

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA – PPGBTOX**

**ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO +3954 DO
GENE DA INTERLEUCINA- 1BETA, OBESIDADE,
LDL- OXIDADO E SEU POTENCIAL EFEITO
LIPOTÓXICO**

TESE DE DOUTORADO

MARIA FERNANDA MANICA RIZZI CATTANI

Santa Maria, RS, Brasil

2012

**ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO +3954 GENE DA
INTERLEUCINA-1 BETA, OBESIDADE, LDL - OXIDADO E
SEU POTENCIAL EFEITO LIPOTÓXICO**

Maria Fernanda Manica Rizzi Cattani

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação Ciências Biológicas, Área de concentração em Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências Biológicas.**

Orientadora: Prof^a Dr^a Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Santa Maria, RS, Brasil

2012

C368a Cattani, Maria Fernanda Manica Rizzi

Associação entre o Polimorfismo +3953 do gene da Interleucina-1beta, obesidade, LDL- oxidado e seu potencial efeito lipotóxico / por Maria Fernanda Manica Rizzi Cattani. – 2012.

87 f. : il. ; 30 cm

Orientadora: Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, RS, 2012

1. Obesidade 2. Interleucina-1B 3. Polimorfismo +3953 4. LDL-Oxidado 5. Lipotoxicidade I. Cruz, Ivana Beatrice Mânica da II. Título.

CDU 613.25

Ficha catalográfica elaborada por Simone G. Maisonave – CRB 10/1733
Biblioteca Central da UFSM

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA – PPGBTOX**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado:

**ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO +3953 DO GENE DA
INTERLEUCINA-1 BETA, OBESIDADE, LDL-OXIDADO E SEU
POTENCIAL EFEITO LIPOTÓXICO**

Elaborado por
Maria Fernanda Manica Rizzi Cattani

como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO EXAMINADORA:

Ivana Beatrice Mânica da Cruz, Dr^a.
(Presidente/Orientadora)

Rafael Noal Moresco, Dr. (UFSM)

Félix Antunes Soares, Dr. (UFSM)

Maria Rosa Chitolina Schetinger, Dra (UFSM)

Roselei Fachinetto, Dra (UFSM)

Santa Maria, 06 de março de 2012.

“A maioria pensa com a sensibilidade,
eu sinto com o pensamento.
Para o homem vulgar,
sentir é viver, e pensar é saber viver.
Para mim, pensar é viver e sentir não
é mais que o alimento de pensar.”

Fernando Pessoa

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese a minha querida prima Ivana, e aos meus amados pais Carlos e Rosane que tornaram esse sonho possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora Dra. Ivana da Cruz por ter me aberto às portas do seu laboratório e dividido o seu conhecimento, incentivando a tornar-me uma cientista.

Aos meus irmãos Guta, Frederico e Henrique, pelo apoio e carinho

Ao Juci, pelo amor, dedicação e companheirismo.

A Roseli, por ter acreditado, e me ajudado a acreditar também.

A minha Vó Irene, pela torcida e incentivo.

As minhas tias Bel, Fátima e Vanda, pelo carinho e por estarem por perto quando eu precisei.

As minhas amigas, Thaís e a Greice que estiveram comigo do início ao fim desta caminhada.

A equipe do Laboratório de Biogenômica, em especial a Danise e ao Raul, meus primeiros bolsistas.

Ao Dr. Euler Ribeiro por suas colaborações, e a amizade.

A todos os que participaram desta tese de alguma maneira, e estarão sempre no meu coração.

Muito obrigada.

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica Toxicológica – PPGBTOX

ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO +3954 DO GENE DA INTERLEUCINA-1 BETA, OBESIDADE, LDL-OXIDADO E SEU POTENCIAL EFEITO LIPOTÓXICO

AUTORA: MARIA FERNANDA MANICA RIZZI CATTANI

COORIENTADORA: IVANA BEATRICE MÂNICA DA CRUZ

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 06 de março de 2012.

A obesidade é uma inflamação sistêmica de baixo grau associada a elevada liberação de moléculas pró-inflamatórias pelo tecido adiposo. O aumento da adiposidade resulta em necrose tecidual e liberação de ácidos graxos, a partir dos adipócitos, que tendem a se acumular em outros tecidos corporais causando um fenômeno conhecido como lipotoxicidade. A IL-1 β é uma das principais citocinas pró-inflamatórias do sistema imune, e a sua produção continuada pode agir diminuindo o influxo da glicose para dentro da célula, e induzir a produção de radicais livres contribuindo para a manutenção de um estado de estresse oxidativo. Por este motivo, alguns autores sugeriram que a IL-1 β seria uma molécula glicolipotóxica. Nos seres humanos a IL-1 β possui um polimorfismo +3953 do gene da IL-1B parece ser funcional pois tem sido associado a variações na produção da IL-1 β *in vivo*. Portanto, o objetivo deste estudo foi o de analisar a associação entre o polimorfismo +3953 do gene da IL-1B com a obesidade, a influência nos níveis glicêmicos, lipídicos e da molécula de LDL- oxidado (LDL-ox). Para isso, foram realizados dois estudos. O primeiro foi um estudo caso-controle com 880 indivíduos Caucásianos classificados para obesidade (não obesos= 283, sobrepeso=334, obesos= 263), com idade entre 18 e 92 anos, genotipados para IL-1B +3953 determinados por PCR-RFLP. As variáveis PAD, PAS, circunferência abdominal, IMC, altura, peso, bem como o perfil glicêmico e lipídico foram medidos. No segundo estudo foram selecionados 225 indivíduos, previamente genotipados para IL-1B +3953, e medido os níveis séricos de LDL-ox, além das medidas bioantropométricas e perfil glicêmico e lipídico. Em ambos os estudos os voluntários não fumavam e não apresentavam doenças cardiovasculares ou crônico-degenerativas que pudessem interferir nos resultados. Os resultados, do primeiro estudo, mostraram que o alelo C (CT CC) apresentou uma frequência maior no grupo dos obesos e sobrepeso quando comparado ao grupo dos não obesos. A chance dos indivíduos obesos de serem portadores do genótipo CC foi de 1,34 (IC 95%, 1,119-1,605). Estes resultados foram independente do gênero e idade. O segundo estudo mostrou que indivíduos com o genótipo CC e CT apresentaram níveis mais elevados de LDL-ox do que os portadores do genótipo TT. A análise multivariada mostrou que este resultado é independente do gênero, idade e obesidade. Entretanto, em ambos os estudos, não foi observada influência deste polimorfismo nos níveis glicêmicos. Assim, podemos concluir que a IL-1 β é uma molécula, com efeito obesogênico e lipotóxico, corroborando estudos prévios em modelos animais.

Palavras-chave: obesidade. Interleucina - 1beta. LDLoxidado.

ABSTRACT

Doctor Thesis
Post Graduate Course on Biological Sciences:
Toxicological Biochemistry – PPGBTOX
Federal University of Santa Maria (RS, Brazil)

ASSOCIATION BETWEEN INTERLEUKIN-1 BETA GENE, OBESITY, LDL-OXIDASE AND ITS LIPOTOXICITY EFFECT POTENCIAL

AUTHOR: MARIA FERNANDA MANICA RIZZI CATTANI

ADVISER: IVANA BEATRICE MÂNICA DA CRUZ

Defense Local and Date: Santa Maria, March 06th, 2012.

Obesity is a systemic low grade inflammation, that is associated to the increased production of proinflammatory molecules by adipose tissue. Besides, the adiposity elevated induces cellular apoptosis and release of a large amounts of free fatty acids from disrupted adipocyte. These molecules tend to accumulate in the liver and other body tissues like skeletal muscles causing a phenomenon known as lipotoxicity. Evidence suggests that in addition to fatty acids there are other molecules that could have a severe effect lipotoxicity. This is the case of the inflammatory cytokine interleukin 1 beta (IL-1 β). The IL-1 β is a major inflammatory cytokines in immunity system. Studies suggest that its continued production may act by reducing the glucose influx, and induces the free radicals production contributing to the maintenance of a state of oxidative stress. For this reason, some authors have suggested that IL-1 β would be a molecule glicolipotóxic. In humans the expression of IL-1B is under strong genetic control. The single nucleotide polymorphism (SNP) of C to T at nucleotide position +3953 of the IL-1B gene appears to be functional because it has been associated with increased production of IL-1 β *in vivo*. Therefore, the aim of this study was to analyze the association between the polymorphism +3953 IL-1B gene with obesity, the influence on glycemic control, lipid and oxidized LDL molecule (oxLDL). For this, two studies were performed. The first was a case-control study with 880 Caucasian individuals, classified to obesity (non-obese = 283, overweight = 334, obese = 263), age between 18-92 years, and genotyped to IL-1B +3953 polymorphism. It was measured the bioanthropometric variables (DBP, SBP, IBM, height, weight, waist circumference) and serum parameters of blood glucose, lipid profile. In the second study, we included 225 subjects genotyped previously and measured the oxLDL serum levels, besides bioanthropometric and lipid profile measures. In both studies the volunteers did not smoke and had no cardiovascular disease or chronic degenerative diseases that could affect results. The IL-1B polymorphism genotypes were determined by PCR-RFLP and biochemical parameters by spectrophotometry. The first study results showed that the C allele (CC and CT) had a higher frequency in the group of obese and overweight when compared to the non obese group. The odds ratio showed 1.340 (95% CI: 1.119-1.605) times more chance of the obese group being CC carriers compared to non-obese group independent of gender and age. The second study showed that TT genotype carriers presented lower levels of oxLDL than patients with other genotypes. However no significant influence was observed of this polymorphism in blood glucose levels. Multivariate analysis showed that this result is independent of sex, age, obesity and hypertension. Thus, these results support the hypothesis that IL-1 β is a molecule indeed obesogenic and lipotoxicity as previously suggested from animal models studies.

