)*	7397,82 (4709,54)	8090,01 (6172,28)	0,75	0,74
VCAM (ng/mL)	867,93 (867,93)	941,97 (277,33)	0,04	0,08
ICAM (ng/mL)	145,69 (64,85)	155,10 (78,82)	0,36	0,44

Valores expressos em média (DP).

*Variáveis transformadas por logn antes das análises

¹ Teste *t* de *student*

² Ajustado por idade, IMC, sexo, raça, ingestão de álcool, tabagismo e atividade física

Para o SNP -238 G>A (rs361525) do gene do TNF- α (Tabela 05), os indivíduos que possuem o alelo mutante (GA+AA), apresentaram concentrações plasmáticas significativamente maiores de TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-12 e IL-10. Entretanto, as

concentrações plasmáticas de IL-1 β e IL-12, após o ajuste do modelo, passaram a não apresentar diferença estatisticamente significativa.

Tabela 5 - Associação entre SNP do TNF- α -238 G>A (rs361525) e concentração plasmática de biomarcadores inflamatórios.

Biomarcador Inflamatório	GG(n=243) média (DP)	GA+AA (n=36) média (DP)	p¹	p²
PCR (mg/L)*	3,70 (4,79)	3,90 (6,02)	0,18	0,07
TNF- α (pg/mL)	4,76 (1,86)	5,50 (2,06)	0,03	0,04
IL-8 (pg/mL)*	2,86 (1,73)	2,89 (2,01)	0,76	0,93
IL-6 (pg/mL)*	2,60 (3,18)	3,58 (4,29)	0,02	0,02
IL-1 β (pg/mL)*	0,57 (0,63)	0,81 (0,83)	0,03	0,05
IL-12 (pg/mL)*	4,96 (6,70)	7,03 (10,31)	0,03	0,06
IL-10 (pg/mL)	16,95 (10,57)	22,14 (14,82)	0,01	0,01
MCP-1 (pg/mL)*	213,26 (87,67)	201,22 (5,35)	0,45	0,59
Adiponectina (ng/mL)*	7431,46 (4993,04)	8168,88 (5135,91)	0,41	0,79
VCAM (ng/mL)	876,57 (233,69)	915,62 (224,85)	0,35	0,35
ICAM (ng/mL)	147,12 (67,18)	152,26 (72,28)	0,67	0,53

Valores expressos em média (DP).

*Variáveis transformadas por logn antes das análises

¹ Teste *t* de *student*

² Ajustado por idade, IMC, sexo, raça, ingestão de álcool, tabagismo e atividade física

Nenhum biomarcador inflamatório foi associado com os genótipos do SNP TNF- α - 1031 T>C (rs1799964), como mostra a Tabela 6.

Tabela 6 - Associação entre SNP do TNF- α -1031 T>C (rs1799964) e concentração plasmática de biomarcadores inflamatórios.

Biomarcador Inflamatório	TT (n=153) média (DP)	TC+CC (n=128) média (DP)	p¹	p²
PCR (mg/L)*	3,87 (5,12)	3,55 (4,77)	0,54	0,05
TNF- α (pg/mL)	4,86 (1,87)	4,85 (1,94)	0,96	0,78
IL-8 (pg/mL)*	2,89 (1,73)	2,83 (1,82)	0,78	0,56
IL-6 (pg/mL)*	2,51 (2,56)	2,99 (4,10)	0,49	0,56
IL-1 β (pg/mL)*	0,62 (0,71)	0,58 (0,62)	0,80	0,71
IL-12 (pg/mL)*	5,13 (7,12)	5,34 (7,50)	0,32	0,38
IL-10 (pg/mL)	17,61 (10,88)	17,64 (11,85)	0,98	0,89
MCP-1 (pg/mL)*	211,36 (80,82)	212,02 (98,52)	0,95	0,67
Adiponectina (ng/mL)*	7853,55 (5437,98)	7132,97 (4424,86)	0,35	0,36
VCAM (ng/mL)	876,05 (240,20)	888,26 (223,80)	0,66	0,48
ICAM (ng/mL)	150,41 (72,18)	144,70 (62,25)	0,48	0,53

Valores expressos em média (DP).

*Variáveis transformadas por logn antes das análises

¹ Teste *t* de *student*

² Ajustado por idade, IMC, sexo, raça, ingestão de álcool, tabagismo e atividade física

A Tabela 7 mostra que indivíduos com o alelo mutante (GA+AA) do SNP -308 G>A (rs1800629) do gene do TNF- α apresentam concentração plasmática de sICAM-1 significativamente maior e se manteve após ajuste do modelo. Já a concentração plasmática de PCR passou a ser significativamente menor em comparação com o genótipo dominante após o ajuste do modelo.

Tabela 7 - Associação entre SNP do TNF- α -308 G>A (rs1800629) e concentração de biomarcadores inflamatórios.

Biomarcador Inflamatório	GG (n=225) média (DP)	GA+AA (n=54) média (DP)	p¹	p²
PCR (mg/L)*	3,77 (5,27)	3,54 (3,37)	0,24	0,03
TNF- α (pg/mL)	4,88 (1,91)	4,76 (1,85)	0,70	0,81
IL-8 (pg/mL)*	2,92 (1,88)	2,63 (1,20)	0,63	0,58
IL-6 (pg/mL)*	2,79 (3,43)	2,46 (3,00)	0,34	0,31
IL-1 β (pg/mL)*	0,58 (0,67)	0,66 (0,67)	0,51	0,42
IL-12 (pg/mL)*	5,03 (6,40)	6,03 (10,19)	0,35	0,29
IL-10 (pg/mL)	17,30 (11,28)	18,95 (11,47)	0,34	0,34
MCP-1 (pg/mL)*	210,42 (92,74)	216,98 (72,76)	0,63	0,43
Adiponectina (ng/mL)*	7544,19 (5119,53)	7455,47 (4562,81)	0,98	0,99
VCAM (ng/mL)	881,77 (241,78)	880,95 (191,28)	0,98	0,85
ICAM (ng/mL)	152,48 (70,79)	128,24 (49,14)	0,02	0,03

Valores expressos em média (DP).

*Variáveis transformadas por logn antes das análises

¹ Teste *t* de *student*

² Ajustado por idade, IMC, sexo, raça, ingestão de álcool, tabagismo e atividade física

8.1.2 SNP do gene da PCR

Como observado na Tabela 8, nenhum biomarcador inflamatório foi associado com o SNP +5237 A>G (rs2808630) do gene da PCR.

Tabela 8 - Associação entre SNP da PCR +5237 A>G (rs2808630) e concentração de biomarcadores inflamatórios.

Biomarcador Inflamatório	GG (n=174) média (DP)	GA+AA (n=106) média (DP)	p¹	p²
PCR (mg/L)*	3,76 (5,19)	3,67 (4,57)	0,78	0,32
TNF- α (pg/mL)	4,97 (1,88)	4,67 (1,93)	0,21	0,17
IL-8 (pg/mL)*	2,93 (1,89)	2,75 (1,56)	0,65	0,64
IL-6 (pg/mL)*	2,52 (2,57)	3,06 (4,32)	0,74	0,74
IL-1 β (pg/mL)*	0,59 (0,60)	0,61 (0,77)	0,69	0,61
IL-12 (pg/mL)*	5,05 (6,78)	5,51 (8,06)	0,44	0,29
IL-10 (pg/mL)	17,98 (11,62)	17,05 (10,82)	0,51	0,66
MCP-1 (pg/mL)*	210,08 (82,07)	214,29 (100,29)	0,70	0,67
Adiponectina (ng/mL)*	7487,75 (4825,83)	7591,56 (5318,83)	0,91	0,71
VCAM (ng/mL)	895,85 (240,05)	858,01 (218,62)	0,19	0,10
ICAM (ng/mL)	149,25 (70,49)	145,38 (63,23)	0,64	0,38

Valores expressos em média (DP).

*Variáveis transformadas por logn antes das análises

¹ Teste *t* de *student*

² Ajustado por idade, IMC, sexo, raça, ingestão de álcool, tabagismo e atividade física

Os indivíduos com alelo mutante (AT+TT) para o SNP +1919 A>T (rs1417938) presente no gene da PCR apresentaram concentração plasmática de IL-8 maior estatisticamente significativa comparado com o genótipo dominante, entretanto, há perda de significância após ajustes do modelo (Tabela 9).

Tabela 9 - Associação entre SNP da +1919 A>T (rs1417938) e concentração plasmática de biomarcadores inflamatórios.

Biomarcador Inflamatório	AA (n=133) média (DP)	AT+TT (n=137) média (DP)	p¹	p²
PCR (mg/L)*	3,47 (4,83)	3,63 (4,69)	0,42	0,44
TNF- α (pg/mL)	4,88 (1,95)	4,73 (1,82)	0,51	0,39
IL-8 (pg/mL)*	2,66 (1,56)	3,03 (1,92)	0,04	0,09
IL-6 (pg/mL)*	2,68 (3,55)	2,73 (3,24)	0,34	0,49
IL-1 β (pg/mL)*	0,63 (0,78)	0,55 (0,53)	0,91	0,85
IL-12 (pg/mL)*	5,13 (5,95)	5,17 (8,47)	0,88	0,94
IL-10 (pg/mL)	16,67 (10,66)	18,13 (11,42)	0,28	0,21
MCP-1 (pg/mL)*	209,37 (86,32)	209,77 (83,72)	0,97	0,79
Adiponectina (ng/mL)*	7665,83 (5211,36)	7593,69 (4900,27)	0,89	0,699
VCAM (ng/mL)	856,90 (198,85)	897,90 (260,37)	0,15	0,297
ICAM (ng/mL)	151,91 (74,07)	142,05 (62,27)	0,24	0,30

Valores expressos em média (DP).

*Variáveis transformadas por logn antes das análises

¹ Teste *t* de *student*

² Ajustado por idade, IMC, sexo, raça, ingestão de álcool, tabagismo e atividade física

A Tabela 10 mostra que indivíduos com genótipo dominante do SNP +3872 A>G (rs1205) presente no gene da PCR possuem concentração plasmática maior de PCR em relação aos outros genótipos, no modelo ajustado.

Tabela 10 - Associação entre SNP da PCR +3872 A>G (rs1205) e concentração de biomarcadores inflamatórios.

Biomarcador Inflamatório	GG (n=128) média (DP)	GA (n=115) média (DP)	AA (n=35) média (DP)	p ¹	Modelo codominante ajustado ²	
					p ³	p ⁴
PCR (mg/L)*	4,14 (5,21)	3,30 (4,62)	3,65 (5,23)	0,18	0,015	0,01
TNF- α (pg/mL)	4,76 (1,79)	4,94 (2,06)	4,87 (1,79)	0,76	0,641	0,86
IL-8 (pg/mL)*	2,90 (1,83)	2,89 (1,78)	2,65 (1,56)	0,83	0,78	0,46
IL-6 (pg/mL)*	2,59 (2,56)	2,96 (4,40)	2,39 (1,28)	0,62	0,20	0,84
IL-1 β (pg/mL)*	0,60 (0,62)	0,56 (0,73)	0,68 (0,63)	0,12	0,08	0,53
IL-12 (pg/mL)*	5,03 (7,34)	5,05 (6,69)	6,32 (9,05)	0,59	0,46	0,40
IL-10 (pg/mL)	17,93 (10,10)	16,91 (12,68)	17,48 (9,24)	0,78	0,42	0,96
MCP-1 (pg/mL)*	205,13 (80,87)	224,27 (103,15)	192,43 (63,84)	0,10	0,11	0,50
Adiponectina (ng/mL)*	7518,48 (4738,03)	7386,68 (5366,92)	8111,00 (4999,65)	0,45	0,23	0,48
sVCAM-1 (ng/mL)	860,92 (233,50)	903,25 (239,36)	887,86 (202,28)	0,36	0,11	0,32
sICAM-1 (ng/mL)	143,99 (69,93)	150,91 (61,85)	150,65 (80,14)	0,71	0,44	0,74

Valores expressos em média (DP).

*Variáveis transformadas por log_n antes das análises¹ Teste ANOVA² Ajustado por idade, IMC, sexo, raça, ingestão de álcool, tabagismo e atividade física³ Homozigotos dominantes vs. Heterozigotos⁴ Homozigotos dominantes vs. Homozigotos recessivos

8.1.3 SNP do gene da IL-10

A partir dos resultados obtidos pelo *software Haploview*, o SNP *e/i boundary* C>T (rs1554286) apresentou $r^2 > 0,80$ associado a outros três SNP (rs1800871, rs1800872 e rs3024490), sendo, portanto, considerado um *tag* SNP. Desse modo, nas análises seguintes foram apenas consideradas as análises com SNP *e/i boundary* C>T (rs1554286) representativo dos outros três SNP. Os resultados estão na Tabela 11.

Para o SNP *e/i boundary* C>T (rs1554286) localizado entre o éxon e íntron do gene da IL-10 (Tabela 11), os indivíduos homozigotos recessivos apresentaram maior concentração plasmática de IL-1 β e TNF- α . Na Tabela 12, indivíduos homozigotos dominantes do SNP -1082 A>G (rs1800896) do gene da IL-10 apresentaram maior concentração plasmática de sVCAM-1.

Tabela 11 - Associação entre SNP e/i *boundary* C>T (rs1554286) da IL-10 e concentração plasmática de biomarcadores inflamatórios.