Key-word: obesity. Interleukin-1beta. Oxidized-LDL

1 INTRODUÇÃO

A obesidade é considerada um problema epidemiológico global de alto custo para a saúde pública afetando principalmente países desenvolvidos e em desenvolvimento como é o caso do Brasil (Organização Mundial da Saúde, OMS, 2007).

Em termos etiológicos, a obesidade é uma doença multifatorial caracterizada não só pelo aumento na massa do tecido adiposo, ou seja, o aumento no número e no tamanho dos adipócitos, mas também pela ocorrência de um processo inflamatório crônico relacionado a grande infiltração de células mononucleadas nos depósitos adiposos (WELLEN E HOTAMILISGIL, 2003; HOTAMILISGIL *et al.*, 2010). Isso ocorre porque o tecido adiposo possui uma estreita ligação com o sistema imune inato, já que os adipócitos compartilham com as células do sistema imune algumas propriedades importantes como o complemento de ativação e a produção de citocinas pró-inflamatórias (HOTAMILISGIL *et al.*, 1993; DINARELLO, 1996; 2011; BASTARD *et al.*, 2006). Assim, nos estados obesogênicos, ocorre uma ativação continuada na produção de muitas citocinas pró-inflamatórias e por esse motivo, se entende que a obesidade representa um estado inflamatório sistêmico de baixo grau, que está potencialmente implicado no desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (BERG e SCHERER, 2005; RECH *et al.*, 2007; ZALESIN *et al.*, 2011).

Uma das principais alterações relacionadas à obesidade é a ocorrência de apoptose ou necrose dos adipócitos fazendo com que a gordura armazenada nestas

células extravase para o ambiente extracelular e para a circulação sistêmica (QUEIRÓZ, 2009). O aumento de ácidos graxos livres na corrente sanguínea, em células e tecidos, principalmente hepatócitos e células musculares, provocam um estado tóxico que interfere em muitas rotas bioquímicas induzindo efeitos negativos importantes como o estresse oxidativo e a citotoxicidade (BIRSE E BODMER, 2011). Esse fenômeno é hoje conhecido como lipotoxicidade.

Os distúrbios relacionados à lipotoxicidade estão na base da cadeia de eventos metabólicos que predispõe o organismo ao aparecimento de outras disfunções e doenças associadas à obesidade como a resistência insulínica, ao Diabetes *mellitus* do tipo 2, a hipertensão arterial sistêmica, as dislipidemias, a síndrome metabólica, a aterosclerose, a doenças cardiovasculares, as neoplasias e as doenças neurodegenerativas (revisão em BIRSE E BODMER, 2011).

Investigações complementares têm sugerido que existam outras moléculas lipotóxicas, além dos ácidos graxos livres incluindo citocinas inflamatórias, uma das mais potentes do organismo é a interleucina 1 β (IL-1 β). Estudos em modelos experimentais sugerem que a IL-1 β apresenta níveis constantemente aumentados na obesidade relacionado com o aumento à resistência insulínica e a oxidação de lipídios como o LDL oxidado (LDL-ox) (STOLLENWERK *et al.*, 2005). Esses dois processos, por sua vez, estão diretamente associados ao desenvolvimento do Diabetes do tipo 2 e da aterosclerose em humanos. Baseado nas evidências de que na obesidade a IL-1 β influencia o metabolismo glicêmico e lipídico, os autores Gabriano & Sturley (2009) e Poitout & Robertson (2008) sugerem que esta possa ser glicolipotóxica.

Entretanto, estudos em humanos avaliando o quanto a IL-1 β é uma citocina lipotóxica são incipientes, dadas às dificuldades metodológicas relacionadas ao seu

estudo. Isto porque, a expressão da IL-1 β é modulada por diversos fatores. Por ser uma citocina chave na regulação da resposta inflamatória corporal é produzida em grande quantidade quando ocorrem processos infecciosos, lesões corporais ou quando o corpo é imunologicamente desafiado por algum tipo de antígeno (KARASNEH *et al.*, 2003). Deste modo, uma das estratégias para se investigar o quanto a IL-1 β é uma molécula, com efeito, lipotóxico seria através de estudos genéticos.

Em 1984 foi clonado o gene da IL-1B, dando a possibilidade de observar que esta molécula é, estruturalmente, um polinucleotídeo simples que exerce numerosos efeitos biológicos apresentando alterações na sua expressão associadas principalmente às doenças autoimunes e também as diversas morbidades relacionadas a obesidade, como a aterosclerose, a insuficiência cardíaca crônica e o Diabetes do tipo 2 (DINARELLO, 1988, POCIOT *et al.*, 1992).

O gene da IL-1B apresenta diversos polimorfismos que parecem influenciar a função desta molécula no organismo. Esses polimorfismos são consequências das mutações de nucleotídeo simples (*single nucleotide polymorphism*, SNPs), sendo que dois ocorrem na região promotora do gene e um na região transcricional (CULLUP *et al.*, 2001).

A produção da IL-1 β pelo organismo se dá em duas etapas: na primeira é sintetizada uma pró-IL-1 β que dará origem a proteína madura (HIGGINS *et al.*, 1994) Assim, alterações na produção da IL-1 β podem estar relacionadas a variações genéticas que afetam, ou a produção de transcritos que irão produzir a pró-IL-1 β , ou que irão produzir a IL-1 β madura (GIRARDIN *et al.*, 1999).

O polimorfismo transcricional está localizado no nucleotídeo +3953 onde ocorre a substituição de uma citosina por uma timina (C→T). Essa substituição parece alterar a produção da IL-1 β madura. Tal polimorfismo tem sido associado a doenças cardiovasculares, desordens gástricas relacionadas a infecção por *Helicobacter pylori* e com massa de gordura corporal (ZEYBEK *et al.*, 2011; FARSHAD *et al.*, 2010; STRANDBERG *et al.*, 2008).

Entretanto, ainda são incipientes as investigações analisando se o polimorfismo +3953 do gene IL-1B estaria associado à maior suscetibilidade a obesidade e, a outros distúrbios metabólicos indicadores de lipotoxicidade associada à obesidade como é o caso da alteração nos níveis glicêmicos, lipídicos e do LDL oxidado. O presente estudo tem como objetivo contribuir na elucidação desta questão.

1.1 Epidemiologia e Evolução da Obesidade

Em termos epidemiológicos a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que existam no mundo mais de um bilhão de pessoas adultas com sobrepeso, e pelo menos trezentos milhões de obesos (ZALESIN *et al.*, 2011). A obesidade é hoje considerada uma pandemia mundial uma vez que atinge um número muito grande de indivíduos no mundo todo. Em termos de triagem geral da população, a OMS utiliza o índice de massa corporal, (IMC) calculado através da divisão do peso corporal pela altura em metros ao quadrado (Kg/m^2), para definir a obesidade. No caso, indivíduos com $\text{IMC} < 18,5 \text{ Kg/m}^2$ são considerados desnutridos, entre 18,5 a

< 25 kg/m², são tidos como eutróficos, já aqueles que apresentam IMC \geq 25 kg/m² são considerados com sobrepeso e os com IMC > 30 kg/m² são obesos. A obesidade pode, ainda, ser dividida em três categorias: obesidade I entre 30 a < 34 kg/m², obesidade II entre 35 a < 40 kg/m² e obesidade III > 40 kg/m² (OMS, 2007).

Nos últimos anos, evidências epidemiológicas sugerem que a circunferência da cintura pode ser utilizada na identificação da obesidade por representar o acúmulo de tecido adiposo no abdômen. Desse modo, esse índice também passou a ser utilizado em estudos populacionais onde se considera obesas, pessoas que apresentam uma circunferência \geq 102 cm para homens e para mulheres \geq 88 cm. Esse índice parece representar um maior conjunto de alterações bioquímicas e fisiológicas associadas ao excesso de peso (HAN *et al.*, 1997; OMS, 2007; WANG *et al.*, 2010).

Estudos sobre a etiopatologia da obesidade indicam que, essa parece ser uma morbidade causada por interações genético-ambientais que possuem bases genéticas relacionadas à evolução da espécie humana. Essa concepção genético-evolutiva baseia-se em evidências de que, os mamíferos surgiram há cerca de 200 milhões de anos e, para sobreviverem necessitariam fixar adaptações metabólicas como a regulação do metabolismo energético e o controle da temperatura corporal interna. Essas funções estavam, e ainda estão, diretamente relacionadas com o armazenamento de gordura no tecido adiposo, tecido altamente organizado, complexo e eficiente (revisão em GOTTLIEB *et al.*, 2008; ROTH *et al.*, 2009).