Biomarcador Inflamatório	AA (n=134) média (DP)	AC (n=120) média (DP)	CC (n=25) média (DP)	p ¹	Modelo codominante ajustado ²	
					p ³	p ⁴
PCR (mg/L)*	3,59 (5,05)	4,13 (5,26)	2,41 (2,03)	0,642	0,28	0,88
TNF- α (pg/mL)	4,84 (1,95)	4,72 (1,79)	5,60 (2,08)	0,115	0,72	0,04
IL-8 (pg/mL)*	3,00 (2,08)	2,66 (1,40)	3,09 (1,57)	0,530	0,54	0,33
IL-6 (pg/mL)*	2,65 (3,15)	2,68 (3,19)	3,40 (4,97)	0,444	0,63	0,15
IL-1 β (pg/mL)*	0,55 (0,54) ^a	0,55 (0,58) ^a	1,07 (1,28) ^b	0,019	0,88	0,01
IL-12 (pg/mL)*	4,49 (4,00)	5,59 (8,56)	7,44 (12,22)	0,235	0,49	0,25
IL-10 (pg/mL)	17,44 (11,80)	17,16 (11,01)	21,00 (10,07)	0,295	0,64	0,25
MCP-1 (pg/mL)*	222,66 (100,81)	201,81 (77,43)	192,88 (60,58)	0,099	0,05	0,27
Adiponectina (ng/mL)*	7372,56 (5250,00)	7632,25 (4897,96)	7993,26 (4374,50)	0,476	0,42	0,68
sVCAM-1 (ng/mL)	865,57 (216,25)	883,33 (252,77)	953,06 (210,50)	0,225	0,42	0,07
sICAM-1 (ng/mL)	147,28 (70,26)	149,74 (66,99)	135,92 (53,88)	0,649	0,60	0,60

Valores expressos em média (DP).

*Variáveis transformadas por log_n antes das análises¹ Teste ANOVA² Ajustado por idade, IMC, sexo, raça, ingestão de álcool, tabagismo e atividade física³ Homozigotos dominantes vs. Heterozigotos⁴ Homozigotos dominantes vs. Homozigotos recessivos

Tabela 12 - Associação entre SNP -1082 A>G (rs1800896) da IL-10 e concentração plasmática de biomarcadores inflamatórios.

Biomarcador Inflamatório	GG (n=113) média (DP)	GA (n=122) média (DP)	AA (n=38) média (DP)	p ¹	Modelo codominante ajustado ²	
					p ³	p ⁴
PCR (mg/L)*	4,21 (5,28)	3,53 (4,83)	3,18 (4,69)	0,40	0,30	0,13
TNF- α (pg/mL)	4,81 (1,84)	4,89 (2,00)	4,94 (1,88)	0,91	0,84	0,71
IL-8 (pg/mL)*	2,79 (1,60)	2,95 (1,76)	2,89 (2,31)	0,68	0,47	0,91
IL-6 (pg/mL)*	2,54 (2,81)	3,08 (4,14)	2,27 (1,75)	0,67	0,46	0,95
IL-1 β (pg/mL)*	0,65 (0,80)	0,57 (0,59)	0,57 (0,47)	0,57	0,30	0,78
IL-12 (pg/mL)*	4,89 (6,39)	5,57 (8,60)	5,32 (5,38)	0,73	0,80	0,50
IL-10 (pg/mL)	17,13 (10,43)	17,52 (11,12)	19,90 (13,32)	0,41	0,90	0,23
MCP-1 (pg/mL)*	207,29 (80,38)	212,56 (81,36)	227,63 (134,00)	0,48	0,46	0,23
Adiponectina (ng/mL)*	6992,92 (4529,62)	7589,56 (5058,19)	8729,78 (6254,28)	0,31	0,98	0,09
sVCAM-1 (ng/mL)	919,88 (228,21) ^a	842,87 (233,80) ^b	888,89 (219,63) ^{ab}	0,04	0,04	0,38
sICAM-1 (ng/mL)	150,42 (62,19)	142,44 (69,58)	149,49 (70,51)	0,63	0,56	1,00

Valores expressos em média (DP).

*Variáveis transformadas por log_n antes das análises¹ Teste ANOVA² Ajustado por idade, IMC, sexo, raça, ingestão de álcool, tabagismo e atividade física³ Homozigotos dominantes vs. Heterozigotos⁴ Homozigotos dominantes vs. Homozigotos recessivos

8.2 ANÁLISE MULTIVARIADA DE CLUSTER

8.2.1 Descrição dos grupos formados

A análise multivariada de cluster, considerando a concentração plasmática dos biomarcadores inflamatórios, permitiu separar a amostra de 262 indivíduos em dois grupos, que foram nomeados em “inflamados” e “não inflamados”. A Tabela 13 mostra características desses grupos segundo a concentração plasmática de biomarcadores. É possível constatar que o grupo “inflamado” apresentou concentrações plasmáticas de PCR, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, MCP-1, e sICAM-1 estatisticamente maiores em comparação ao grupo “não inflamado”, sendo que apenas o biomarcador adiponectina apresentou concentração plasmática estatisticamente menor no grupo “inflamado” quando comparado com o grupo “não inflamado”.

Tabela 13 - Concentração plasmática de biomarcadores inflamatórios segundo grupos formados. ISA-capital, São Paulo, 2008-2010.

	Não Inflamado (n=169)	Inflamado (n=93)	p
<i>Biomarcadores</i>			
PCR (mg/L)*	1,7 (0,8-3,5)	3,6 (1,4-6,5)	<0,001
TNF- α (pg/mL)	3,90 (1,23)	6,48 (1,72)	<0,001
IL-8 (pg/mL)*	3,91 (3,05-4,65)	6,5 (5,34-7,58)	<0,001
IL-6 (pg/mL)*	2,00 (1,41-2,70)	3,48 (2,62-4,73)	<0,001
IL-1 β (pg/mL)*	1,46 (0,99-2,02)	2,96 (2,27-4,52)	<0,001
IL-12 (pg/mL)*	3,12 (1,74-4,63)	5,92 (3,72-8,32)	<0,001
IL-10 (pg/mL)	13,58 (7,64)	24,51 (12,51)	<0,001
MCP-1 (pg/mL)*	189 (76)	253 (100)	<0,001
Adiponectina (ng/mL)*	7123 (4694-10364)	4625 (3427-7567)	<0,001
sVCAM-1 (ng/mL)	851 (234)	908 (208)	0,054
sICAM-1 (ng/mL)	138(56)	167 (78)	<0,001

Valores apresentados como média (DP) quando a variável apresentava distribuição normal, caso contrário, mediana (IIQ).

*Variáveis transformadas por logn antes das análises

Valor de p proveniente do test t de *Student*.

Além da diferença na concentração plasmática dos biomarcadores inflamatórios, os indivíduos pertencentes ao grupo inflamado também apresentaram idade, pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e concentrações plasmáticas de triacilgliceróis significativamente maiores quando comparados aos indivíduos do grupo não inflamado (Tabela 14).

Tabela 14 - Características antropométricas e bioquímicas segundo grupos formados. ISA-capital, São Paulo, 2008-2010.

	Não Inflamado (n=169)	Inflamado (n=93)	p
	Média (DP)	Média (DP)	
<i>Antropométricas</i>			
Idade (anos)	36,12 (12,19)	41,35 (11,86)	<0,001
IMC (Kg/m ²)	25,69 (4,57)	26,99 (6,41)	0,060
Circunferência da Cintura (cm)	89,96 (12,77)	94,01 (15,75)	0,03
PAS (mmHg)	117,38 (13,80)	123,14 (20,07)	0,007
PAD (mmHg)	73,54 (11,28)	78,57 (14,20)	0,002
<i>Frações de lipídicas</i>			
HDL-c (mg/dL)	48,07 (12,14)	45,86 (11,25)	0,150
LDL-c (mg/dL)	111,97 (33,89)	112,28 (33,40)	0,943
Colesterol Total (mg/dL)	183,34 (41,61)	189,14 (37,94)	0,269
TG (mg/dL)	117,20 (67,15)	145,44 (86,42)	0,002

Valor de p proveniente do teste t de *Student*.

Os indivíduos pertencentes ao grupo inflamado apresentaram maior proporção de fumantes (30,18%) em comparação ao grupo não inflamado (20,12%) e a associação entre hábito de fumar e grupos inflamados e não inflamados foi estatisticamente significativa (Tabela 15).

Tabela 15 - Distribuição de indivíduos segundo grupos formados e características extraídas do inquérito de saúde. ISA-capital, São Paulo, 2008-2010.

	Não Inflamado (n=169)		Inflamado (n=93)		P
	N	%	N	%	
<i>Sexo</i>					
Masculino	61	36,10	39	41,94	0,352
Feminino	108	63,90	54	58,06	
<i>Hábito de fumar</i>					
Sim	34	20,12	29	30,18	0,045
Não	135	79,88	64	69,82	
<i>Atividade física moderada</i>					
Sim	24	14,20	8	8,60	0,185
Não	145	85,80	85	92,40	
<i>Etilismo</i>					
Sim	83	49,11	56	60,22	0,085
Não	86	50,89	37	39,78	
<i>Cor de pele</i>					
Caucasianos	100	59,17	54	58,07	0,862
Não caucasianos	69	40,83	39	41,93	

Valor de p proveniente do teste χ^2

8.2.2 Associação entre os grupos inflamados e ácidos graxos plasmáticos

Indivíduos pertencentes ao grupo inflamado apresentaram maiores concentrações de AG palmítico, PUFA, n-6 PUFA, ácido araquidônico, SFA/n-6, SFA/PUFA, SCD-18 e atividade estimada da enzima D5D, apesar de apenas o ácido araquidônico se manter estatisticamente significativo após o ajuste do modelo (Tabela 16).

Tabela 16 - Ácidos Graxos do plasma segundo grupos formados. ISA-capital, São Paulo, 2008-2010.

Ácidos Graxos do Plasma (%)	Não Inflamado (n=169)	Inflamado (n=93)	p ¹	p ²
SFA	39,44 (2,64)	39,89 (2,88)	0,209	0,397
Mirístico (C14:0)*	0,77 (0,56-1,06)	0,86 (0,54-1,21)	0,165	0,888
Palmítico (C16:0)*	27,44 (2,55)	28,14 (2,68)	0,039	0,252
Esteárico (C18:0)	11,15 (1,49)	10,81 (1,73)	0,098	0,681
MUFA*	19,23 (16,37-21,72)	20,57 (17,48-23,76)	0,051	0,612
Palmitoleico (C16:1)*	1,77 (1,35-2,24)	2,07 (1,05)	0,164	0,928
Oleico (C18:1)*	17,38 (15,11-19,61)	18,68 (16,14-21,05)	0,058	0,578
PUFA	40,93 (4,81)	39,32 (4,85)	0,011	0,315
n-6	36,71 (4,58)	35,29 (4,63)	0,018	0,430
Linoleico (C18:2)	25,26 (3,89)	24,68 (4,20)	0,266	0,716
DGLA (C20:3)	2,45 (0,56)	2,43 (0,55)	0,761	0,764
Araquidônico (C20:4)	9,01 (2,19)	8,19 (1,75)	0,002	0,024
n-3*	3,96 (3,61-4,64)	3,76 (3,45-4,43)	0,173	0,351
α -linolênico (C18:3)*	0,61 (0,49-0,75)	0,65 (0,49-0,83)	0,247	0,419
Eicosapentaenoico (C20:5)*	0,49 (0,36-0,63)	0,47 (0,35-0,60)	0,382	0,280
Docosapentaenoico C22:5)*	0,80 (0,65-0,99)	0,78 (0,70-0,87)	0,253	0,436
Docosaenoico (C22:6)*	2,06 (1,70-2,46)	1,89 (1,54-2,42)	0,081	0,313
n3 HUFA*	3,39 (2,92-4,01)	3,15 (2,68-3,77)	0,080	0,226
<i>Razões</i>				
SFA/n-6	1,10 (0,20)	1,16 (0,22)	0,025	0,355
SFA/n-3	9,98 (2,6)	10,46 (2,4)	0,144	0,394
SFA/PUFA	0,98 (0,17)	1,04 (0,19)	0,021	0,314
n-6/n-3	9,22 (2,27)	9,20 (2,05)	0,953	0,674
AA/EPA*	17,8 (13,7 – 24,6)	16,7 (13,8 – 21,9)	0,602	0,878
<i>Estimativas de atividade enzimática</i>				
SCD-16*	0,07 (0,05-0,08)	0,07 (0,05 – 0,09)	0,299	0,714
SCD-18*	1,55 (1,29 – 1,89)	1,74 (1,37 – 2,16)	0,045	0,560
D5D*	3,86 (1,2)	3,52 (1,0)	0,025	0,178
D6D*	0,1 (0,03)	0,1 (0,03)	0,704	0,845

*Variáveis transformadas por logn antes das análises

Dados estão apresentados como média(DP) ou mediana (IIQ) quando as variáveis foram transformadas por logn.

SFA, ácido graxo saturado; MUFA, ácido graxo monoinsaturado; PUFA, ácidos graxos poliinsaturado; n6, ômega-6; n3, ômega-3; DGLA, dihomog- γ -linoleic; HUFA, ácidos graxos de cadeia

muito longa; AA, ácido araquidônico; SCD, estearoil-CoA dessaturase; D5D, delta-5-dessaturase; D6D, delta-6-dessaturase.

¹Teste t de Student

² Valor ajustado por idade, sexo, IMC, atividade física, fumo e consumo de álcool

8.2.3 Associação entre SNP e grupos formados pela Análise Multivariada de Cluster

Não se observou associação entre os SNP analisados e os grupos formados pela análise multivariada de Cluster (Tabelas 17 a 19) após uma análise de χ^2 .

Tabela 17 - Associação entre SNP do gene do TNF- α e grupos formados.

SNP	Genótipo	Não Inflamado		Inflamado		p
		n	%	n	%	
TNF- α (rs1800629)	GG	136	65,07	73	34,93	0,703
	GA+AA	33	62,26	20	37,74	
TNF- α (rs1799724)	CC	135	64,29	75	35,71	0,955
	CT+TT	33	64,71	18	35,29	
TNF- α (rs361525)	GG	150	65,50	79	34,50	0,374
	GA+AA	19	57,58	14	42,42	
TNF- α (rs1799964)	TT	92	63,89	52	36,11	0,818
	TC+CC	77	65,25	41	34,75	

Valor de p proveniente do teste χ^2

Tabela 18 - Associação entre SNP do gene da PCR e grupos formados.

SNP	Genótipo	Não Inflamado		Inflamado		p
		n	%	n	%	
PCR (rs1205)	GG	81	66,39	41	33,61	0,859
	GA	69	64,49	38	35,51	
	AA	19	61,29	12	38,71	
PCR (rs2808630)	AA	103	63,58	59	36,42	0,691
	AC+CC	66	66,00	34	34,00	
PCR (rs1417938)	AA	79	63,20	46	36,80	0,4
	AT+TT	88	68,22	41	31,78	

Valor de p proveniente do teste χ^2

Tabela 19 - Associação entre SNP do gene da IL-10 e grupos formados.