A organização do tecido adiposo nos mamíferos, incluindo os seres humanos, trouxe como vantagem, uma regulação mais eficiente das necessidades de energia corporal, já que esses animais precisam sobreviver em um ambiente com grandes flutuações relacionadas à disponibilidade de nutrientes. Além de aumentar a

eficiência na regulação de energia corporal, esse tecido também acumulou outras funções como a regulação da temperatura corporal, impedindo a hipotermia através da geração de calor. Deste modo, o tecido adiposo passou a armazenar moléculas de alto valor energético e também a produzir uma série de moléculas regulatórias, algumas tendo função endócrina, parácrina e outras tendo uma estreita relação com o sistema imune inato do organismo. Tais moléculas auxiliam na modulação da ingestão alimentar (controle do apetite e saciedade), na taxa metabólica, na regulação da temperatura, etc (revisão em GOTTLIEB *et al.*, 2008; ROTH *et al.*, 2009). Este é o caso da leptina, que é ao mesmo tempo um hormônio e uma molécula pró-inflamatória (WAUMAN E TAVERNIER, 2011), e da adiponectina uma das principais moléculas antiinflamatórias que o organismo possui ao mesmo tempo em que age na regulação da produção da energia celular (revisão em ROTH *et al.*, 2009).

A modulação da produção e do gasto de energia, no caso do organismo humano, requer um processo altamente regulado e coordenado. Parece que regulação desse processo ocorreu ao longo da história evolutiva da espécie via pressão de seleção ambiental, aonde os indivíduos, com genes que conferiam maior capacidade de armazenamento de moléculas energéticas e maior economia metabólica, teriam sobrevivido mais e, portanto, deixado um maior número de descendentes (ROTH *et al.*, 2009). Acredita-se que essa condição fez com que as variações genéticas que apresentavam maior eficiência no acúmulo e armazenamento de energia passassem a ser os mais frequentes nas populações humanas (WHEELER, 1991; LEONARD *et al.*, 1994). Como a espécie humana, no início da sua evolução, era caçadora-coletores e vivia em um ambiente paleolítico extremamente flutuante em relação à obtenção de alimentos, esse fenômeno parece

ser verdadeiro, já que tal ambiente apresentava ciclos regulares de escassez e abundância de alimentos principalmente relacionados à sazonalidade (inverno-verão e/ou seca-cheia). Assim, aqueles indivíduos que conseguiam armazenar e apresentar menor gasto energético apresentavam geneticamente mais chances de sobrevivência, principalmente nos períodos de maior escassez de alimentos (LEONARD *et al.*, 1994; SIMOPOULOS, 1999; revisão em GOTTLIEB *et al.*, 2008).

Porém, o progresso da civilização impôs profundas modificações ambientais à espécie humana principalmente a partir da Revolução Industrial quando passou a ocorrer grande aumento na produção e consumo de nutrientes de alto valor calórico e diminuição no gasto de energia. Esses dois fenômenos concomitantes associados, (superalimentação e sedentarismo) influenciam diretamente o metabolismo bioquímico celular agindo negativamente no metabolismo energético e em outras rotas metabólicas da célula, já que os genes que controlam tais rotas são os mesmos. Isto porque, os genes dos seres humanos não mudaram em relação ao período Paleolítico (500.000 a.C a 1.000 a.C.) em que ocorreu a evolução da espécie (LEONARD *et al.*, 1994).

Desde então, o genoma humano continuou basicamente o mesmo, uma vez que a taxa de mutação espontânea é muito baixa (aproximadamente 1×10^{-5} a 1×10^{-6} para o *Homo sapiens*). Assim, grande parte das pessoas possui variantes genéticas que conferem alta eficiência na produção, armazenamento e gasto energético (revisão em GOTTLIEB *et al.*, 2008).

Por esse motivo, acredita-se, que esta mudança ambiental da sociedade humana moderna teve como consequência direta o aumento na prevalência de indivíduos com excesso de peso corporal, ou seja, portadores de obesidade.

A obesidade, portanto se tornou um problema epidemiológico contemporâneo crescente e de grande impacto mundial já que está associada a outras morbidades que no seu conjunto são conhecidas como “síndromes da civilização” (revisão em GOTTLIEB *et al.*, 2008). As principais síndromes da civilização, além da obesidade são as disfunções e as morbidades que aparecem a ela associadas como: a resistência a insulina que frequentemente evolui para o Diabetes *mellitus* do tipo 2, as dislipidemias e a hipertensão arterial sistêmica. Estas, por sua vez aumentam a suscetibilidade do organismo às doenças cardiovasculares como é o caso do infarto agudo do miocárdio e o acidente vascular cerebral (AVC), as neoplasias e também as doenças neurodegenerativas como o Alzheimer (revisão em ROTH *et al.*, 2009).

Ainda dentro do contexto evolutivo, pesquisadores têm questionado se a obesidade e as suas disfunções e morbidades associadas como é o caso da Diabetes *mellitus* do tipo 2, dislipidemia e hipertensão e da própria síndrome metabólica teriam tido alguma vantagem seletiva no mundo pré-histórico. Uma teoria plausível é a preconizada por Roth e colaboradores (2009) que consideram que a síndrome metabólica representada por um conjunto de alterações que poderia funcionar como um elemento protetor em um ambiente em que a expectativa de vida era muito curta (na pré-história a longevidade média era de 16 anos de vida), já que o ser humano estava muito exposto ao risco de infecções e predação.

Esta proteção não seria dada apenas pela maior quantidade de gordura armazenada e a menor taxa metabólica (gasto energético), mas também por ativar de modo crônico o sistema imune. No caso, a ativação do sistema imune poderia conferir uma proteção adicional contra patógenos infecciosos como a tuberculose, malária na fase inicial da vida (da criança até o adulto jovem). Entretanto, o aumento da longevidade humana relacionada ao progresso da civilização teria feito com que

emergisse o lado negativo das doenças metabólicas. Estas passariam então, a predispor o organismo a outras disfunções e morbidades crônicas não transmissíveis (ROTH *et al.*, HOTAMISLIGIL, 2010). De todo modo, a concepção evolutiva dos fatores predisponentes da obesidade fornece uma ideia da complexidade do tema e da necessidade de estudos complementares que integrem abordagens bioquímicas e genéticas.

1.2 Alterações bioquímicas e morfofisiológicas da obesidade

1.2.1 Tecido Adiposo

O tecido adiposo é considerado um tecido conjuntivo especializado. Nos mamíferos existem dois tipos de tecido adiposo: o tecido adiposo branco e o tecido adiposo marrom. Ainda que ambos estejam envolvidos diretamente na modulação do metabolismo energético corporal, os mesmos apresentam outras propriedades funcionais distintas. O tecido adiposo marrom é o tecido comumente encontrado no embrião e na criança ao nascer, especializado principalmente na termogênese, via e dissipação de energia na forma de calor induzida pela atividade da enzima termogênica. Entretanto, na medida em que o ser humano se desenvolve este tecido fica mais escasso no corpo sendo substituído pelo tecido adiposo branco (QUEIRÓZ *et al.*, 2009).

Já o tecido adiposo branco apresenta uma grande complexidade estrutural e funcional (TRAYHURN E BEATTIE, 2001). Este tecido armazena e fornece ácidos graxos conforme as necessidades, representando o maior reservatório energético do organismo, além de apresentar função endócrina (QUEIRÓZ *et al.*, 2009). Em termos estruturais, apesar de o tecido adiposo branco estar sempre associado ao tecido conjuntivo, o mesmo é constituído não só por adipócitos e pré-adipócitos, mas também por fibroblastos e células do sistema imune, especialmente macrófagos. Além dessas células, o tecido adiposo apresenta-se bem vascularizado (BERG E SCHERER, 2005; DESRUISSEAUX *et al.*, 2007).

Os adipócitos são células especializadas, do tecido adiposo, em armazenar os lipídios na forma de triacilglicerol e ésteres de colesterol dentro de organelas conhecidas como gotículas de lipídios. Uma vez que, essa gotícula corresponde aproximadamente a 95% do volume do adipócito, as mudanças na quantidade de lípidos armazenados afetam diretamente o tamanho da célula. Assim, um adipócito tem um tamanho que pode variar de 25 a 250 μm (DESRUISSEAUX *et al.*, 2007).

Apesar desta grande variação o aumento do diâmetro e volume dos adipócitos é um processo limitado. Quando seu crescimento atinge o grau máximo e a sua capacidade de armazenar gordura se exaure, ocorre o estímulo à adipogênese. Esse processo ocorre a partir de células-tronco mesenquimais multipotentes residentes no estroma do tecido adiposo (DE FRONZO *et al.*, 2004) e compreende a três fases: 1) A primeira fase denominada determinação ou comprometimento ocorre quando as células multipotentes tornam-se pré-adipócitos ficando comprometidas com a linhagem adipocitária através da ativação de receptores glicocorticóides. 2) Na segunda fase, os pré-adipócitos são induzidos a se diferenciarem em adipócito imaturos. Para entrar na fase de diferenciação

terminal, ocorre a ativação dos receptores gama que são por sua vez ativados por moléculas regulatórias como a PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) e as CEBP α (*Transcription factor CCAAT/enhancer binding protein α*) consideradas dois elementos reguladores centrais da adipogênese. 3) Assim, os adipócitos imaturos adquirem as características de adipócitos maduros, acumulando gotículas de gordura à habilidade de responder a hormônios como a insulina e de induzir ativação de eventos transcricionais em cascata (AILHAUD E HAUNER, 2004; FRAMER, 2006).

As modificações no tamanho e número de adipócitos maduros ocorrem em resposta à ativação de suas ações metabólicas típicas que são a lipogênese e a lipólise. Tais alterações variam de acordo com a necessidade de incorporação ou liberação de lipídios, que dependem, entre outros fatores, do estado nutricional do indivíduo, do seu gasto energético, da influência de hormônios (catabólicos ou anabólicos), da atividade de enzimas envolvidas nesses processos e da heterogeneidade, características existentes entre os diversos grupamentos adiposos presentes do organismo, etc (JENSEN *et al.*, 1997).

Até meados do século passado, o tecido adiposo era considerado uma estrutura terminal, do ponto de vista da sua diferenciação, isto é, uma vez concluída a sua diferenciação, o tecido não mais se renovaria. Contudo esta concepção está sendo cada vez mais questionada e parece não ser a mais correta (SPALDING *et al.*, 2008).

O estudo conduzido em ratos por Klyde & Hirsh (1979) utilizando carbonos radioativamente marcados mostrou que uma célula adiposa animal tem uma sobrevida média de 140 dias. Baseados nisso, Spalding e colaboradores (2008) calcularam que a o tecido adiposo em seres humanos, se renovaria completamente

a cada oito ou nove anos. Esse fenômeno de renovação do tecido se deve a um balanço entre a geração de novos adipócitos para substituir as células mais antigas que entram em processo de apoptose. Assim, acredita-se que os adipócitos apresentam renovação intensa e constante, e, o potencial de gerar novas células persiste durante toda a vida do indivíduo.

Aproximadamente 15 a 50% das células que constituem o tecido adiposo correspondem a células-tronco mesenquimais, que são capazes de se dividir e diferenciarem-se em diversas linhagens celulares incluindo miócitos, condrócitos, osteoblastos e adipócitos dependendo de fatores estimuladores apropriados. Essas células, entretanto, possuem uma capacidade muito baixa de sintetizar e armazenar lipídios neutros, o que vai ocorrer somente após a diferenciação em adipócitos (KONIECZNY E EMERSON, 1984; COLEMAN E LEE, 2004).

Até recentemente, o tecido adiposo era considerado um mero compartimento de armazenamento e fornecimento de ácidos graxos conforme as necessidades energéticas do organismo. No entanto, em 1994 a identificação da molécula leptina mudou este paradigma. A partir de então, o tecido adiposo passou a ser considerado como um órgão endócrino (ZHANG *et al.*, 1994). Outros estudos demonstraram que o tecido adiposo possui também um papel central na resposta imune inata, pois secreta uma variedade de peptídeos e hormônios relacionados a defesa corporal. Isso ocorre via presença dos macrófagos presentes no tecido adiposo que produzem algumas das moléculas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (DESRUISSEAUX *et al.*, 2007; HUTLEY E PRINS, 2005).

Existem aproximadamente 50 moléculas biologicamente ativas que o tecido adiposo produz e secreta, denominadas adipocinas. Essas biomoléculas possuem funções variadas conforme o tipo de tecido e órgão. O corolário para a secreção de

uma gama tão vasta de adipocinas, é que o tecido adiposo possui um sistema extensivo de comunicação com outros tecidos e órgãos (TRAYHURN E WOOD, 2004). Entre elas estão a leptina (ZHANG *et al.*, 1994), a adiponectina (HAVEN, 2004) e outras moléculas como o fator α de necrose tumoral (TNF- α) (HOTAMILISGIL *et al.*, 1993), o inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1) (MUTCH *et al.*, 2001), a resistina (STEPPAN E LAZAR, 2004) a visfatina (FUKUHARA *et al.*, 2005) e as citocinas IL-6 (MOHAMED-AALI *et al.*, 1997) e IL-1 β (TRAYHURN, 2005).

Não raro, essas moléculas possuem diversas funções metabólicas importantes, ou seja, possuem efeitos pleiotrópicos. Este é o caso da leptina. Essa molécula, que também é considerada um hormônio, possui um efeito muito grande no comportamento alimentar, na taxa metabólica, nos principais eixos endócrinos corporais e na regulação da glicose. Comprovadamente estudos em seres humanos e roedores mostraram que a deficiência da leptina, e/ou alterações nos receptores celulares desta molécula causa obesidade mórbida, Diabetes e outras alterações neuroendócrinas. Por outro lado, tratamentos com reposição da leptina levam a diminuição da ingestão de alimentos, a normalização da homeostase glicêmica e o aumento no gasto energético metabólico (GAUTRON E ELMQUIST, 2011).

Alguns autores têm postulado a existência de um sistema sensor bioquímico da condição energética da célula. Esse sistema indicaria se a célula estaria ou não precisando produzir maior ou menor quantidade de energia. O mesmo seria diretamente regulado principalmente pela adiponectina. No sistema sensor bioquímico energético existem moléculas importantes como a proteína quinase ativada por AMP (AMPK), essa é ativada quando a produção do ATP diminui ou quando o consumo de ATP é acelerado. Nessa situação a AMPK atua como um

sensor de privação da glicose impedindo que a célula fique totalmente depletada de energia (HARDIE, 2011). Assim, a AMPK tem a capacidade de inibir as enzimas do metabolismo de lipídios como a acetil-CoA carboxilase e a lipase, participando da regulação do metabolismo energético da célula. Outra molécula que parece compor o sistema sensor de energia celular é a PPAR-1 α (*peroxisome proliferator-activated receptor 1 alpha*), que é um dos principais reguladores da biogênese mitocondrial e tem um papel chave no gasto energético modulando uma série de proteínas relacionadas com a gliconeogênese, síntese de ácidos graxos, glicólise e oxidação (FERNANDEZ-MARCOS E AUWERX, 2011). O sistema sensor de energia celular também inclui a participação de outras moléculas como o fator 21 de crescimento de fibroblastos (FGF21), que é produzido predominantemente pelas células hepáticas e adiposas e por processos de metilação do DNA que silencia determinados genes. Entretanto, esse sistema sensor é profundamente afetado em estados obesogênicos em que existe uma grande oferta de energia para a célula (BARRES E ZIERATH, 2011; DOMOUZOGLU E MARATOS-FLIER, 2011).

1.2.2 Obesogênese

Como já foi anteriormente comentado, a obesidade é um processo relacionado ao aumento sistemático da massa adiposa (obesogênese). Tal processo ocorre através de dois mecanismos: hipertrofia (aumento no tamanho dos adipócitos) e hiperplasia (aumento no número de adipócitos), os quais são influenciados pela dieta e genética do indivíduo (JO *et al.*, 2009). Em indivíduos não

obesos, há um equilíbrio entre a atividade hipertrófica e hiperplásica do tecido adiposo, o que determina um número, praticamente, constante de células. No entanto, em indivíduos obesos há um predomínio de células hipertrofiadas no tecido adiposo (GOOSSENS, 2008).

Estudos com cultura do estroma vascular de células adiposas e em modelos animais demonstraram que, durante o desenvolvimento da obesidade há um aumento na atividade angiogênica estimulada, pelos macrófagos, para compensar a expansão do tecido adiposo. Essa estimulação garante um rápido crescimento do tecido adiposo logo no início do ganho de peso. Uma vez que a relação peso/altura medida pelo IMC seja $\geq 30 \text{ kg/m}^2$, inicia-se a falência na compensação angiogênica. Essa falência leva a uma diminuição dramática na vascularização resultando em hipóxia. O estado de hipóxia, por sua vez gera o recrutamento de um número maior de macrófagos provenientes do sangue que migram para o tecido adiposo. Esses passam a secretar moléculas importantes na tentativa de fazer com que a vascularização seja recuperada. Entre essas moléculas sintetizadas estão PDGF (Fator de crescimento derivado das plaquetas) que é uma molécula pró-angiogênica (PANG *et al.*, 2008). Entretanto, a vascularização não chega a ser restabelecida, caso não haja perda de peso, e o fluxo sanguíneo diminuído compromete a função vascular, o que contribui para as disfunções do tecido adiposo durante o estado de obesidade (SIMONSEN *et al.*, 2003; KAMPF *et al.*, 2005), incluindo alterações em rotas bioquímicas celulares, apoptose e necrose celular.