SNP	genótipo	Não Inflamado		Inflamado		p
		n	%	n	%	
IL-10 (rs1554286)	AA	79	64,23	44	35,77	0,729
	AC	76	66,67	38	33,33	
	CC	14	58,33	10	41,67	
IL-10 (rs1800872)	AA	71	63,39	41	36,61	0,521
	AC	81	66,94	40	33,06	
	CC	15	55,56	12	44,44	
IL-10 (rs1800896)	GG	68	61,82	42	38,18	0,748
	GA	72	64,86	39	35,14	
	AA	24	68,57	11	31,43	
IL-10 (rs1800871)	CC	70	63,64	40	36,36	0,424
	CA	84	67,20	41	32,80	
	AA	14	53,85	12	46,15	
IL-10 (rs3024490)	GG	71	64,55	39	35,45	0,268
	GA	82	67,77	39	32,23	
	AA	15	51,72	14	48,28	

Valor de p proveniente do teste χ^2

8.3 INTERAÇÃO ENTRE ÁCIDOS GRAXOS DO PLASMA E PRESENÇA DE SNP SOBRE A CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS

8.3.1 SNP do gene do TNF- α

Como é possível constatar na Tabela 20, indivíduos homozigotos dominantes para o SNP -238 G>A (rs361525), apresentaram redução da chance de pertencer ao grupo inflamado quando a concentração plasmática de n-3 HUFA e a atividade estimada da enzima D5D estavam acima da mediana. Indivíduos portadores do alelo recessivo para o mesmo polimorfismo também apresentaram redução da chance de pertencer ao grupo inflamado no maior percentil de n-3 HUFA e DPA plasmáticos.

Para o SNP -857 C>T (rs1799724), indivíduos CC apresentaram redução da chance de pertencer ao grupo inflamado quando apresentavam valores acima da mediana para C18:0, AA, n-3 HUFA e atividade estimada da D5D. Aqueles indivíduos que possuíam o alelo variante (CT+TT) apresentaram maior chance de pertencer ao grupo inflamado no maior percentil para razão n-6/n-3 e SFA/n-3 PUFA, quando comparados ao menor percentil.

Considerando o SNP -1031 T>C (rs1799964), indivíduos homozigotos dominantes apresentaram proteção ao grupo inflamado quando possuíam valores acima da mediana para a atividade da D5D estimada. Indivíduos com alelo mutante que se encontravam no maior percentil de AA, n-3 e n-3 HUFA apresentaram menor chance de pertencer ao grupo inflamado. Entretanto, quando os indivíduos TC+CC estavam no maior percentil da razão n-6/n-3 e SFA/n-3 PUFA apresentaram chance aumentada de estar no grupo inflamado.

Em relação ao SNP -308 G>A (rs1800629), apenas indivíduos homozigotos dominantes apresentaram associações entre AG do plasma e inflamação. Esses indivíduos, quando se encontravam no percentil superior de n-3, DPA, DHA, n-3 HUFA e atividade estimada da D5D apresentaram redução da chance de pertencerem ao grupo inflamado. Contudo, observou-se uma chance aumentada para o grupo inflamado quando esses

indivíduos estavam com valores acima da mediana do C18:3 n-3, razão n-6/n-3 e a atividade estimada da SCD-18.

Tabela 20- OR (IC95%) para grupo inflamado no percentil maior (acima da mediana) de AG do plasma, estratificado por genótipos dos SNP do gene do TNF- α .

OR para perfil dos AG do plasma (%)	TNF- α 238 G>A (rs361525)			TNF- α SNP -857 C>T (rs1799724)		
	GG (n=244)	GA+AA (n=244)	P value ²	CC (n=227)	CT+TT (n=53)	p value ²
SFA	1,10 (0,62-1,96)	0,56 (0,12-2,67)	0,485	0,85 (0,47-1,56)	4,30 (0,98-18,79)	0,114
C14:0	1,04 (0,57-1,89)	1,91 (0,44-8,26)	0,471	1,03 (0,56-1,90)	1,67 (0,46-6,07)	0,651
C16:0	1,26 (0,71-2,24)	1,39 (0,29-6,61)	0,884	1,26 (0,69-2,30)	2,21 (0,55-8,8)	0,782
C18:0	0,62 (0,34-1,10)	0,89 (0,17-4,77)	0,528	0,53 (0,29-0,97)	2,08 (0,46-9,36)	0,106
MUFA	1,16 (0,63-2,12)	0,92 (0,15-5,45)	0,718	1,20 (0,64-2,25)	0,71 (0,19-2,68)	0,447
C16:1	1,13 (0,62-2,07)	0,80 (0,18-3,61)	0,647	0,89 (0,48-1,66)	2,36 (0,6-9,36)	0,262
C18:1	1,10 (0,6-2,00)	0,66 (0,12-3,70)	0,549	1,02 (0,54-1,92)	0,86 (0,23-3,27)	0,787
PUFA	0,75 (0,41-1,38)	0,60 (0,14-2,61)	0,803	0,80 (0,43-1,48)	0,45 (0,12-1,67)	0,616
n-6	0,86 (0,47-1,58)	1,44 (0,32-6,43)	0,513	0,84 (0,45-1,58)	1,19 (0,31-4,55)	0,472
C18:2	1,09 (0,60-2,00)	5,18 (0,88-30,37)	0,108	1,58 (0,84-3,01)	0,67 (0,19-2,31)	0,345
C20:3	1,19 (0,67-2,14)	0,81 (0,18-3,75)	0,718	1,09 (0,59-2,00)	1,72 (0,49-6,01)	0,548
C20:4	0,57 (0,32-1,04)	0,23 (0,05-1,16)	0,351	0,41 (0,22-0,76)	1,15 (0,32-4,18)	0,122
n-3	0,65 (0,36-1,18)	0,20 (0,03-1,27)	0,312	0,63 (0,34-1,17)	0,37 (0,10-1,43)	0,51
C18:3	1,32 (0,74-2,33)	1,37 (0,30-6,31)	0,92	1,44 (0,79-2,62)	0,88 (0,26-2,97)	0,471
C20:5	0,75 (0,41-1,37)	0,24 (0,04-1,49)	0,295	0,58 (0,31-1,09)	1,13 (0,30-4,27)	0,532
C22:5	0,70 (0,38-1,28)	0,19 (0,04-0,97)	0,143	0,57 (0,3-1,07)	1,00 (0,26-3,8)	0,664
C22:6	0,62 (0,34-1,13)	0,33 (0,07-1,63)	0,498	0,66 (0,36-1,23)	0,31 (0,09-1,16)	0,314
n3 HUFA	0,53 (0,29-0,97)	0,14 (0,02-0,83)	0,209	0,46 (0,25-0,87)	0,38 (0,1-1,45)	0,813
n-6/n-3	1,63 (0,88-3,05)	4,80 (0,84-27,62)	0,299	1,46 (0,77-2,77)	4,81 (1,15-20,15)	0,11
C16:1/16:0	1,08 (0,58-2,00)	0,37 (0,07-1,99)	0,221	0,80 (0,42-1,51)	1,44 (0,4-5,15)	0,514

Tabela 21- OR (IC95%) para grupo inflamado no percentil maior (acima da mediana) de AG do plasma, estratificado por genótipos dos SNP do gene do TNF- α (continuação).

C18:1/18:0	1,73 (0,96-3,12)	1,15 (0,23-5,75)	0,523	1,83 (0,99-3,39)	0,88 (0,23-3,41)	0,307
C20:3/18:2n-6	1,24 (0,69-2,22)	1,23 (0,21-7,07)	0,998	1,29 (0,71-2,37)	1,39 (0,36-5,33)	0,869
C20:4/20:3	0,41 (0,23-0,75)	1,06 (0,25-4,56)	0,255	0,40 (0,21-0,74)	0,82 (0,22-3,05)	0,206
SFA/n-6 PUFA	1,06 (0,58-1,95)	1,31 (0,31-5,62)	0,807	0,90 (0,48-1,69)	4,02 (0,96-16,91)	0,17
SFA/n-3 PUFA	1,40 (0,78-2,52)	4,40 (0,66-29,15)	0,342	1,26 (0,68-2,32)	4,73 (1,17-19,18)	0,096
SFA/PUFA	1,14 (0,63-2,08)	1,31 (0,31-5,62)	0,875	0,97 (0,52-1,8)	3,98 (0,95-16,64)	0,193
AA/EPA	1,15 (0,62-2,12)	1,62 (0,36-7,21)	0,621	1,08 (0,58-2,02)	1,66 (0,42-6,62)	0,459

SFA, ácido graxo saturado; MUFA, ácido graxo monoinsaturado; PUFA, ácidos graxos poliinsaturado; n6, ômega-6; n3, ômega-3; HUFA, ácidos graxos de cadeia muito longa; AA, ácido araquidônico.

¹Valores são OR(95% CI), ajustado por IMC, idade, sexo e hábito de fumar. Indivíduos com AG plasmático abaixo da mediana é o grupo referência.

²P-value para interação entre SNP e concentração de AG do plasma. OR (IC95%) e valores de p em negrito representam p<0,05.

Tabela 22 - OR (IC95%) para grupo inflamado no percentil maior (acima da mediana) de AG do plasma, estratificado por genótipos dos SNP do gene do TNF- α .

OR para perfil dos AG do plasma (%)	TNF- α -1031 T>C (rs1799964)			TNF- α 308 G>A (rs1800629)		
	TT (n=153)	TC+CC (n=128)	p value ²	GG (n=227)	GA+AA (n=54)	P value ²
SFA	0,84 (0,41-1,73)	1,36 (0,61-3,02)	0,341	0,87 (0,48-1,59)	1,82 (0,52-6,41)	0,349
C14:0	0,83 (0,39-1,77)	1,60 (0,7-3,66)	0,238	1,25 (0,67-2,32)	0,53 (0,15-1,86)	0,323
C16:0	1,28 (0,62-2,61)	1,35 (0,6-3,05)	0,871	1,19 (0,65-2,18)	1,82 (0,52-6,41)	0,353
C18:0	0,52 (0,25-1,08)	0,91 (0,4-2,04)	0,368	0,51 (0,27-0,95)	1,93 (0,57-6,55)	0,294
MUFA	1,03 (0,48-2,23)	1,22 (0,53-2,79)	0,688	1,19 (0,64-2,22)	0,84 (0,2-3,52)	0,814
C16:1	1,03 (0,48-2,23)	1,09 (0,47-2,52)	0,808	1,08 (0,58-2,03)	0,83 (0,23-2,97)	0,775
C18:1	1,07 (0,5-2,3)	1,01 (0,44-2,33)	0,992	1,16 (0,62-2,16)	0,63 (0,15-2,69)	0,53
PUFA	0,82 (0,37-1,79)	0,65 (0,29-1,46)	0,563	0,72 (0,38-1,35)	0,97 (0,25-3,86)	0,969
n-6	0,83 (0,38-1,78)	1,10 (0,48-2,52)	0,754	0,92 (0,49-1,73)	1,16 (0,3-4,53)	0,827
C18:2	1,08 (0,5-2,32)	1,73 (0,74-4,02)	0,507	1,68 (0,88-3,21)	0,75 (0,21-2,66)	0,653
C20:3	1,14 (0,55-2,38)	1,13 (0,5-2,55)	0,937	0,92 (0,50-1,69)	2,53 (0,68-9,44)	0,167
C20:4	0,66 (0,32-1,37)	0,41 (0,18-0,92)	0,349	0,47 (0,25-0,87)	0,67 (0,19-2,33)	0,531
n-3	0,80 (0,38-1,7)	0,37 (0,16-0,89)	0,212	0,43 (0,22-0,83)	1,32 (0,39-4,52)	0,654
C18:3	1,43 (0,69-2,96)	1,10 (0,49-2,44)	0,639	1,35 (0,75-2,46)	1,28 (0,36-4,61)	0,704
C20:5	0,77 (0,37-1,61)	0,58 (0,25-1,36)	0,56	0,59 (0,31-1,13)	0,81 (0,22-2,91)	0,741
C22:5	0,66 (0,31-1,42)	0,56 (0,24-1,33)	0,798	0,50 (0,26-0,96)	1,30 (0,37-4,63)	0,686
C22:6	0,72 (0,34-1,52)	0,43 (0,19-1,01)	0,391	0,47 (0,25-0,89)	1,01 (0,28-3,66)	0,983
n3 HUFA	0,73 (0,35-1,56)	0,23 (0,1-0,58)	0,073	0,36 (0,18-0,69)	0,85 (0,25-2,84)	0,788
n-6/n-3	1,62 (0,76-3,46)	2,59 (1,01-6,65)	0,629	2,67 (1,33-5,33)	0,65 (0,18-2,31)	0,502

Tabela 23 - OR (IC95%) para grupo inflamado no percentil maior (acima da mediana) de AG do plasma, estratificado por genótipos dos SNP do gene do TNF- α (continuação).

C16:1/16:0	1,28 (0,59-2,76)	0,58 (0,24-1,41)	0,262	0,95 (0,51-1,79)	0,72 (0,2-2,61)	0,469
C18:1/18:0	1,77 (0,83-3,75)	1,50 (0,67-3,38)	0,863	2,06 (1,11-3,84)	0,58 (0,15-2,25)	0,071
C20:3/18:2n-6	1,25 (0,6-2,58)	1,18 (0,52-2,68)	0,969	0,90 (0,48-1,69)	2,71 (0,76-9,71)	0,085
C20:4/20:3	0,40 (0,19-0,86)	0,63 (0,29-1,4)	0,465	0,51 (0,28-0,94)	0,53 (0,14-1,98)	0,893
SFA/n-6 PUFA	0,96 (0,45-2,04)	1,29 (0,55-3,00)	0,55	0,97 (0,51-1,83)	1,41 (0,38-5,28)	0,519
SFA/n-3 PUFA	1,00 (0,48-2,06)	2,73 (1,15-6,51)	0,09	1,87 (1-30,5,00)	0,71 (0,21-2,47)	0,316
SFA/PUFA	1,09 (0,52-2,31)	1,29 (0,57-2,96)	0,700	1,00 (0,53-1,86)	1,84 (0,51-6,68)	0,37
AA/EPA	1,45 (0,67-3,15)	0,97 (0,41-2,28)	0,494	1,24 (0,65-2,35)	1,19 (0,34-4,22)	0,815

SFA, ácido graxo saturado; MUFA, ácido graxo monoinsaturado; PUFA, ácidos graxos poliinsaturado; n6, ômega-6; n3, ômega-3; HUFA, ácidos graxos de cadeia muito longa; AA, ácido araquidônico.