As mudanças na massa do tecido adiposo estão associadas com alterações nas funções metabólicas e endócrinas, como o aumento na síntese de proteínas e lipídeos, perturbações na nutrição celular e no fluxo de energia deste tecido e, têm efeitos negativos em todo o sistema fisiológico (NISHIMURA *et al.*, 2008).

Um número cada vez maior de evidências se acumula mostrando que a produção e secreção dessas moléculas pelo tecido adiposo está alterada na obesidade, o que potencialmente leva à resistência a insulina, hipercoagulabilidade e aterogênese, hipertensão arterial sistêmica, intensificação de estados pró-inflamatórios, aumento de riscos cardiovasculares e acidentes tromboembólicos (HAUNER, 2004). Dentro do quadro metabólico relacionado à obesidade se destaca a alteração da resposta imune inata relacionada ao tecido adiposo.

1.2.3 Obesidade e Inflamação

O tecido adiposo de humanos magros, assim como o de ratos, é constituído de 5 a 10% de macrófagos. Esses se infiltram no tecido adiposo como monócitos circulantes em resposta a secreção de MCP-1 (Proteína 1 quimioatrativa de monócitos) induzidas pela IL-1 β . A infiltração de macrófagos é diretamente proporcional a adiposidade. Ou seja, o tecido adiposo de indivíduos e ratos obesos e/ou extremamente obesos, geralmente, é constituído por cerca de 60% de macrófagos (WEISBERG *et al.*, 2003).

Os macrófagos do tecido adiposo são um dos responsáveis pela expressão aumentada de moléculas pró-inflamatórias, além de participarem das vias inflamatórias que estão ativadas nos indivíduos obesos (WEISBERG *et al.*, 2003). Entretanto, além dos macrófagos, muitas destas citocinas pró-inflamatórias incluindo a IL-1 β , também são produzidas pelas células do estroma vascular do tecido adiposo (ROSS *et al.*, 2002; FAIN *et al.*, 2003).

Na obesidade avançada, quando ocorre morte das células devido a diminuição da vascularização os macrófagos, são atraídos para os adipócitos necróticos englobando-os, formando um agregado de macrófagos chamados de *Crown-like Structure*¹. Esses agregados, por sua vez produzem várias citocinas inflamatórias e espécies reativas de oxigênio (EROs) o que determina uma condição crônica de inflamação-oxidação local (WEISBERG *et al.*, 2003).

Em 1993 Hotamisligil e colaboradores sugeriram, pela primeira vez, uma ligação entre obesidade e inflamação, ao mostrarem que, a citocina inflamatória TNF- α era liberada pelo tecido adiposo de roedores obesos, e isto estava implicado na resistência insulínica. Posteriormente se observou que, assim como nos ratos, o TNF- α é superproduzido no tecido adiposo e muscular de humanos obesos, sendo uma característica importante da obesidade (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1993; SAGHIZADEH *et al.*, 1996).

As características da inflamação induzida pela obesidade envolvem a elevada expressão, produção e circulação de moléculas pró-inflamatórias produzidas pelo tecido adiposo incluindo, proteínas da fase aguda (Proteína C Reativa (PCR), haptogloblina), fatores pró-coagulantes, citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6, IL-1 β), quimiocinas, lipídios, e a ativação das vias sinalizadoras pró-inflamatórias. Adicionalmente ocorre decréscimo na expressão de adiponectinas anti-inflamatórias (DAS, 2001; BULLÓ *et al.*, 2003; KHOVIDHUNKIT *et al.*, 2004; WELLEN E HOTAMSLIGIL, 2005).

Por esse motivo, atualmente se entende que a obesidade representa um processo inflamatório crônico de baixo grau, potencialmente implicado ao um

¹ sem tradução formal e consensual para a Língua Portuguesa

aumento na susceptibilidade a infecções, doenças autoimune e no desenvolvimento de doenças crônicas com destaque a infertilidade, a aterosclerose, a esteatose hepática, ao Diabetes *mellitus* tipo 2, e alguns tipos de neoplasias (BERG E SCHERER, 2005; RECH *et al.*, 2007).

Assim, diversos estudos têm demonstrado que a inflamação crônica é a característica central da obesidade e de sua associação com o conjunto de doenças metabólicas. Mas esta resposta inflamatória é distinta, e parece responder a estímulos intrínsecos e não se assemelha ao paradigma inflamatório clássico do sistema imune inato que ocorre na presença de patógenos. Por esse motivo, novos nomes tem sido sugeridos para esse fenômeno como sendo uma “meta-inflamação” ou “para-inflamação” (HOTAMISLIGIL, 2010).

1.2.4 Obesidade e Estresse Oxidativo

Evidências têm sugerido que a obesidade não é só caracterizada por uma condição inflamatória crônica subclínica, associada com disfunção do sistema imune, mas também por ser uma alteração que leva a um estado de estresse oxidativo crônico (COTTAM *et al.*, 2003; UZUN *et al.*, 2004).

O metabolismo inflamatório e oxidativo estão intimamente relacionados. Nesta situação a produção de EROs têm um importante papel na modulação das reações inflamatórias. As principais EROs, produzidas dentro da célula, são o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^{\bullet}).

Entretanto, o desequilíbrio entre a produção de EROs e de antioxidantes do corpo resulta no estresse oxidativo (SALVEMINI *et al.*, 2003).

Os processos de inflamação crônica são, portanto, fontes de estresse oxidativo continuado. Essa condição, por sua vez está implicada no estabelecimento de diversos distúrbios e morbidades, como é o caso da aterosclerose. É importante salientar que o contrário também é correto: o aumento dos níveis de EROs pode levar a um aumento na resposta inflamatória, já que ativa fatores de transcrição como o NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) que induzem a expressão de genes associados ao sistema imune inato como os das citocinas e outras moléculas (LAVROSKY *et al.*, 2000; HIGDON E FREI, 2003; LIN *et al.*, 2005). Existe três grandes fontes de excesso de EROs na obesidade: a família das NADPH oxidase (NOX) (FURUKAWA *et al.*, 2004), o retículo endoplasmático (RE) (GREGOR E HOTAMISLIGIL, 2007), e a mitocôndria (NISHIKAWA *et al.*, 2000).

Estudo com cultura de adipócitos mostrou que, os níveis elevados de ácidos graxos aumentam o estresse oxidativo via ativação da NOX causando uma produção desregulada de adipocinas como a IL-1 β , IL-6, PAI-1 e MCP-1, sugerindo assim, que o tecido adiposo seja a maior fonte de EROs encontradas no plasma sanguíneo (FURUKAWA *et al.*, 2004).

Outros estudos demonstraram que a inflamação crônica do tecido adiposo e, o recrutamento de células imunes para o local da inflamação, sobrecarrega a capacidade funcional do RE ativando as vias sinalizadoras da resposta inflamatória JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) e IKK (*I κ B kinase*). O aumento do metabolismo da glicose também causa uma produção aumentada de EROs pela mitocôndria o que também contribui para o desenvolvimento do estado oxidativo-inflamatório crônico

presente na obesidade (LIN *et al.*, 2005; NISHIMURA *et al.*, 2009, HOTAMISLIGIL, 2010). Por esse motivo, o evento inflamatório persistente na obesidade torna-se fator perpetuante do estresse oxidativo e vice-versa (HIGDON E FREI, 2003). Os níveis de glicocorticóides, também, aumentam no estado de estresse oxidativo. Esse hormônio é necessário para o desenvolvimento e diferenciação dos pré-adipócitos em adipócitos maduros (PURNELL *et al.*, 2009).

A capacidade antioxidante dos adipócitos está restringida, uma vez que o seu citosol é bastante escasso. Independente dos níveis iniciais, algumas das reservas antioxidantes dessas células podem estar diminuídas em indivíduos obesos. De fato, estudos mostraram que os níveis de superóxido dismutase, glutatona peroxidase e catalase estão sensivelmente mais baixos em obesos do que em indivíduos não obesos (FURUKAWA *et al.*, 2004). Por essa razão, os adipócitos em obesos podem estar expostos a uma carga maior de oxidantes que outras células (NATHAN, 2008). Investigações sobre o potencial papel de genes relacionados ao metabolismo antioxidante endógeno e a obesidade já foram previamente conduzidos sugerindo que, o estresse oxidativo sistêmico geneticamente determinado também pode criar uma maior suscetibilidade do organismo à obesidade. Este é o caso de investigações que observaram associação positiva entre que o polimorfismo Ala16Val do gene da superóxido dismutase dependente de manganês (SOD2) com a obesidade (MONTANO *et al.*, 2009), a hipercolesterolemia e biomarcadores oxidativos (DUARTE *et al.*, 2010).

Assim, o estresse oxidativo é um importante mecanismo patogênico relacionado ao desenvolvimento e manutenção da obesidade e da síndrome metabólica (FURUKAWA *et al.*, 2004), possuindo um papel crítico na patogênese

de várias doenças como a hipertensão (ROSS *et al.*, 2002), a aterosclerose, (FAIN *et al.*, 2003) e a resistência a insulina (FURUKAWA *et al.*, 2004).

1.2.5 Lipotoxicidade

A lipotoxicidade ou o estado lipotóxico é definido como aquele em que ocorre a toxicidade celular quando existe a presença e o acúmulo alterado na quantidade de gordura na matriz extracelular dos tecidos e no plasma sanguíneo. Com base nessa definição é que emergiu a chamada teoria da lipotoxicidade (DE FRONZO *et al.*, 2004). Essa teoria preconiza que os lipídios armazenados em gotículas sob a forma de triglicerídeos nas células são biologicamente inertes. Porém, quando a capacidade de armazenamento do tecido adiposo excede, o corpo é continuamente exposto a ácidos graxos que promovem a deposição de gordura ectópica e a lipotoxicidade em muitos tecidos, especialmente no músculo, fígado e células pancreáticas (WEINBERG *et al.*, 2006).

Desse modo, o tecido adiposo protege os demais tecidos e órgãos corporais, que possuem uma capacidade limitada de armazenar triacilglicerol, do potencial tóxico relacionado ao acúmulo excessivo de lipídios e da entrada dessas moléculas, nas vias metabólicas não oxidativas (UNGER *et al.*, 1999). Em princípio, a geração de novas células adiposas pode atenuar o quadro de lipotoxicidade, através do aumento da quantidade de células do tecido adiposo que assim, não possuirão um acúmulo exacerbado de gordura (QUEIRÓZ *et al.*, 2009).

Entretanto, a obesidade aumenta à exposição crônica do organismo a moléculas lipídicas resultando em disfunção celular que inclui alterações bioquímicas e citofisiológicas previamente comentadas como o aumento no estresse oxidativo, indução a apoptose e a inflamação crônica (VIRTUE E VIDAL-PUIG, 2010). Estudos mostraram que o aumento de ácidos graxos livres causa disfunção e morte das células beta-pancreáticas (LEE *et al.*, 1994), e acúmulo de lipídio intracelular mediado pela beta-oxidação defectiva associado a resistência a leptina (SHIMABUKURO *et al.*, 1997b).

Além dos efeitos tóxicos relacionados aos ácidos graxos, o tecido adiposo produz outras moléculas lipotóxicas que podem ter efeitos pleiotrópicos no desenvolvimento das disfunções metabólicas e morbidades associadas à obesidade, tais como, o Diabetes tipo 2 e a aterosclerose. Entre esses destacam-se as EROs (BORRADAILE *et al.*, 2006), o óxido nítrico (SHIMABUKURO *et al.*, 1997a), as ceramidas (TURPIN *et al.*, 2006), a fosfatidilinositol-3-quinase, os ligantes dos receptores nucleares PPAR (FINCK *et al.*, 2002), a leptina (SHIMABUKURO *et al.*, 1997b), outras adipocinas (DELAIGLE *et al.*, 2006) e as citocinas pró-inflamatórias (SHI *et al.*, 2006).

1.2.6 Obesidade e Aterogênese

Evidências epidemiológicas acumuladas nestas últimas cinco décadas mostram que, a obesidade é fator de risco para doenças cardiovasculares uma vez que contribui para o desenvolvimento da aterosclerose nos vasos sanguíneos

(aterogênese). Isso ocorre porque a obesidade e os seus efeitos lipotóxicos contribuem fortemente para o aumento dos níveis circulantes de lipídios no plasma sanguíneo, incluindo o colesterol LDL que é um elemento importante na fase inicial da aterogênese (HOVOELT *et al.*, 2008).

Goodpaster & colaboradores (2005) demonstraram que a obesidade visceral, associada com o nível elevado de LDL-ox, está relacionado com o alto risco de síndrome metabólica, e que esse último exacerba a LDL-ox num mecanismo de retroalimentação

Uma das principais consequências no aumento dos níveis de LDL-ox é o desencadeamento da aterogênese. O início da aterogênese é caracterizado pelo acúmulo focal de macrófagos no espaço subendotelial (tecido conjuntivo) localizada entre o endotélio e a camada muscular lisa dos vasos sanguíneos. Os macrófagos, nesse local, ao fagocitarem resíduos de LDL-ox e colesterol morrem permanecendo sob a forma conhecida como “células espumosas”. Essas células representam a alteração morfológica mais precoce da aterosclerose que, posteriormente, evoluirá formando a placa aterosclerótica. Um dos principais fatores que desencadeia a formação das células espumosas é a lipoproteína LDL. Essa molécula é considerada como uma quimioatratadora que induz a migração de monócitos, e o amadurecimento destas células em macrófagos que fagocitam tal molécula (HOLVOET E COLLEN, 1994).

Estudos como o de Simionescu & Simionescu (1988) demonstraram, através da marcação de partículas de LDL com ouro radioativo, carbono-14C e $^{125}\text{I}\beta\text{-VLDL}$ que o processo de formação das células espumosas na camada subendotelial envolve uma série de eventos complexos a seguir sintetizados: o LDL plasmático circulante inicialmente se liga à membrana das células endoteliais que circundam o

interior do vaso sanguíneo formando invaginações (“coated pits”²) onde se localizam receptores específicos da apolipoproteína B 100 (Apo B100). Tais invaginações se transformam em vesícula de endocitose que carregam o LDL para o interior da célula endotelial. Uma vez dentro do endotélio, as partículas de LDL são englobadas em lisossomas e hidrolisadas em fosfolípidios, triglicérides, proteínas, colesterol. Já os receptores específicos da Apo B100 são reciclados até a superfície da membrana celular. O colesterol livre é utilizado na formação e recomposição da membrana celular ou armazenado sob a forma de ésteres de colesterol (SIMIONESCU E SIMIONESCU, 1988).

Entretanto, quando ocorre aumento na concentração do LDL no interior das células endoteliais, essa condição induz a um maior consumo do óxido nítrico. Esse óxido nítrico excedente tem alta afinidade química por EROs, em especial o radical anion superóxido, e acentua a produção de radicais livres com o peróxido nitrito. Por sua vez, o aumento na quantidade destes radicais livres aumenta a lipoperoxidação das membranas e a oxidação do LDL levando, assim, a um estado de disfunção endotelial. Tal condição permite maior influxo do LDL-ox à região subendotelial que, por sua vez, atrai os macrófagos (PACHER et al., 2007).

O processo de formação de células espumosas pode ser acelerado se parte do LDL plasmático estiver oxidado. Isso porque, o LDL-ox, diferente do LDL nativo, consegue atravessar as células endoteliais sem necessidade de receptores específicos e migrar para a camada subendotelial, atrair os macrófagos desencadeando a fagocitose (SCHENKE E CAREW, 1989). Por isso, o LDL-ox

² sem tradução formal e consensual para a Língua Portuguesa

plasmático ou produzido no interior das células endoteliais é considerado um elemento importante no processo aterogênico.

Além do papel do LDL-ox na aterogênese, essa molécula também atua diretamente no tecido adiposo. O LDL-ox ativa os macrófagos a liberar citocinas pró-inflamatória circulantes, como a IL-1 β que, no tecido adiposo de pessoas obesas está aumentada (REILLY *et al.*, 2005; CIPOLLETA *et al.*, 2005). O LDL-ox, reduz a produção de adiponectina, que diferente de outras adipocinas, em indivíduos obesos está reduzida e tem função anti-inflamatória e antioxidante pois diminui o excesso de produção de EROs (OUEDRAOGO *et al.*, 2006).

Hovoelt e colaboradores (2008) demonstraram que a hiperinsulinemia e o controle glicêmico comprometidos, independente dos níveis de lipídeos, estão associados *in vivo* com a oxidação do LDL. Por outro lado, os altos níveis de LDL-ox, assim como a IL-1 β , reduzem a sinalização da insulina e entrada de glicose, causando a morte das ilhotas de células beta no pâncreas (MADDUX *et al.*, 2001; NAZIÈRE *et al.*, 2004). Logo, a LDL-ox pode contribuir para o desenvolvimento da obesidade e para o aparecimento da resistência a insulina, através da redução da massa do tecido adiposo sensível a insulina (MASELLA *et al.*, 2006).

O LDL-ox também retroalimenta alterações metabólicas associadas à obesidade intensificando seus efeitos negativos. Essa molécula aumenta a produção de triglicérides pela indução e expressão da lipoproteína lipase (LPL) (STENGEL *et al.*, 1998) e acúmulo de ácidos graxos nos adipócitos (MERKEL *et al.*, 2002). Os ácidos graxos acumulados induzem a produção de níveis elevados de ceramidas, que contribuem para a manutenção do processo de inflamação e lipotoxicidade (TURPIN *et al.*, 2006)

Esta retroalimentação pode estar na base dos processos que desencadeiam a síndrome metabólica, identificada quando o indivíduo apresenta pelo menos três de quatro alterações metabólicas (circunferência abdominal ≥ 88 cm nas mulheres, ≥ 102 cm nos homens; níveis de triglicerídeos plasmáticos ≥ 150 mg/dL, níveis de HDL-colesterol ≤ 45 mg/mL, pressão arterial sistêmica ≥ 140 mmHg) (OMS, 2007).