¹Valores são OR(95% CI), ajustado por IMC, idade, sexo e hábito de fumar. Indivíduos com AG plasmático abaixo da mediana é o grupo referência.

²P-value para interação entre SNP e concentração de AG do plasma. OR (IC95%) e valores de p em negrito representam p<0,05.

8.3.2 SNP do gene da PCR

Observando os dados da Tabela 21, indivíduos homozigotos dominantes do SNP +3872 A>G (rs1205) apresentaram proteção para a inflamação quando estavam no percentil maior de DPA. Já os indivíduos portadores do alelo variante desse mesmo gene apresentaram proteção no percentil maior de EPA, n-3 HUFA e atividade enzimática da D5D estimada.

Para o SNP +1919 A>T (rs1417938), foi observada interação entre o SNP e C18:1n-7, razões SFA/n-6 PUFA e SFA/PUFA do plasma. Apesar da interação significativa, ao estratificar as análises por genótipos, não houve associação entre genótipos do SNP +1919 A>T (rs1417938) e razão SFA/n-6 PUFA. Indivíduos homozigotos dominantes apresentaram maior chance de inflamação no maior percentil de C18:1n-7, razões n6/n3, SFA/n-3 PUFA e SFA/PUFA. Foi observada proteção apenas para o maior percentil de n-3 HUFA e atividade estimada da D5D. Em contraste, os indivíduos portadores do alelo variante apresentaram redução da chance para inflamação no maior percentil de ácido araquidônico e DPA.

Já para o SNP +5237 A>C (rs2808630), apenas os indivíduos homozigotos dominantes apresentaram associação entre AG do plasma e grupo inflamado. Indivíduos no maior percentil de ácido araquidônico, n-3 HUFA e atividade enzimática D5D estimada apresentaram proteção em comparação àqueles que estavam no menor percentil.

Tabela 24 - OR (IC95%) para grupo inflamado no percentil maior (acima da mediana) de AG do plasma, estratificado por genótipos dos SNP do gene da PCR.

OR para perfil dos AG do plasma (%)	CRP +3872 A>G (rs1205)			CRP +1919 A>T (rs1417938)			CRP +5237 A>C (rs2808630)		
	GG (n=129)	GA+AA (n=150)	p value ²	AA (n=134)	AT+TT (n=138)	p value ²	AA (n=175)	AC+CC (n=106)	p value ²
SFA	1,15 (0,5-2,65)	0,90 (0,44-1,85)	0,55	1,48 (0,66-3,29)	0,67 (0,3-1,46)	0,12	0,80 (0,41-1,56)	1,62 (0,66-3,99)	0,19
C14:0	1,39 (0,59-3,29)	1,00 (0,48-2,10)	0,30	1,52 (0,67-3,46)	0,80 (0,35-1,81)	0,23	1,18 (0,60-2,32)	0,98 (0,38-2,51)	0,93
C16:0	1,42 (0,61-3,31)	1,32 (0,64-2,73)	0,92	1,60 (0,71-3,62)	1,20 (0,55-2,62)	0,41	0,94 (0,48-1,85)	2,26 (0,90-5,66)	0,13
C18:0	0,57 (0,24-1,34)	0,56 (0,27-1,18)	0,94	0,84 (0,36-1,94)	0,56 (0,26-1,23)	0,60	0,54 (0,27-1,06)	0,85 (0,34-2,15)	0,45
MUFA	1,34 (0,56-3,20)	1,09 (0,49-2,41)	0,36	1,35 (0,57-3,18)	0,88 (0,38-2,01)	0,34	0,98 (0,48-2,02)	1,56 (0,60-4,06)	0,29
C16:1	1,84 (0,78-4,32)	0,65 (0,30-1,42)	0,015	2,65 (1,09-6,46)	0,58 (0,25-1,37)	0,047	0,86 (0,42-1,73)	1,40 (0,54-3,62)	0,20
C18:1	1,30 (0,55-3,10)	0,91 (0,42-2,00)	0,26	0,98 (0,42-2,32)	1,02 (0,45-2,31)	0,79	0,95 (0,47-1,93)	1,32 (0,50-3,44)	0,39
PUFA	0,51 (0,22-1,21)	0,92 (0,42-2,04)	0,12	0,48 (0,20-1,14)	1,00 (0,45-2,25)	0,19	0,84 (0,41-1,73)	0,57 (0,23-1,44)	0,33
n-6	0,55 (0,24-1,30)	1,19 (0,54-2,63)	0,07	0,57 (0,24-1,32)	1,38 (0,61-3,15)	0,11	1,14 (0,55-2,37)	0,66 (0,27-1,64)	0,20
C18:2	1,40 (0,57-3,40)	1,43 (0,66-3,07)	0,50	1,39 (0,6-3,230)	1,47 (0,64-3,35)	0,67	1,67 (0,81-3,43)	0,95 (0,37-2,44)	0,17
C20:3	0,76 (0,32-1,81)	1,35 (0,65-2,79)	0,53	1,47 (0,64-3,38)	1,05 (0,47-2,35)	0,99	1,18 (0,60-2,31)	0,94 (0,37-2,39)	0,77
C20:4	0,47 (0,20-1,11)	0,51 (0,25-1,07)	0,78	0,65 (0,29-1,48)	0,36 (0,16-0,81)	0,31	0,43 (0,21-0,85)	0,78 (0,31-1,94)	0,32
n-3	0,57 (0,23-1,39)	0,53 (0,25-1,15)	0,53	0,46 (0,19-1,10)	0,61 (0,27-1,36)	0,33	0,57 (0,28-1,17)	0,72 (0,29-1,84)	0,53
C18:3	1,48 (0,63-3,46)	1,18 (0,58-2,40)	0,62	0,83 (0,37-1,86)	1,78 (0,81-3,90)	0,23	1,62 (0,82-3,17)	0,96 (0,39-2,35)	0,40
C20:5	1,12 (0,47-2,64)	0,37 (0,17-0,83)	0,07	0,48 (0,2-1,160)	0,93 (0,42-2,08)	0,49	0,56 (0,27-1,14)	0,97 (0,39-2,43)	0,26
C22:5	0,38 (0,14-0,98)	0,73 (0,34-1,55)	0,78	1,11 (0,47-2,60)	0,34 (0,14-0,80)	0,09	0,51 (0,25-1,03)	0,87 (0,34-2,24)	0,17
C22:6	0,48 (0,20-1,15)	0,68 (0,32-1,45)	0,77	0,47 (0,21-1,08)	0,55 (0,25-1,26)	0,31	0,50 (0,25-1,01)	0,79 (0,32-1,98)	0,38
n3 HUFA	0,54 (0,23-1,30)	0,39 (0,18-0,86)	0,30	0,34 (0,14-0,84)	0,52 (0,24-1,16)	0,22	0,44 (0,21-0,89)	0,53 (0,20-1,38)	0,51
n-6/n-3	1,80 (0,71-4,56)	2,16 (0,99-4,69)	0,20	2,79 (1,12-6,97)	1,71 (0,74-3,97)	0,28	1,63 (0,79-3,37)	2,25 (0,83-6,05)	0,89

Tabela 25 - OR (IC95%) para grupo inflamado no percentil maior (acima da mediana) de AG do plasma, estratificado por genótipos dos SNP do gene da PCR (continuação)

C16:1/16:0	1,08 (0,45-2,57)	0,74 (0,34-1,60)	0,13	2,00 (0,84-4,76)	0,56 (0,23-1,33)	0,12	0,99 (0,49-2,03)	0,78 (0,30-2,04)	0,81
C18:1/18:0	0,93 (0,39-2,21)	1,25 (0,57-2,70)	0,16	0,50 (0,21-1,19)	1,70 (0,71-4,07)	0,15	0,94 (0,46-1,93)	1,29 (0,49-3,39)	0,90
C20:3/18:2n-6	0,91 (0,39-2,15)	1,45 (0,7-3,03)	0,851	1,45 (0,64-3,28)	1,16 (0,52-2,62)	0,884	1,23 (0,63-2,43)	1,05 (0,39-2,83)	0,884
C20:4/20:3	0,70 (0,31-1,60)	0,31 (0,15-0,68)	0,198	0,34 (0,15-0,77)	0,70 (0,32-1,55)	0,244	0,44 (0,22-0,87)	0,65 (0,26-1,60)	0,515
SFA/n-6 PUFA	1,38 (0,59-3,26)	0,97 (0,45-2,07)	0,218	1,99 (0,83-4,8)	0,64 (0,28-1,43)	0,047	0,84 (0,42-1,71)	1,71 (0,66-4,45)	0,112
SFA/n-3 PUFA	2,10 (0,86-5,15)	1,31 (0,62-2,77)	0,732	2,56 (1,05-6,25)	1,14 (0,51-2,52)	0,094	1,10 (0,55-2,2)	2,29 (0,88-5,93)	0,316
SFA/PUFA	1,58 (0,68-3,69)	1,01 (0,47-2,16)	0,204	2,52 (1,03-6,15)	0,71 (0,32-1,58)	0,036	0,86 (0,43-1,73)	1,96 (0,77-4,98)	0,083
AA/EPA	1,26 (0,5-3,15)	1,28 (0,6-2,75)	0,448	1,17 (0,48-2,83)	1,26 (0,55-2,87)	0,84	1,21 (0,6-2,41)	1,24 (0,44-3,50)	0,546

SFA, ácido graxo saturado; MUFA, ácido graxo monoinsaturado; PUFA, ácidos graxos poliinsaturado; n6, ômega-6; n3, ômega-3; HUFA, ácidos graxos de cadeia muito longa; AA, ácido araquidônico.

¹Valores são OR(95% CI), ajustado por IMC, idade, sexo e hábito de fumar. Indivíduos com AG plasmático abaixo da mediana é o grupo referência.

²P-value para interação entre SNP e concentração de AG do plasma. OR (IC95%) e valores de p em negrito representam p<0,05.

8.3.3 SNP do gene da IL-10

Indivíduos homozigotos dominantes do SNP *e/i boundary* C>T (rs1554286) apresentaram redução da chance de pertencer ao grupo inflamado no maior percentil de ácido araquidônico, DPA, DHA e n3 HUFA. Entretanto, esses indivíduos apresentaram maior chance de inflamação quando possuem maior razão plasmática de n6/n3, em comparação aos indivíduos com concentração abaixo da mediana. Apesar de uma interação estatisticamente significativa observada entre o *e/i boundary* C>T (rs1554286) e a atividade da D6D estimada, quando estratificada pelos genótipos, não foi observada nenhuma associação estatisticamente significativa. Indivíduos portadores do alelo variante apresentaram proteção quando estão no maior percentil acima da mediana da atividade estimada da D5D (Tabela 22).

Foi observada uma interação entre o SNP -1082 A>G (rs1800896) e a atividade estimada da D5D, AG C14:0 e C18:0. Uma maior chance de inflamação é observada para indivíduos homozigotos dominante no maior percentil de C14:0 e razão n6/n3. Entretanto, quando estão no maior percentil de C18:0, PUFA, ácido araquidônico, n-3 HUFA e atividade da D5D estimada apresentaram proteção ao grupo inflamado. Nenhuma associação estatisticamente significativa foi observada entre indivíduos que possuem alelo variante e AG plasmáticos.

Tabela 26 - OR (IC95%) para grupo inflamado no percentil maior (acima da mediana) de AG do plasma, estratificado por genótipos dos SNP do gene da IL-10.

OR para perfil dos AG do plasma (%)	IL-10 e/i <i>boundary</i> C>T (rs1554286)			IL-10 -1082 A>G (rs1800896)		
	CC (n=123)	CT+TT (n=138)	p value ²	AA (n=110)	AG+GG (n=146)	p value ²
SFA	1,01 (0,47-2,2)	1,09 (0,51-2,3)	0,87	1,05 (0,47-2,35)	1,02 (0,48-2,15)	0,872
C14:0	0,72 (0,32-1,65)	1,56 (0,73-3,34)	0,15	2,36 (1,03-5,43)	0,57 (0,26-1,27)	0,025
C16:0	1,14 (0,52-2,5)	1,56 (0,73-3,37)	0,48	1,82 (0,79-4,17)	0,85 (0,4-1,81)	0,155
C18:0	0,72 (0,33-1,57)	0,63 (0,29-1,37)	0,92	0,27 (0,11-0,64)	1,53 (0,71-3,3)	0,004
MUFA	1,06 (0,47-2,41)	1,01 (0,45-2,27)	0,82	1,62 (0,7-3,78)	0,85 (0,38-1,9)	0,333
C16:1	0,96 (0,43-2,16)	1,06 (0,48-2,34)	0,71	1,29 (0,55-3,03)	0,83 (0,38-1,8)	0,431
C18:1	1,09 (0,48-2,49)	0,79 (0,35-1,8)	0,79	1,60 (0,69-3,74)	0,73 (0,33-1,64)	0,267
PUFA	0,72 (0,32-1,61)	0,84 (0,38-1,87)	1,00	0,39 (0,17-0,91)	1,15 (0,52-2,55)	0,059
n-6	1,21 (0,52-2,78)	0,81 (0,37-1,76)	0,41	0,50 (0,22-1,16)	1,56 (0,69-3,54)	0,072
C18:2	1,40 (0,6-3,24)	1,38 (0,63-3,04)	0,77	1,02 (0,45-2,31)	1,74 (0,75-4,04)	0,491
C20:3	0,89 (0,4-1,96)	1,42 (0,66-3,06)	0,36	1,75 (0,77-4,01)	0,78 (0,36-1,7)	0,08
C20:4	0,42 (0,19-0,95)	0,69 (0,32-1,48)	0,37	0,31 (0,13-0,72)	0,84 (0,4-1,77)	0,067
n-3	0,53 (0,23-1,2)	0,60 (0,27-1,3)	0,99	0,46 (0,19-1,09)	0,73 (0,34-1,57)	0,229
C18:3	1,38 (0,64-2,97)	1,27 (0,59-2,73)	0,90	1,34 (0,58-3,09)	1,35 (0,64-2,83)	0,877
C20:5	0,59 (0,26-1,33)	0,81 (0,36-1,79)	0,75	0,58 (0,25-1,35)	0,75 (0,34-1,64)	0,243
C22:5	0,35 (0,14-0,86)	0,90 (0,42-1,92)	0,19	0,55 (0,23-1,36)	0,82 (0,38-1,75)	0,279
C22:6	0,38 (0,17-0,87)	0,85 (0,39-1,87)	0,23	0,48 (0,2-1,17)	0,66 (0,31-1,41)	0,533
n3 HUFA	0,36 (0,15-0,86)	0,50 (0,23-1,08)	0,82	0,33 (0,13-0,82)	0,66 (0,31-1,42)	0,176
n-6/n-3	4,16 (1,56-11,1)	1,23 (0,57-2,65)	0,11	3,03 (1,12-8,17)	1,25 (0,58-2,73)	0,121

Tabela 27 - OR (IC95%) para grupo inflamado no percentil maior (acima da mediana) de AG do plasma, estratificado por genótipos dos SNP do gene da IL-10 (continuação).

C16:1/16:0	1,08 (0,45-2,57)	0,74 (0,34-1,60)	0,13	2,00 (0,84-4,76)	0,56 (0,23-1,33)	0,12
C18:1/18:0	0,93 (0,39-2,21)	1,25 (0,57-2,70)	0,16	0,50 (0,21-1,19)	1,70 (0,71-4,07)	0,15
C20:3/18:2n-6	0,62 (0,27-1,42)	1,97 (0,92-4,24)	0,038	2,05 (0,91-4,65)	0,88 (0,4-1,92)	0,095
C20:4/20:3	0,59 (0,27-1,3)	0,45 (0,21-0,97)	0,578	0,25 (0,1-0,59)	0,88 (0,42-1,86)	0,018
SFA/n-6 PUFA	1,18 (0,52-2,7)	0,97 (0,44-2,15)	1,00	1,96 (0,83-4,61)	0,69 (0,31-1,54)	0,105
SFA/n-3 PUFA	2,09 (0,91-4,8)	1,16 (0,54-2,51)	0,47	1,44 (0,62-3,36)	1,48 (0,7-3,14)	0,697
SFA/PUFA	1,19 (0,53-2,68)	1,15 (0,53-2,52)	0,86	2,16 (0,93-5,02)	0,76 (0,35-1,67)	0,097
AA/EPA	1,80 (0,73-4,39)	0,93 (0,43-2,01)	0,32	1,24 (0,51-3,03)	1,00 (0,46-2,16)	0,424

SFA, ácido graxo saturado; MUFA, ácido graxo monoinsaturado; PUFA, ácidos graxos poliinsaturado; n6, ômega-6; n3, ômega-3; HUFA, ácidos graxos de cadeia muito longa; AA, ácido araquidônico.

¹Valores são OR(95% CI), ajustado por IMC, idade, sexo e hábito de fumar. Indivíduos com AG plasmático abaixo da mediana é o grupo referência.

²P-value para interação entre SNP e concentração de AG do plasma. OR (IC95%) e valores de p em negrito representam p<0,05.

9 DISCUSSÃO

Entre as associações dos SNP analisados e biomarcadores inflamatórios, os indivíduos carreadores do alelo variante do SNP -857 C>T (rs1799724) apresentaram menor concentração plasmática de IL-12 em relação aos homozigotos dominantes. Contudo, um resultado mais expressivo foi apresentado pelos indivíduos portadores do alelo variante do SNP -238 G>A (rs361525), os quais apresentaram associações positivas com TNF- α , IL-6 e IL-10. No estudo de SKOOG et al. (1999) com indivíduos suecos com idade entre 35 e 50 anos, os carreadores do alelo variante do SNP -857 C>T, apresentaram redução da concentração sérica de TNF- α . Vários estudos com o SNP -238 G>A não foram associados com obesidade e RI (SHEU et al., 2001; WALSTON et al., 1999; CORBALÁN et al., 2004), apesar do presente estudo, o SNP -238 G>A ter apresentado associação com várias citocinas, os quais apresentam-se alteradas nas doenças metabólicas como obesidade e RI. Em relação ao SNP +3872 A>G (rs1205) do gene da PCR, em comparação com o homozigoto dominante, indivíduos portadores do alelo variante apresentaram redução da concentração plasmática de PCR. Esse resultado está de acordo com outros estudos (KOLZ et al., 2007; EIRIKSDOTTIR et al., 2009; LANGE et al., 2006), o que indica que a presença deste SNP pode acarretar em um menor risco cardiovascular (LANGE et al., 2006).

Os indivíduos portadores do alelo variante do SNP *e/i boundary* C>T (rs1554286) do gene da IL-10 apresentaram maior concentração plasmática de TNF- α e IL-1 β e menor concentração de MCP-1, enquanto indivíduos carreadores do alelo variante do SNP -1082 A>G (rs1800896) do mesmo gene apresentaram menor concentração plasmática de sVCAM-1 em relação aos seus respectivos homozigotos dominantes. Cabe destacar que há escassez de resultados na literatura que associam o SNP *e/i boundary* C>T (rs1554286) e doenças metabólicas. Na população chinesa, homens e mulheres participantes da coorte *People's Republic of China/United States of America (PRC-USA)* carreadores do genótipo TT foram associados com maior risco para ocorrência de acidente vascular cerebral isquêmico (XIE et al., 2013). Em relação ao SNP -1082 A>G, resultados a partir de metanálise mostrou que

indivíduos que possuem alelo variante possuem maior risco para desenvolver DM2 (YIN et al, 2013; LI et al., 2013; ZHANG et al., 2013) e doenças coronarianas (WANG et al, 2011).

Considerando que as DCNT são associadas com um padrão alterado de biomarcadores inflamatórios (HOTAMISLIGIL, 2006), foi realizada a análise multivariada de *cluster* com o objetivo de agrupar os indivíduos de acordo com suas similaridades e diferenças em relação a 11 biomarcadores inflamatórios. Desse modo, o grupo designado inflamado apresentou concentrações plasmáticas de PCR, TNF- α , IL-8, IL-6, IL-1 β , IL-12, IL-10, MCP-1 e sICAM-1 significativamente superiores em relação às aquelas observadas no grupo não inflamado. Além disso, indivíduos no grupo inflamado apresentaram idade, circunferência da cintura, pressão arterial sistólica e diastólica e concentração plasmática de TG significativamente maiores em comparação ao grupo “não inflamado”. Embora os valores absolutos não atinjam os critérios para o diagnóstico de SM, o grupo inflamado apresenta um perfil que se assemelha à SM em relação ao grupo não inflamado, com maior obesidade abdominal, pressão arterial e TG, os quais estão intimamente associados com o desenvolvimento da DCV e DM2 (ALBERTI et al., 2009). Além disso, outros fatores de risco também foram observados no grupo inflamado. A proteína de fase aguda, PCR, cuja produção nos hepatócitos pode estar aumentada pela presença de IL- β , IL-6 e TNF- α na circulação sistêmica (SCHWEDLER et al., 2006), é um fator de risco independente para as DCV quando a concentração plasmática de PCR está acima de 3mg/L (PEARSON et al., 2003). Desse modo, o grupo inflamado apresenta um risco aumentado para as DCV uma vez que o valor mediano está acima de 3mg/L quando comparado ao grupo não inflamado que apresentou valor mediano entre 1 e 3 mg/L. Os indivíduos do grupo inflamado também apresentaram concentrações mais elevadas de sICAM-1 e MCP-1 em comparação ao grupo não inflamado. A sICAM-1 e MCP-1 estão intimamente envolvidas no desenvolvimento da aterosclerose.

O aumento de partículas ricas em colesterol como a lipoproteína de muita baixa densidade (VLDL) e LDL circulantes, leva à infiltração das lipoproteínas para a matriz extracelular da camada íntima, tornando-as propensas às ações de oxidação enzimáticas ou não-enzimáticas. Em resposta à oxLDL na camada íntima, células endoteliais são ativadas e expressam moléculas de adesão na superfície dos vasos, como a sICAM-1 e a sVCAM-1.

Células do sistema imune como monócitos e linfócitos T se ligam às moléculas de adesão, migram para a camada íntima em resposta à expressão de moléculas quimiotáticas, como a MCP-1, e, no caso dos monócitos, se diferenciam em macrófagos. A captação da oxLDL pelos receptores do tipo *scavenger* dos macrófagos leva a formação das células espumosas, e juntamente com os linfócitos Th1 estabelecem uma inflamação crônica na parede vascular. À essa inflamação, outras células imunes migram para o local, aumentando o processo inflamatório com liberação de citocinas inflamatórias, de quimiocinas, eicosanoides e fatores de crescimento, contribuindo para a formação da placa de ateroma. Em resposta aos fatores de crescimento, células musculares lisas migram da camada média para a íntima e proliferam, liberando proteínas extracelulares e formando uma placa fibrosa, podendo ocorrer rupturas e formação de trombos, aumentando o risco para isquemias em locais como cérebro e miocárdio (HASSON, ROBERTSON, SÖDERBERG-NAUCLÉR, 2006). Nesse contexto, o aumento da concentração dos biomarcadores sICAM-1 e MCP-1 no grupo inflamado poderia indicar um risco maior para a aterosclerose em comparação ao grupo não inflamado.

Em relação ao perfil de AG do plasma, indivíduos no grupo inflamado apresentaram maior concentração de ácido palmítico, razões SFA/n-6 e SFA/PUFA e atividade estimada da enzima SCD-18 quando comparados aos indivíduos no grupo não inflamado e menores concentrações plasmáticas de PUFA, n-6 PUFA e ácido araquidônico e redução da atividade estimada da enzima D5D. Esses resultados estão de acordo com outros estudos que mostraram associações entre ácidos graxos do plasma e as características apresentadas no grupo inflamado. Maiores concentrações de ácido palmítico plasmático (MAYNERIS-PERXACHS et al., 2014; POUDEL-TANDUKAR et al., 2009), aumento da atividade enzimática da D6D (HODSON e FIELDING, 2008; VINKNES et al., 2013; KUROTANI et al., 2012) e diminuição da atividade estimada da D5D (MAYNERIS-PERXACHS et al., 2014; KUROTANI et al., 2012) estão associados com obesidade, DM2, RI e SM. Concentrações aumentadas de SFA, como o palmítico, podem ativar o TLR4, inibindo a via da sinalização da insulina e resultando em RI. Além disso, o aumento da expressão de citocinas pro-inflamatórias resultantes da ativação do TLR4 podem ativar as vias JNK/AP-1 e IKK β /NF κ B, amplificando a expressão das citocinas e realimentando as vias inflamatórias (TANTI et al.,

2013). Os mecanismos pelos quais as enzimas D6D e D5D estão associadas à RI ainda não são bem conhecidos. A alteração da composição de ácidos graxos da membrana celular poderia mudar as funções celulares, como afinidade ao receptor de insulina, translocação de proteínas transportadoras de glicose e sinalização intracelular, mediando a associação entre as dessaturases e o risco para o DM2 (KRÖGER e SCHULZE, 2012). Considerando que n-6 PUFA contribui com quase 90% do total de PUFA plasmático (dados não mostrados), a menor concentração de n-6 PUFA no grupo inflamado pode resultar em redução da concentração de PUFA total e aumento das razões SFA/n-6 PUFA e SFA/PUFA no grupo inflamado. A menor concentração de ácido araquidônico poderia ser explicada pela baixa atividade enzimática da D5D, uma vez que essa enzima realiza a conversão do DGLA em ácido araquidônico.

Não foi observada nenhuma associação entre os SNP presentes nos genes da PCR, IL-10 e TNF- α nos dois grupos. Todavia, considerando que as alterações dos biomarcadores inflamatórios podem ocorrer pela presença de polimorfismos e pelo perfil plasmático de ácidos graxos, foram verificadas interações entre os SNP localizados nos genes do TNF- α , PCR e IL-10 e os ácidos graxos presentes no plasma.

Apesar de nenhum SNP do gene do TNF- α ter apresentado interação estatisticamente significativa com o perfil de AG do plasma, nas análises estratificadas pelos genótipos, os ácidos graxos PUFA de cadeia longa e a atividade estimada da D5D apresentaram associação inversa com o grupo inflamado em ambos os genótipos GG e GA+AA do SNP -238 G>A (rs361425) e genótipos CC e CT+TT do SNP -857 C>T (rs1799724), além dos genótipos dominantes do -308 G>A (rs1800629) e -1031 T>C (rs1799964). Para os indivíduos portadores do alelo recessivo dos SNP -857 C>T (rs1799724), -1031 T>C (rs1799964) e genótipo dominante do -308 G>A (rs1800629), há uma chance aumentada para inflamação nos percentis acima da mediana com as razões n-6/n-3, SFA/n-3 PUFA, linolênico e SCD-18. Em termos gerais, os genótipos dos SNP do TNF- α parecem se beneficiar com maiores concentrações plasmáticas de AG n-3 e n-6, especialmente os AG de cadeia mais longas (HUFA, DPA, DHA e ácido araquidônico). Nesse sentido, o efeito dos PUFA parece ser independente do genótipo relacionado aos SNP estudados, uma vez que não houve interações

estatisticamente significantes e ambos os genótipos apresentaram redução da chance de ter biomarcadores elevados. Há escassez de estudos que avaliaram a associação do SNP do TNF- α e alimentação ou biomarcadores de ingestão. Embora no presente estudo não foi observada interação entre SNP presentes no gene do TNF- α com PUFA, FONTAINE-BISSON et al. (2007) verificaram que indivíduos -308GG apresentavam associação positiva entre consumo de PUFA (%E) e HDL-c, e indivíduos que possuíam alelo A apresentavam associação inversa. Indivíduos -238GG apresentaram relação direta entre consumo de PUFA e HDL-c, enquanto os que possuíam o alelo A apresentaram relação inversa.