Deste modo a relação obesidade e LDL-ox pode ser considerada como um elemento importante no desencadeamento de alterações bioquímicas e fisiológicas que predispõe ao desenvolvimento de outras disfunções e morbidades.

1.3 Genética da Obesidade

1.3.1 Herdabilidade

Estudos sobre os fatores causais da obesidade reforçaram a ideia, que tal morbidade tem origem multicausal ocorrendo através da interação gene – ambiente. Em termos genéticos, a obesidade parece estar associada a variações existentes em mais de 250 genes, entre os quais existem polimorfismos genéticos relacionados ao sistema imune (RANKINEN *et al.*, 2005) e ao metabolismo oxidativo (MONTANO *et al.*, 2009; DUARTE *et al.*, 2010).

Investigações realizadas nestes últimos 30 anos em gêmeos monozigóticos e dizigóticos têm estimado uma contribuição genética na obesidade com uma herdabilidade que varia entre 6% a 85%. Investigações feitas a partir de estudos

familiares estimam que a influência genética da obesidade seja em torno de 40 a 60% (LOOS, 2009). Aproximadamente 426 genes foram estudados tendo sido 127 associados com a obesidade (SOOKOIAN E PIROLA, 2007). Existem outros genes que estão relacionados não só a uma maior suscetibilidade a obesidade, mas também a maior risco de outras doenças cardiometabólicas como hipertensão, Diabetes e dislipidemia (HJELMBORG, 2008; FRISARD E RAVUSSIN, 2006; PICCOLI *et al.*, 2008; GOTTLIEB *et al.*, 2009; MONTANO *et al.*, 2009).

1.3.2 Genética da obesidade e inflamação

Uma vez que a obesidade é um traço complexo e envolve uma série de alterações biológicas, os mecanismos pelo qual vários polimorfismos genéticos podem influenciar a obesogenese ainda não estão totalmente elucidados.

No caso, as variações genéticas nas vias que modulam a extensão da inflamação podem definir o risco dos indivíduos para o desenvolvimento de complicações metabólicas da obesidade (WELLEN E HOTAMISLIGIL, 2005).

Estudos da expressão gênica em nível transcricional têm revelado que os genes relacionados à resposta inflamatória e ao estresse oxidativo são diferencialmente regulados no tecido adiposo de animais obesos (SOUKAS *et al.*, 2000; XU *et al.*, 2003).

Wiesberg e colaboradores (2003) caracterizaram o perfil da expressão gênica relacionados à obesidade, e observaram a expressão de 1304 genes relacionados à massa corporal. Dos 100 genes com maior associação, 30% codificavam proteínas

características de macrófagos incluindo citocinas inflamatórias. Estudo conduzido por Wolfs e colaboradores (2010), também identificou a expressão de genes relacionados ao metabolismo lipídico e glicêmico na obesidade. Alguns desses genes do tecido adiposo subcutâneo mostraram correlação com os níveis plasmáticos do colesterol HDL. Esses autores também identificaram a expressão de genes relacionados ao sistema imune inflamatório.

Com base nessas evidências, estudos genéticos no qual foi avaliada a associação de alteração de genes do sistema imune com a obesidade passaram a ser conduzidos. Tais estudos envolveram principalmente os genes das citocinas IL-6 (POPKO *et al.*, 2010) e IL-10 (TSILIDI *et al.*, 2010), do receptor alfa da IL-15 (DE RENZO *et al.*, 2009) e do receptor antagonista da IL-1 β (IL-1RN) (ANDERSSON *et al.*, 2009). Já, a análise da associação entre polimorfismos do gene da IL-1B com a obesidade são ainda bastante incipientes apesar da importância da IL-1 β nos processos inflamatórios.

1.3.3 Interleucina 1 β : estrutura, função e contribuição na obesidade

A interleucina 1 β pertence à família Interleucina 1 (IL-1) é constituída por um grupo de proteínas que possuem respostas imunológicas biológicas sinérgicas ou antagônicas. As moléculas pertencentes a essa família de proteína são chave na mediação e amplificação da resposta inflamatória. As mesmas apresentam inúmeras funções relacionadas aos mecanismos de defesa imune, contribuindo

adicionalmente à regulação da interface do sistema imune com o sistema neuroendócrino (DINARELLO,1996,1998).

A família IL-1 é composta por três polipeptídios: IL-1 α , IL-1 β e IL-1ra que são produzidos por uma variedade de células, como os monócitos, macrófagos, células epiteliais, endoteliais e células da glia (TOCCI E SCHIMIDT,1997). Estes polipeptídios possuem atividade nos processos inflamatórios. No caso, a atividade pró-inflamatória é realizada pelas citocinas IL-1 α e IL-1 β . Estas duas formas mostram menos de 30% de homologia estrutural, porém as duas são agonistas e se ligam ao mesmo receptor de superfície e suas atividades biológicas são essencialmente as mesmas (ABBAS *et al.*, 1998). A principal diferença entre essas duas moléculas diz respeito a sua localização. A IL-1 α parece se concentrar na membrana celular, enquanto a IL-1 β é secretada para o meio extracelular e parece ser a principal molécula responsável pelas atividades pró-inflamatórias da família IL-1 (DINARELLO, 1988). Há dois tipos de receptores de membrana para a IL-1. O receptor do tipo I (IL-1RI) que é um transdutor de sinal, e o receptor tipo II (IL-1RII) que se liga a IL-1, mas não faz a transdução do sinal, principalmente para IL-1 β , por esse motivo é chamado de receptor “isca” (DINARELLO, 1996; GIRN *et al.*, 2007).

O terceiro polipeptídio denominado antagonista do receptor da IL-1 (IL-1ra) funciona como um inibidor competitivo, pois se liga aos receptores da IL-1 inibindo sua atividade biológica. Assim considera-se que a IL-1ra tenha atividade anti-inflamatória (ABBAS *et al.*, 1998).

As citocinas pertencentes à família da IL-1 foram uma das primeiras a serem identificadas a processos inflamatórios que estavam relacionados com distúrbios metabólicos que ocorrem na obesidade e na aterosclerose. Tais moléculas foram relacionadas à inflamação que ocorre na aterogênese. O papel das IL-1 nos

distúrbios metabólicos advém do fato de seus componentes pró-inflamatórios (IL-1 α e IL-1 β) agirem como facilitadores na formação de lesões ateroscleróticas precoces, uma vez que possuem efeito no recrutamento e transmigração dos macrófagos à camada subendotelial dos vasos sanguíneos, auxiliando assim na criação e manutenção do ambiente pró-inflamatório neste local (LIBBY *et al.*, 1995).

Como a obesidade gera uma condição de inflamação crônica, caracterizada pela produção de citocinas inflamatórias pelos adipócitos e macrófagos do tecido adiposo, há indicações da ocorrência de interação entre o sistema IL-1 e o metabolismo da gordura do tecido adiposo. No caso as citocinas pró-inflamatórias da família IL-1 podem estimular o crescimento da massa de gordura corporal (GARCIA *et al.*, 2006). Por outro lado, o aumento na massa do tecido adiposo também parece contribuir diretamente para o aumento da inflamação sistêmica gerando um circuito de retroalimentação positiva (BERG E SCHERER, 2005).

Entre as citocinas pró-inflamatórias, a IL-1 β tem papel destacado no processo inflamatório e na modulação de outras funções orgânicas. Essa molécula tem ação pleiotrópica, uma vez que, além de agir na resposta inflamatória, tem ação em diferentes contextos metabólicos como o crescimento celular e reparo de tecidos lesados como o córtex cerebral (NICKLIN *et al.*, 1994). Em condições fisiológicas, os macrófagos são a primeira fonte de produção da IL-1 β . Entretanto, esta citocina pode ser secretada por muitos outros tipos celulares, incluindo, adipócitos, monócitos, células endoteliais, fibroblastos, neurônios, microglia e células beta pancreáticas (TRAYHURN, 2005).

A IL-1 β é considerada uma citocina pró-inflamatória com importância central na iniciação e manutenção das respostas inflamatórias agudas (SIM, 1993). Além de atuar como mediadora local, a IL-1 β pode apresentar efeitos inflamatórios sistêmicos

(DINARELLO,1988). No sítio da inflamação atua sobre os macrófagos aumentando ainda mais a produção de IL-1(ABBAS *et al.*, 1998).

A IL-1 β é responsável por sinalizar a invasão de microorganismos agressores e estimular a resposta que favoreça a sua eliminação. Assim, a sua produção pode ser induzida pela exposição do corpo a quase todos os microorganismos e produtos microbianos (DINARELLO, 1998). A indução da expressão da IL-1 β é rigidamente controlada e regulada em dois níveis. A primeira regulação ocorre em nível transcricional. Assim, diversas moléculas podem induzir ou inibir a expressão do gene IL-1B. Entre as principais moléculas indutoras estão os receptores TRL (*Toll-like receptors*). O segundo nível de regulação é pós-transcricional, nesse nível a Caspase-1 cliva a Pró-IL-1 β formando a IL-1 β madura (SUTTERWALA *et al.*, 2006). Essas duas formas de regulação garantem que o organismo consiga dispor rapidamente da IL-1 β , quando necessário. As disfunções nestes padrões regulatórios podem causar profundas alterações metabólicas indesejáveis ou morbidades.