A partir do ácido araquidônico, eicosanoides de ação pró-inflamatória de série par são sintetizados, como LT-4 e TX-2 (CALDER, 2005), mas também as PG E2, que possui ação anti e pró-inflamatória (CALDER, 2009). Além disso, o ácido araquidônico é precursor de lipoxinas, moléculas envolvidas na resolução da inflamação (SCHWAB e SERHAN, 2006). Por sua vez, os AG n-3 de cadeia longa originam eicosanoides com ação biologicamente menos potentes que aqueles originados pelo ácido araquidônico, além de originarem resolvinas, maresinas e protectinas, que possuem ações antiinflamatória e resolutive da inflamação. Ademais, EPA e DHA ativam o PPAR- γ e o GPR120, um receptor de membrana acoplado à proteína G, inibindo a via do NF- κ B e diminuindo a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias (CALDER, 2015). Com base no exposto, os SNP do gene do TNF- α , assim como encontrado em outros SNP do presente estudo, parecem se beneficiar com os mecanismos benéficos apresentados dos AG PUFA.

Em relação aos SNP analisados no gene da PCR, foi verificada interação entre ácido palmitoleico e os SNP +1919 A>T (rs1417938) e +3872 A>G (rs1205). Interações significativas também foram observadas entre o SNP +1919 A>T (rs1417938) e as razões SFA/n-6 PUFA e SFA/PUFA. Apesar das interações terem sido significativas, ao estratificar a análise pelos genótipos não foram observadas associações significativas entre ácido palmitoleico e +3872 A>G (rs1205) e entre SFA/n-6 PUFA e +1919 A>T (rs1417938). Poucos estudos avaliaram interações entre os SNP presentes no gene da PCR e ácidos graxos sobre a inflamação. NIENABER-ROUSSEAU et al. (2014) investigaram, em um estudo transversal, a interação entre 12 SNP no gene da PCR e dieta sobre a concentração plasmática

de PCR em indivíduos sul africanos negros, participantes do estudo *South African arm of the Prospective Urban and Rural Epidemiology (PURE)* com idade entre 35 e 70 anos. Foram encontradas interações estatisticamente significantes entre ingestão de MUFA e SFA e o SNP rs2808630, no qual indivíduos homozigotos recessivos apresentaram associação direta entre MUFA, SFA e a concentração plasmática de PCR, enquanto em homozigotos dominantes e heterozigotos essa associação não foi significativa. Apesar de não ter sido encontrada no presente estudo interação com MUFA total, interação significativa foi encontrada entre AG palmitoleico e o rs1417938, com chance aumentada para o grupo inflamado nos indivíduos com genótipo dominante.

Estudos em animais mostram que o AG palmitoleico parece ter um efeito protetor, como demonstrado no estudo de CAO et al. (2008), em que o AG palmitoleico liberado pelo tecido adiposo promoveu melhora na ação da insulina no músculo esquelético e redução da lipogênese no fígado, além de poder reduzir a expressão de genes que codificam proteínas com ação pró-inflamatória (YANG, MIYAHARA, HATANAKA, 2011). Todavia, esses resultados não são suportados em estudos observacionais, uma vez que o AG palmitoleico foi associado com concentrações plasmáticas de biomarcadores inflamatórios (TAKKUNEN et al., 2014; PETERSSON et al., 2009; PERREAULT et al., 2014), aumento do risco para insuficiência cardíaca e associação inversa com a adiponectina (DJOUSSE et al., 2012; ZONG et al., 2012).

O genótipo AA do SNP +1919 A>T (rs1417938) do gene da PCR apresentou chance aumentada para inflamação no percentil acima da mediana para SFA/PUFA, enquanto que indivíduos com alelo T apresentaram menor chance, apesar deste não apresentar significância estatística. A diminuição do consumo de SFA é recomendada para a diminuição do risco de doenças cardiovasculares, e a substituição por ácidos graxos insaturados parece ter efeito benéfico (MICHA e MOZAFFARIAN, 2010). MOZAFFARIAN e WALLACE (2010), em uma meta-análise de ensaios clínicos que avaliaram a substituição de SFA por PUFA, principalmente n-6, mostraram diminuição significativa dos eventos das doenças coronarianas. Com base nesses resultados, indivíduos AA parecem ter um maior prejuízo

metabólico quando há uma proporção maior de SFA e menores proporções de PUFA no plasma, além de maiores quantidades de palmitoleico.

Com relação ao gene da IL-10, foi observada interação entre o SNP -1082 A>G (rs1800896) e os ácidos graxos esteárico e mirístico e a atividade estimada da D5D. Indivíduos AA do SNP -1082 A>G (rs1800896) no maior percentil de AG mirístico apresentaram maior chance de estarem inflamados, e, interessantemente, o mesmo genótipo apresentou menor chance de pertencer ao grupo inflamado no maior percentil acima da mediana de esteárico. Apesar de não significante, os carreadores do alelo G apresentaram efeitos opostos. Os AG esteárico e mirístico são saturados e podem ser obtidos por meio da alimentação, ou serem oriundos da lipogênese *de novo* (HODSON e FIELDING, 2013). Cabe destacar que o AG esteárico tem sido utilizado pela indústria como substituto do AG trans (VALENZUELA et al., 2011) e o seu consumo foi estimado em torno de 3% do valor calórico total ingerido na população americana (HUNTER et al., 2009). O consumo de SFA total possui uma associação positiva com doenças cardiovasculares, entretanto, não foram observadas associações do AG esteárico com o metabolismo lipídico, possuindo um papel neutro (HUNTER et al., 2009; VALENZUELA et al., 2011), ou quando comparado com ácidos graxos láurico, mirístico e palmítico, o AG esteárico possui uma associação negativa com a concentração plasmática de LDL-c (HUNTER et al., 2009). Em relação aos biomarcadores inflamatórios, o AG esteárico plasmático não foi associado com a RI e a SM (KUROTANI et al., 2012; MA et al., 2014), diferentemente do AG mirístico, o qual foi associado com a SM e DM2 (MAYNERIS-PERXACHS et al., 2014; PERREAULT et al., 2014; FOROUHI et al., 2014; PERXACHS et al., 2014; MA et al., 2015; MU et al., 2014). Apesar do AG esteárico e mirístico serem do grupo dos SFA, para o SNP -1082 A>G (rs1800896), o tipo do SFA parece ter impacto diferente. Considerando o genótipo AA do SNP -1082 A>G (rs1800896), o AG esteárico apresentou-se benéfico à inflamação, o que evidencia um resultado relevante, uma vez que na dieta ocidental há significativo consumo desse AG (ROGER et al., 2011). Além disso, maior atividade estimada da enzima D5D apresentou redução da chance de estar inflamado, o que está de acordo com outros resultados,

no qual apresentaram associação inversa entre atividade estimada da D5D e SM (YU et al., 2012; MAYNERIS-PERXACHS et al., 2014).

Os diferentes AG apresentaram efeitos condizentes com os apresentados na literatura ou efeitos opostos dependendo do genótipo dos SNP analisados, abrindo horizontes para o estudo de interação entre AG e SNP no âmbito da nutrigenética. Apesar da correlação entre os AG plasmáticos e seus respectivos AG provindos da dieta terem sido fracos na população estudada (dados não publicados), a perspectiva seja de que esses efeitos sejam em parte resultantes do padrão de dieta dos indivíduos. Considerando os AG plasmáticos como biomarcadores de ingestão da dieta, verifica-se que diferentes estudos epidemiológicos analisaram os AG totais presentes no plasma, um biomarcador de ingestão de curto prazo. Na revisão de HODSON et al. (2008), as correlações entre os AG do plasma total com a alimentação tendem a ser maiores com PUFA total ($r=0,20-0,23$), sendo maiores para as frações EPA ($0,21-0,69$), DHA ($r=0,25-0,59$), ALA ($r=0,23-0,39$) e LA ($r=0,16-0,41$) e menores para MUFA total ($r=0,04-0,31$) e SFA total ($r=0,11-0,23$), apesar das frações de AG saturados presentes em alimentos lácteos terem correlações maiores, como AG mirístico, (C14:0, $r=0,18-0,20$) e AG pentadecanoico (C15:0, $r=0,26$). Essas correlações podem variar e serem mais satisfatórias dependendo da fração lipídica endógena escolhida (HODSON et al., 2008). Cabe destacar também que as variações nas correlações decorrem das limitações inerentes ao uso de biomarcadores endógenos.

Os PUFA (α -linolênico e linoleico) e SFA de cadeias ímpares (C15:0 e C17:0) são considerados bons biomarcadores de ingestão, uma vez que sua concentração é oriunda de fontes exógenas como a alimentação. Outros AG saturados como mirístico, palmítico e esteárico, além da ingestão exógena, são também produzidos endogenamente pela lipogênese *de novo*, sendo esta estimulada pela alta ingestão de carboidratos e de álcool. Portanto, os AG mirístico, palmítico e esteárico refletem em parte a ingestão dietética (FOROUHI et al. 2014). No caso do SNP -1082 A>G (rs1800896) do gene da IL-10, interações foram encontradas com mirístico e esteárico, ambos saturados e com efeitos opostos. Recomendações dietéticas específicas para aumento do esteárico em detrimento do mirístico para indivíduos com

genótipo AA se torna complexa, uma vez que alimentos fonte de saturados possuem ambos AG.

Outros ácidos graxos que são sintetizados de forma endógena são os AG oleico e palmitoleico, os quais sofrem dessaturações a partir de SFA. A enzima que catalisa essa reação é a estearoil-CoA dessaturase - SCD (uma delta-9-dessaturase), a qual converte o ácido graxo esteárico e palmítico em oleico e palmitoleico, respectivamente. Apesar do AG oleico ser encontrado abundantemente em dietas como a dieta do Mediterrâneo, o palmitoleico é raramente consumido e estimado na dieta ocidental, e, portanto, reflete principalmente a biossíntese endógena (HODSON e FIELDING, 2013). Nesse sentido, a interação observada entre o palmitoleico e SNP +1919 A>T do gene da PCR, decorre de conversões endógenas. Tais conversões poderiam estar dependentes de polimorfismos no gene da enzima e outras variáveis que podem modular a atividade da mesma, ou seja, o aumento da conversão possibilitaria um maior risco para inflamação para os indivíduos AA do SNP +1919 A>T.

Dentre os PUFA, os ácidos graxos α -linolênico (C18:3) e linoleico (C18:2) são essenciais, uma vez que não possuem síntese endógena. A partir da ingestão desses ácidos graxos, pode ocorrer a sua conversão em ácidos graxos com cadeias de carbonos maiores (catalisada pelas enzimas elongases), e com maior número de duplas ligações (catalisada pelas enzimas delta-5-dessaturase (D5D) e D6D) (CALDER, 2014). Apesar de nenhum dos SNP terem apresentado interações significantes com os PUFA, em geral, independentemente do SNP, os AG PUFA apresentaram benefícios em relação à inflamação. Esse fato corrobora para o incentivo no consumo de alimentos ricos AG PUFA, principalmente, os de origem marinha com alta concentração de AG PUFA n-3 de cadeia longa para proteção em relação a um perfil inflamatório associado à doenças crônicas. O presente estudo possui algumas limitações. Por ser um estudo transversal, as sequencias temporais não podem ser estabelecidas. Mais estudos são necessários para confirmar os resultados encontrados no presente projeto. Também são necessários mais estudos que verifiquem os mecanismos envolvidos na interação entre AG do plasma e SNP. Ademais, o presente estudo traz resultados particularmente importantes para a população brasileira, em razão da escassez de

informações sobre a frequência de diferentes SNP e sua interação com a alimentação e inflamação.

10 CONCLUSÃO

Os SNP -857 C>T (rs1799724) e -238 G>A (rs361525) do gene do TNF- α , +3872 A>G (rs1205) do gene da PCR, e e/i *boundary* C>T (rs1554286) e -1082 A>G (rs1800896) do gene da IL-10 foram associados com concentrações plasmáticas de biomarcadores inflamatórios, entretanto sem associação com os grupos inflamados.

Os indivíduos com perfil inflamatório elevado apresentaram alterações metabólicas, como circunferência da cintura, pressão arterial, TG, além de biomarcadores inflamatórios também elevados, que são consistentes com as doenças crônicas. Além disso, o grupo inflamado apresentou concentrações maiores de palmítico, SFA/n-6 PUFA, SFA/PUFA, SCD-18 e menores de PUFA, n-6 PUFA, ácido araquidônico e D5D.

Todos os SNP do gene da PCR e IL-10 interagem com AG do plasma, modulando a chance para ter o padrão inflamatório. O SNP +1919 A>T apresentou interação com o AG palmitoleico, SFA/PUFA e os SNP -1082 A>G com esteárico, D5D e mirístico. De modo geral, concentrações aumentadas de AG n-3 de alta insaturação plasmáticas, atividade estimada da D5D aumentada no plasma apresentaram efeito benéfico independente dos SNP dos genes da PCR, TNF- α e IL-10, por outro lado, n-6 e SFA aumentados em detrimento de n-3 e PUFA plasmáticos, respectivamente, foram associados com maior chance de apresentarem um perfil inflamado

Os resultados do presente estudo contribuem para o entendimento da complexidade das interações gene-nutriente, com grande relevância para a população brasileira, no âmbito da inflamação crônica e de baixa intensidade. Portanto, no contexto da nutrigenética, essas interações podem auxiliar no planejamento de dietas personalizadas e redução do risco de doenças associadas à inflamação crônica.

REFERÊNCIAS

ALBERTI K. et al. Harmonizing the Metabolic Syndrome A Joint Interim Statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. **Circulation**, v.120, n.16, p.1640-5, 2009.

ALCOCK, A. et al. Nutrient Signaling: Evolutionary Origins of the Immune-Modulating Effects of Dietary Fat. **The Quarterly Review of Biology**, v. 87, n. 3, p.187-223, 2012.

BAER, D.J. et al. Dietary fatty acids affect plasma markers of inflammation in healthy men fed controlled diets: a randomized crossover study. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.79, p.969 –73, 2004.

BAYLIN, A; CAMPOS, H. The use of fatty acid biomarkers to reflect dietary intake. **Current Opinion in Lipidology**, v.17, p.22–27, 2006.

BEATON, GH. Approaches to analysis of dietary data: relationship between planned analyses and choice of methodology. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.59, p.253S-261S, 1994.

BEZERRA, I.N. et al. Consumo de alimentos fora do domicílio no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v.47, Supl.1, p.200S-11S, 2013.

BLÜHER, M. Clinical Revelance of Adipokines. **Diabetes Metabolism Journal**, v. 36, p.317-327, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portal da Saúde. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/17445-obesidade-estabiliza-no-brasil-mas-excesso-de-peso-aumenta>>. Acesso em: 10 out 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portal da Saúde. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/12926/162/mais-da-metade-da-populacao-brasileira-tem-excesso-de-peso.html>>. Acesso em: 10 out 2013.

CALDER, P.C. et al. Dietary factors and low-grade inflammation in relation to overweight and obesity. **British Journal of Nutrition**, v.106, supl.3, p. s1-s78, 2011.

CALDER, P.C. Fatty acids and inflammation: The cutting edge between food and pharma. **European Journal of Pharmacology**, v.668, supl.1, p.S50–S58, 2011.

CALDER, P.C. Fatty acids: Long-chain fatty acids and inflammation. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.71, p.284–289, 2012.

CALDER, P.C. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology?. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v.75, n.3, p.645–662, 2013.

CALDER, P.C. Polyunsaturated fatty acids and inflammation. **Biochemical Society Transactions**, v.33, Pt 2, p.423-7, 2005.

CALDER, PC. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1851, n.4, p.469-484, 2015.

CALDER, PC. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: New twists in an old tale. **Biochimie**, v. 91, n.6, p.791-5, 2009.

CAO, H. et al. Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism. **Cell**, v.134, n.6, p.933-44, 2008.

CAWTHORN, W.P.; SETHI, J.K. TNF- α and adipocyte biology. **FEBS Letters**, v.582, p.117–131, 2008.

CORBALÁN, M.S. et al. Influence of two polymorphisms of the tumoral necrosis factor-alpha gene on the obesity phenotype. **Diabetes Nutrition and Metabolism**, v.17, n.1, p.17-22, 2004.

DANIK, J.S.; RIDKER, P.M. Genetic Determinants of C-Reactive Protein. **Current Atherosclerosis Reports**, v.9, p.195–203, 2007.

DIMOPOULOS, N. et al. Differential effects of palmitate and palmitoleate on insulin action and glucose utilization in rat L6 skeletal muscle cells. **Biochemical Journal**. v.399, n.3, p.473-81, 2006.

DIXON, J.B. The effect of obesity on health outcomes. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.316, p.104-108, 2010.

DJOUSSÉ, L. et al. Plasma phospholipid concentration of cis-palmitoleic acid and risk of heart failure. **Circulation Heart Failure**, v.5, n.6, p.703-9, 2012.

EDWARDS-SMITH, C.J. et al. Interleukin-10 promoter polymorphism predicts initial response of chronic hepatitis C to interferon alfa. **Hepatology**, v.30, p. 526-530, 1999.

EIRIKSDOTTIR, G. et al. The interaction of adiposity with the CRP gene affects CRP levels: Age, Gene/Environment Susceptibility-Reykjavik Study. **International Journal of Obesity**, v.33, p.267–272, 2009.

ELAHI, M. M. et al. Tumor necrosis factor alpha–308 gene locus promoter polymorphism: an analysis of association with health and disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1792, p.163–172, 2009.

El-Aziz, T.A.A.; Mohamed, R.H. Human C-reactive protein gene polymorphism and metabolic syndrome are associated with premature coronary artery disease. **Gene**, v.532, p.216–221, 2013.

FENECH, M. et al. Nutrigenetics and Nutrigenomics: Viewpoints on the Current Status and Applications in Nutrition Research and Practice. **Journal of Nutrigenet Nutrigenomics**, v.4, p.69–89, 2011.

FERNÁNDEZ-REAL, J.M. et al. Insulin Resistance, Inflammation, and Serum Fatty Acid Composition. **Diabetes Care**, v.26, p.1362–1368, 2003.

FESSLER, M.B.; RUDEL, L.L.; BROWN, M. Toll-like receptor signaling links dietary fatty acids to the metabolic syndrome. **Current Opinion in Lipidology**, v.20, n.5, p.379–385, 2009.

FISBERG, RM; COLUCCI, ACA; MORIMOTO, JM; MARCHIONI, DML. Questionário de frequência alimentar para adultos com base em estudo populacional. **Revista de Saúde Pública**, v.42, p. 550-554, 2008.

FONTAINE-BISSON, B. et al. Genetic polymorphisms of tumor necrosis factor- α modify the association between dietary polyunsaturated fatty acids and fasting HDL-cholesterol and apo A-I concentrations. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.86, n.3, p.768-74, 2007.

FOROUHI, N.G. et al. Differences in the prospective association between individual plasma Phospholipid saturated fatty acid and incident type 2 diabetes: the EPI-InterAct case cohort study. **Lancet Diabetes Endocrinology**, v.2, p.810-18, 2014.

GABOON, N.E.A. Nutritional genomics and personalized diet. **The Egyptian Journal of Medical Human Genetics**, v.12, p.1–7, 2011.

GALLAND, L. Diet and Inflammation. **Nutrition in Clinical Practice**, v.25, p.634-640, 2010.

GALLI, C.; CALDER, P.C. Effects of Fat and Fatty Acid Intake on Inflammatory and Immune Responses: A Critical Review. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v.55, p.123–139, 2009.

GOLZARAND, M. Association between modifiable lifestyle factors and inflammatory markers in patients with metabolic syndrome. **Eastern Mediterranean Health Journal**, v.18, n.7, p.735-741, 2012.

GRAY, S.L.; VIDAL-PUIG, A.J. Adipose Tissue Expandability in the Maintenance of Metabolic Homeostasis. **Nutrition Reviews**, v.65, suppl.1, p.s7-s12, 2007.

GREGOR, M.G.; HOTAMISLIGIL, G.S. Inflammatory Mechanisms in Obesity. **Annual Review of Immunology**, v.29, p.415–45, 2011

HAGE, F.G.; SZALAI, A.J. C-Reactive Protein Gene Polymorphisms, C-Reactive Protein Blood Levels, and Cardiovascular Disease Risk. **Journal of the American College of Cardiology**, v.50, n.12, 2007

HAN, C.Y. et al. Differential Effect of Saturated and Unsaturated Free Fatty Acids on the Generation of Monocyte Adhesion and Chemotactic Factors by Adipocytes. **Diabetes**, v.59, p. 386-396, 2010.

HANSSON, G.K.; ROBERTSON, A.K.; SÖDERBERG-NAUCLÉR, C. Inflammation and atherosclerosis. **Annual Review of Pathology Mechanisms of Disease Journal**, v.1, p.297-329, 2006.

HAUBROCK, J. et al. Estimating Usual Food Intake Distributions by Using the Multiple Source Method in the EPIC-Potsdam Calibration Study. **The Journal of Nutrition**, v.141, p.914–920, 2011.

HEISKANEN, M. et al. Polymorphism in the IL10 promoter region and early markers of atherosclerosis: The Cardiovascular Risk in Young Finns Study. **Atherosclerosis**, v.208, p.190–196, 2010.

HODSON, L.; FIELDING, B.A. Stearoyl-CoA desaturase: rogue or innocent bystander?. **Progress in Lipid Research**, v.52, p.15–42, 2013.

HODSON, L.; SKEAFF, C.M; FIELDING, B.A. Fatty acid composition of adipose tissue and blood in humans and its use as a biomarker of dietary intake. **Progress in Lipid Research**, v.48, p.348–380, 2008.

HOFFMAN, S.R. et al. Biological properties and regulation of IL-10 related cytokines and their contribution to autoimmune disease and tissue injury. **Clinical Immunology**, v.143, p.116–127, 2012.

HOTAMISLIGIL, G. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v.444, n.14, p. 860-867, 2006.

HULKKONEN, J. et al. Genetic association between interleukin-10 promoter region polymorphisms and primary Sjogren's syndrome. *Arthritis & Rheumatism*, v. 44, p. 176-179, 2001.

IBRAHIM, M.M. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. **Obesity reviews**, v.11, p.11–18, 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Pesquisa de Orçamentos familiares 2008 2009: análise da disponibilidade domiciliar de alimentos e do estado nutricional no Brasil. Rio de Janeiro, 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Pesquisa de Orçamentos Familiares 2002-2003: análise da disponibilidade domiciliar de alimentos e do estado nutricional no Brasil. Rio de Janeiro, 2004.

JACOBI, D.; STANYA KJ; LEE CH. Adipose tissue signaling by nuclear receptors in metabolic complications of obesity. **Adipocyte**, v.1, p.4–12, 2012.

JENAB, M. et al. Biomarkers in nutritional epidemiology: applications, needs and new horizons. **Human Genetics**, v.125, p.507–525, 2009.

JOVÉ, M. et al. Palmitate induces tumor necrosis factor-alpha expression in C2C12 skeletal muscle cells by a mechanism involving protein kinase C and nuclear factor-kappaB activation. **Endocrinology**, v.147, n.1, p.552-61, 2006.

JUNG, U.J.; CHOI, MS. Obesity and Its Metabolic Complications: The Role of Adipokines and the Relationship between Obesity, Inflammation, Insulin Resistance, Dyslipidemia and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v.15, P.6184-6223, 2014.

KARACA, E. et al. The effect of interleukin-10 gene promoter polymorphisms on early-onset coronary artery disease. **Anadolu Kardiyoloji Dergis**, v.11, p.285-289, 2011.

KATO, T. et al. Palmitate impairs and eicosapentaenoate restores insulin secretion through regulation of SREBP-1c in pancreatic islets. **Diabetes**, v.57, n.9, p.2382-92, 2008.

KELLY, T. et al. Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. **International Journal of Obesity**, v.32, p.1431–1437, 2008.

KING, D. E.; EGAN, B.M.; GEESEY, M.E. Relation of Dietary Fat and Fiber to Elevation of C-Reactive Protein. **The American Journal of Cardiology**, v.92, p.1335–1339, 2003.

KLEIN-PLATAT, C. et al. Plasma fatty acid composition is associated with the metabolic syndrome and low-grade inflammation in overweight adolescents. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.82, p.1178–84, 2005.

KOLZ, M. et al. DNA variants, plasma levels and variability of C-reactive protein in myocardial infarction survivors: results from the AIRGENE study. **European Heart Journal**, v.29, p.1250–1258, 2007.

KOMURCU-BAYRAK, E. et al. Association of C-reactive protein (CRP) gene allelic variants with serum CRP levels and hypertension in Turkish adults. **Atherosclerosis**, v.206, p.474–479, 2009.

KUROTANI, K. et al. High levels of stearic acid, palmitoleic acid, and dihomo- γ -linolenic acid and low levels of linoleic acid in serum cholesterol ester are associated with high insulin resistance. **Nutrition Research**, v.32, n.9, p669-675, 2012.

LANGE, L.A. et al. Association of polymorphisms in the CRP gene with circulating C-reactive protein levels and cardiovascular events. **JAMA**, v.296, n.22, p.2703-11, 2006.

LEAL, V.O.; MAFRA, D. Adipokines in obesity. **Clinica Chimica Acta**, v.419, p.87-94, 2013.

LEE, B.C.; LEE, J. Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1842, n.3, p.446-62, 2014.

LEE, J.Y. ;ZHAO, L.; HWANG, D.H. Modulation of pattern recognition receptor-mediated inflammation and risk of chronic diseases by dietary fatty acids. **Nutrition Reviews**, v.68, n.1, p.38-61, 2010.

LESNÁ, I.K. et al. Effect of Different Types of Dietary Fatty Acids on Subclinical Inflammation in Humans. **Physiological Research**, v. 62, p.145-152, 2013.

LEVY, R.B. et al. Distribuição regional e socioeconômica da disponibilidade domiciliar de alimentos no Brasil em 2008-2009. **Revista de Saúde Pública**, v.46, n.1, p.6-15, 2012.

LEVY-COSTA, R.B. et al. Disponibilidade domiciliar de alimentos no Brasil: distribuição e evolução (1974-2003). **Revista de Saúde Pública**, v.39, n.5, p.530-40, 2005.

LI, J. et al. Association of the interleukin-10 -592A/C, -1082G/A and -819T/C gene polymorphisms with type 2 diabetes: A meta-analysis. **Gene**, v.521, p.211-216, 2013.

LI, Y. Tumor Necrosis Factor-Alpha G308A Gene Polymorphism and Essential Hypertension: A Meta-Analysis Involving 2244 Participants. **Plos One**, v.7, n.4, 2012.

LOW, S.; CHIN, M.C.; DEURENBERG-YAP, M. Review on Epidemic of Obesity. **Annals Academy of Medicine Singapore**, v.38, p.57-65, 2009.

LUMENG, C.N; SALTIEL, A.R. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. **The Journal of Clinical Investigation**, v.121, n.6, 2011.

MA, W. et al. Prospective association of fatty acids in the de novo lipogenesis pathway with risk of type 2 diabetes: the Cardiovascular Health Study. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.101, p.153–63, 2015.

MAEDLER, T. et al. Monounsaturated fatty acids prevent the deleterious effects of palmitate and high glucose on human pancreatic beta-cell turnover and function. **Diabetes**, v.52, n.3, p.726-33, 2003.

MALTA, D.C. Doenças Crônicas Não Transmissíveis, um grande desafio da sociedade contemporânea. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.19, n.1, p.4-5, 2014.

MAURY, E.; BRICHARD, S.M. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.314, p. 1–16, 2010.

MAYNERIS-PERXACHS, J. et al. Plasma fatty acid composition, estimated desaturase activities, and their relation with the metabolic syndrome in a population at high risk of cardiovascular disease. **Clinical Nutrition**, v.33, n.1, p.90-7, 2014.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v.454, n.24, 2008.

MICHA, R; MOZAFFARIAN, D. Saturated fat and cardiometabolic risk factors, coronary heart disease, stroke, and diabetes: a fresh look at the evidence. **Lipids**, v.45, n.10, p.893-905, 2010.

MILLER, SA; DYKES, DD; POLESKY, HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v.16, p. 1215, 1988.

MOSHFEGH, AJ; RHODES, DG; BAER, DJ; MURAYI, T; CLEMENS, JC; RUMPLER, WV. The US Department of Agriculture Automated Multiple-Pass Method reduces bias in the collection of energy intake. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 94, p. 57-64, 2008.

MOZAFFARIAN, D; MICHA, R; WALLACE, S. Effects on Coronary Heart Disease of Increasing Polyunsaturated Fat in Place of Saturated Fat: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. **PLoS Med**, v.7, n.3, e1000252, 2010.

NATHOO, N.; BARNETT, G.H.; GOLUBIC, M. The eicosanoid cascade: possible role in gliomas and meningiomas. **Journal of Clinical Pathology**, v.57, p.6–13, 2004.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids (Macronutrients)**. Washington, DC: The National Academies Press, 2005.

NIENABER-ROUSSEAU, C. et al. Interactions between C-Reactive Protein Genotypes with Markers of Nutritional Status in Relation to Inflammation. **Nutrients**, v.6, n.11, p.5034-50, 2014.

OSBORN, O; OLESFSK, J.M. The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. **Nature Medicine**, v.18, n.3, p.363-374, 2012.

OSPELT, C.; GAY, S. TLRs and chronic inflammation. **The International Journal of Biochemistry e Cell Biology**, v. 42, p.495–505, 2010.

OUYANG, W. et al. Regulation and Functions of the IL-10 Family of Cytokines in Inflammation and Disease. **Annual Review of Immunology**, v.29, p.71–109, 2011.

PEARSON, T.A. et al. Centers for Disease Control and Prevention; American Heart Association. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. **Circulation**, v.107, n.3, p.499-511, 2003.

PERREAULT, M. et al. Plasma levels of 14:0, 16:0, 16:1n-7, and 20:3n-6 are positively associated, but 18:0 and 18:2n-6 are inversely associated with markers of inflammation in young healthy adults. **Lipids**, v.49, n.3, p.255-63, 2014.

PETERSSON, H. et al. Relationships between serum fatty acid composition and multiple markers of inflammation and endothelial function in an elderly population. **Atherosclerosis**, v.203, n.1, p.298-303, 2009.

PIRO, S. et al. Chronic exposure to free fatty acids or high g lucose induces apoptosis in rat pancreatic islets: possible role of oxidative stress. **Metabolism**, v.51, n.10, p.1340-7, 2002.

POPKIN, B.M. et al. Global nutrition transition and the pandemic of obesity in developing countries. **Nutrition Reviews**, v. 70, n.1, p.3–21, 2011.

POUDEL-TANDUKAR, K. et al. Dietary intakes of alpha-linolenic and linoleic acids are inversely associated with serum C-reactive protein levels among Japanese men. **Nutrition Research**, v.29, n.6, p.363-70, 2009.

RAQIB, R.; CRAVIOTO, A. Nutrition, immunology, and genetics: future perspectives. **Nutrition Reviews**, v. 67, suppl. 2, p.227–236, 2009.

RICHARD, C. et al. Effect of the Mediterranean Diet With and Without Weight Loss on Markers of Inflammation in Men With Metabolic Syndrome. **Obesity**, p.1-7, 2012.

ROGER, V.L. et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2011 Update: A Report From the American Heart Association. **Circulation**, v.123, p.e18-e209, 2011.

SANTOS, S. et al. Saturated fatty acids intake in relation to C-reactive protein, adiponectin, and leptin: A population-based study. **Nutrition**, v.29, p.892–897, 2013.

SANTOS, S.; OLIVEIRA, A.; LOPES, C. Systematic review of saturated fatty acids on inflammation and circulating levels of adipokines. **Nutrition Research**, v.33, p.687 – 695, 2013.

SCHENK, S.; SABERI, S; OLEFSKY, J. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. **The Journal of Clinical Investigation**, v.118, n.9, p.2992-3002, 2008.

SCHMITZ; G; ECKER, J. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. **Progress in Lipid Research**, n.47, p.147-155, 2008.

SCHWAB J.M., SERHAN, C.N. Lipoxins and new lipid mediators in the resolution of inflammation. **Current Opinion in Pharmacology**, v.6, n.4, p.414-20, 2006.

SCHWEDLER, S.B. et al. C-reactive protein: a family of proteins to regulate cardiovascular function. **American Journal of Kidney Diseases**, v.47, n.2, p.212-22, 2006.

SHEU, W.H.H. et al. Tumor Necrosis Factor α 2238 and 2308 Polymorphisms Do Not Associate With Insulin Resistance in Hypertensive Subjects. **Metabolism**, v.50, n.12, p.1447-1451, 2001.

SHOELSON, S.E.; HERRERO, L.; NAAZ, A. Obesity, Inflammation, and Insulin Resistance. **Gastroenterology**, v.132, p.2169–2180, 2007.

SIMOPOULOS, A.P. The Importance of the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio in Cardiovascular Disease and Other Chronic Diseases. **Experimental Biology and Medicine**, v.233, p.674-688, 2008.

SIRIWARDHANA, N. et al. Modulation of adipose tissue inflammation by bioactive food compounds. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.24, p.613–623, 2013.

SKOOG, T et al. A common functional polymorphism (C-->A substitution at position -863) in the promoter region of the tumour necrosis factor- α (TNF- α) gene associated with reduced circulating levels of TNF- α . **Human Molecular Genetics**, v.8, n.8, p.1443-9, 1999.

STAIGER, H. et al. Palmitate-induced interleukin-6 expression in human coronary artery endothelial cells. **Diabetes**, v.53, n.12, p.3209-16, 2004.

SUGANAMI, T.; OGAWA, Y. Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. **Journal of Leukocyte Biology**, v.88, p.33-39, 2010.

TAKKUNEN, M.J. et al. Associations of erythrocyte membrane fatty acids with the concentrations of C-reactive protein, interleukin 1 receptor antagonist and adiponectin in 1373 men. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v.91, n.4, p.169-74, 2014.

TUCKER, K.L. et al. Quantifying Diet for Nutrigenomic Studies. **Annual Review of Nutrition**, v.33, p.349–71, 2013.

TURNER, D.M. et al. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. **European Journal of Immunogenetics**, v. 24, p. 1-8, 1997.

URPI-SARDA, M. et al. Virgin olive oil and nuts as key foods of the Mediterranean diet effects on inflammatory biomarkers related to atherosclerosis. **Pharmacological Research**, v.65, p.577– 583, 2012.

VALLVÉ, J. et al. Tumor Necrosis Factor- α –1031 T/C Polymorphism Is Associated with Smaller and More Proatherogenic Low Density Lipoprotein Particles in Patients with Rheumatoid Arthritis. **The Journal of Rheumatology**, v.35, p.1697-1703, 2008.

Van DIJK, S. et al. A saturated fatty acid–rich diet induces an obesity-linked proinflammatory gene expression profile in adipose tissue of subjects at risk of metabolic syndrome. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.90, p.1656–64, 2009.

VINKNES, K.J. et al. Plasma stearoyl-CoA desaturase indices: association with lifestyle, diet, and body composition. **Obesity**, v.21, n.3, p.E294-302, 2013.

WALSTON, J. et al. Tumor Necrosis Factor- α -238 and -308 Polymorphisms Do Not Associate With Traits Related to Obesity and Insulin Resistance. **Diabetes**, v.48, n.10, p. 2096-2098, 1999.

Wang, T.N. et al. The Polymorphisms of C-Reactive Protein Gene Modify the Association Between Central Obesity and Lung Function in Taiwan Asthmatics. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.74, p.482–488, 2011.

WANG, Y. et al. Association between the Interleukin 10 -1082G>A polymorphism and coronary heart disease risk in a Caucasian population: a meta-analysis. **International Journal of Immunogenetics**, v.39, p.144–150, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Noncommunicable diseases country profiles**. Geneva: World Health Organization, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION -WHO. **Global status report on noncommunicable diseases**. Geneva: World Health Organization, 2014.

World Health Organization. **World health statistics 2012**. Geneva: World Health Organization, 2012. 175p.

XIE, G. et al. Relationship of Serum Interleukin-10 and Its Genetic Variations with Ischemic Stroke in a Chinese General Population. **Plos one**, v.8, n.9, p. e74126, 2013.

YANG, Z.H.; MIYAHARA, H; HATANAKA, A. Chronic administration of palmitoleic acid reduces insulin resistance and hepatic lipid accumulation in KK-Ay Mice with genetic type 2 diabetes. **Lipids in Health and Disease**, v.10, p.120, 2011.

YIN, Y. et al. Association between interleukin 10 gene -1082 A/G polymorphism and the risk of type 2 diabetes mellitus: A meta-analysis of 4250 subjects. **Cytokine**, v.62, p.226–231, 2013.

ZHANG, F. et al. A meta-analysis about the association between -1082G/A and -819C/T polymorphisms of IL-10 gene and risk of type 2 diabetes. **Human Immunology**, v.74, p.618–626, 2013.

ZHANG, Y. et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v.372, p425–432, 1994.

ZONG, G. et al. Associations of erythrocyte palmitoleic acid with adipokines, inflammatory markers, and the metabolic syndrome in middleaged and older Chinese. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.96, n.5, p.970-6, 2012.

ANEXO 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU LEGAL RESPONSÁVEL

Dados de Identificação

Nome do Paciente:.....

Documento de Identidade Nº :..... Sexo: () M () F

Data de Nascimento:...../...../.....

Endereço:.....Nº:.....Apto:.....

Bairro:.....Cidade:.....

CEP:.....Telefone:.....

Responsável Legal:.....

Natureza (grau de parentesco, tutor, curador, etc.):

Documento de Identidade Nº :..... Sexo: () M () F

Data de Nascimento:...../...../.....

Endereço:.....Nº:.....Apto:.....

Bairro:.....Cidade:.....

CEP:.....Telefone:.....

II – DADOS SOBRE A PESQUISA

Título do Protocolo de Pesquisa: Homocisteína, polimorfismos do gene MTHFR, fatores dietéticos e risco cardiovascular: estudo de base populacional – ISA-Capital

Pesquisador: XXXX, portador(a) do documento de Identidade Nº XX-X, sexo X, exercendo a função de Professor Doutor do Departamento X da Faculdade X.

Avaliação de Risco da Pesquisa

Nenhum risco () risco mínimo (x) risco moderado () risco alto ()

Duração da Pesquisa: vinte e quatro meses.

III – REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO SUJEITO DA PESQUISA OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

As doenças cardiovasculares estão entre as doenças que mais afetam os brasileiros e se relacionam com a alimentação. Poucos estudos têm sido realizados no Brasil para investigar os fatores da dieta relacionados com o risco de doenças cardiovasculares. Um destes fatores é a homocisteína, um composto encontrado naturalmente no sangue. É reconhecido que indivíduos que apresentam elevada concentração de homocisteína no sangue possuem mais chance de desenvolver doenças cardiovasculares. A concentração de homocisteína é modificada tanto pela dieta quanto por características genéticas. Assim, este estudo tem como objetivo investigar, nos indivíduos que participaram do inquérito em saúde ISA-SP, a relação entre o consumo alimentar e marcadores de risco de doenças cardiovasculares, bem como as características genéticas envolvidas nesta relação da dieta com os marcadores de risco cardiovascular, em especial a homocisteína. Vimos convidá-lo a participar deste estudo.

Sua participação nesta pesquisa inclui os seguintes procedimentos: a) responder um questionário sobre hábitos de vida e uma entrevista sobre o consumo de alimentos; b) permitir fazer as suas medidas de peso, altura e da cintura; c) permitir a coleta de uma amostra de 20 ml de sangue para análise de homocisteína, vitaminas B6, B12, ácido fólico, lípidos e marcadores de inflamação, e para extração do DNA. O DNA coletado será usado unicamente para investigar as variações do gene que produz a enzima que participa da regulação das funções das vitaminas e da homocisteína, chamada enzima MTHFR. Na coleta de sangue pode haver pequeno desconforto. Raramente, a punção venosa pode provocar pequeno hematoma (manchas roxas) no local da punção, que, em geral, desaparecem depois de 3 a 5 dias. Esta coleta será feita por um profissional de enfermagem.

Os resultados obtidos nesta pesquisa poderão colaborar no entendimento dos fatores que influenciam o desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

IV – ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA

Se tiver qualquer dúvida sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com a Profa. XXXX pelo telefone: XXXX-XXXX, ou com o Comitê de Ética X (XXXX-XXXX).

Todas as informações prestadas nesta entrevista são de caráter confidencial e serão utilizadas somente para fins científicos, sem qualquer identificação pessoal. Esclarecemos que seu consentimento está sendo pedido para este estudo, não sendo extensível a nenhum outro projeto de pesquisa. É garantida e respeitada a privacidade na divulgação dos resultados da pesquisa, e não haverá, de forma alguma, sua identificação.

Qualquer provável benefício para o bem estar da população depende da exatidão de suas respostas. Portanto, se o Sr(a) não entender alguma das questões, por favor, solicite os esclarecimentos que julgar

necessários. Também estaremos a disposição para informá-lo(a) sobre os procedimentos, riscos e benefícios decorrentes da pesquisa, ou qualquer dúvida sobre o estudo.

É garantido o direito de desistir a qualquer momento da participação nesta pesquisa, sem prejuízo algum para você. O(a) Sr(a) tem a liberdade de não participar do estudo, ou retirar seu consentimento a qualquer momento. O(A) Sr(a) pode se recusar a responder a qualquer pergunta do questionário ou participar de qualquer procedimento. Os resultados dos exames serão encaminhados pelo correio para sua residência.

V – INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Você poderá entrar em contato com a Profa. XXXX pelo telefone: (XX) XXXX-XXXX, ou email XXXX@usp.br, sobre a pesquisa, ou no endereço: X, CEP: XXXXX-XXX. Também poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da X, no mesmo endereço, telefone (XX) XXXX-XXXX, email: XXXX@XXXX.XX.X.

VI – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de _____.

Assinatura do sujeito de pesquisa

ou responsável legal

Assinatura do pesquisador

(carimbo ou nome legível)