Atualmente, doenças atribuídas à disfunção da caspase-1 que leva ao aumento na secreção da IL-1 β pelos monócitos são denominadas de doenças auto-inflamatórias. Este é o caso de morbidades como a gota, a insuficiência cardíaca e o mieloma múltiplo assintomático. Estudos em que foi feito o bloqueio químico da IL-1 β mostraram uma redução rápida na severidade da maioria destas doenças auto-inflamatórias (revisão em DINARELLO, 2011).

Assim, sabe-se que, quando os seus níveis estão continuamente elevados, independente da exposição a antígenos exógenos, a IL-1 β contribui para o desenvolvimento e manutenção de estados patológicos incluindo alterações relacionadas ao metabolismo dos lipídios. Matsuki e colaboradores (2003) sugeriram

que a IL-1 β modula diretamente o metabolismo dos lipídios, sob condições fisiológicas. Esta modulação parece ocorrer via regulação da insulina e da atividade da enzima lipase. Resultados obtidos a partir de estudos *in vitro* mostraram que a IL-1 β pode alterar a síntese dos ácidos graxos e os níveis de acetil-CoA carboxilase. Além disso, esta citocina pode estimular a diferenciação dos adipócitos, que é um processo chave na obesogenese (DOERRLER *et al.*, 1994; GREGOIRE *et al.*, 1998). Além do mais, a IL-1 β participa na homeostase da energia periférica afetando o metabolismo dos carboidratos, uma vez que participa na modulação da regulação da síntese de glicogênio estimulada pela insulina (KANEMAKI *et al.*, 1998).

A indução na expressão e síntese da IL-1 β também é mediada pela presença de outras moléculas endógenas relacionadas aos processos inflamatórios. Este é o caso da PCR, fatores de coagulação, ácido retinóico, TNF- α , outras citocinas e também pela LDL-ox que está elevado nos estados de hiperlipidemia (DINARELLO, 1998).

Essas evidências prévias reforçam a ideia de que a IL-1 β é uma molécula lipotóxica já que é cronicamente produzida em distúrbios relacionados a inflamação crônica como é o caso da obesidade e da aterosclerose. Tal ideia baseia-se em estudos que demonstraram que a sua síntese continuada da IL-1 β diminui o transporte intracelular de glicose que normalmente é induzido pela insulina. Essa diminuição na captação intracelular da glicose auxilia na produção de um estado de resistência insulínica nos adipócitos e em outras células corporais (MADDUX *et al.*, 2001; KANEMAKI *et al.*, 2007; JAGER *et al.*, 2007).

Por sua vez, a resistência à insulina desencadeada através deste processo pode suprimir a atividade da enzima LPL (lipase lipoproteica) impedindo o catabolismo das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL). O acúmulo

hepático de VLDL contribui para o aumento e manutenção do estado de lipotoxicidade (PERSSON *et al.*, 2006). Também a produção e ação continuada da IL-1 β pode induzir o acúmulo de lipídios não só no fígado, mas nos músculos (JAGER *et al.*, 2007).

Com base nessas evidências, acredita-se que a IL-1 β contribui para a alteração dos níveis de lipídios circulantes e teciduais conferindo a esta molécula o status de “molécula indutora de lipotoxicidade”. Além de contribuir para o aumento dos lipídios circulantes e da hiperglicemia a IL-1 β também está relacionada à indução de processos que desencadeiam a apoptose celular dos adipócitos o que levam a maior liberação de lipídios, principalmente ácidos graxos livres.

Um estudo *in vitro* recente, conduzido por Nov e colaboradores (2010) observaram que hepatócitos de ratos tratados com moléculas de TNF- α obtidas a partir de adipócitos de ratos obesos apresentaram níveis dez vezes mais elevados de IL-1 β do que células não tratadas. Além do aumento nos níveis de IL-1 β os autores também observaram a ocorrência de indução de resistência à insulina nos hepatócitos tratados. A fim de comprovar a influência da IL-1 β nesse processo, o estudo realizou um tratamento adicional em que as células receberam solução com maior concentração da citocina anti-inflamatória 1L-1ra. Na presença desta citocina as células não desenvolveram resistência à insulina. Deste modo, o estudo corroborou fortemente que a IL-1 β é uma importante molécula na indução de disfunções metabólicas relacionadas à obesidade como a resistência à insulina.

Como níveis mais elevados e contínuos de IL-1 β podem alterar o metabolismo glicêmico e lipídico, muitos autores sugerem que essa molécula é capaz de induzir um estado que eles denominam de “glicolipotoxicidade” (POITOUT E ROBERTSON, 2008; GABRIANO E STURLEY, 2009).

1.3.4 Genética da Interleucina 1 β

No nível molecular, os polipeptídios da família IL-1 são sintetizados a partir de três genes, o IL-1A, IL-1B e o IL-1RA que produzem as citocinas IL-1 α , IL-1 β e IL-1ra, respectivamente. Esses genes estão localizados no braço longo do cromossomo 2 (2q14) agrupados em um *cluster* de 430kb (MOLVIG *et al.*, 1988; ENDRES *et al.*, 1989).

Estruturalmente, o gene da IL-1B é constituído por um fragmento de 1498pb, organizado em sete exons e seis introns. Os exons codificam uma proteína precursora da interleucina que possui 269 aminoácidos (31KDa) (CULLUP *et al.*, 2001). Esta proteína sintetizada no retículo endoplasmático rugoso é denominada pró-IL-1 β . Ela é uma proteína inativa que permanece armazenada dentro do citosol celular até ser clivada pela enzima Caspase-1 (ou Enzima Conversora de IL-1 β - ICE). A indução na formação da IL-1 β madura ocorre via ativação de um complexo multiproteico denominado inflamassoma NALP3 (OGURA *et al.*, 2006; ARULKUMARAN *et al.*, 2011).

O estímulo à produção da IL-1 β madura irá ocorrer pela ação de proteases presentes no citosol. A caspase-1 é crucial para o processamento intracelular da pró-IL-1 β , embora a pró-IL-1 β extracelular possa ser processada por outras proteases diferentes durante a inflamação (THORNBERRY *et al.*, 1992). A clivagem da pró-IL-1 β gera três segmentos proteicos: dois fragmentos pró-forma (um com 89 aminoácidos e outro com 116 aminoácidos) que aparentemente não têm atividade biológica e a forma madura da IL-1 β . A IL-1 β madura possui 153 aminoácidos formando uma proteína com 17kDa. Embora os fragmentos pró-formas não tenham

atividade biológica, eles parecem ter um efeito regulatório entre a pró-IL-1 β e a IL-1 β madura (HIGGINS *et al.*, 1994; KOBAYASHI *et al.*, 1997). A IL-1 β e a IL-1 α são liberadas para o meio extracelular via exocitose onde pequenas vesículas contendo essa citocina são formadas e liberadas ou via ativação do receptor P2X7R sensível a ATP (HAMON *et al.*, 1997, MACKENZIE *et al.*, 2001; DINARELLO, 2007).

Os genes da família IL-1 são conhecidos por exibirem variações genéticas denominadas polimorfismos. Os polimorfismos genéticos são alterações nas sequências de pares de bases de um dado gene, que geram formas variantes deste denominadas alelos. As variações genéticas cuja frequência na população é menor que 1% são denominadas mutações. Entretanto, aquelas variações genéticas que são mais prevalentes, ou seja, aparecem acima de 1% em uma dada população são chamadas de polimorfismos genéticos. Evidências mostram que tanto o gene da IL-1 α quanto o da IL-1 β apresentam polimorfismos genéticos que criam diferenças interindividuais estáveis relacionadas à maior ou menor produção de interleucina-1 (MOLVIG *et al.*, 1988; ENDRES *et al.*, 1989).

No gene da IL-1B há três polimorfismos SNPs dialélicos relacionados a mudanças de única base nitrogenada que levam a substituição de uma citosina por uma timina (C<T) são conhecidos. Os dois primeiros polimorfismos ocorrem nos nucleotídeos -511 e -31 localizados na região promotora, e o terceiro polimorfismo no nucleotídeo +3953, está localizado no exon V. Muitas vezes esse polimorfismo também é chamado de +3954, já que alguns autores consideram a sequência nucleotídica a partir do sítio de iniciação de transcrição (POCIOT *et al.*, 1992; SANTILLA *et al.*, 1998).

Investigações prévias mostraram que esses polimorfismos estão associados com as variações na produção e secreção de IL-1 β (CULLUP *et al.*, 2001). Estudos

adicionais também descreveram associação desses polimorfismos com disfunções e morbidades relacionadas ao metabolismo inflamatório com destaque à periodontite, ao câncer de estômago relacionado à infecção crônica por *Helicobacter pillori* e doenças cardiovasculares (FARSHAD *et al.*, 2010; ZEYBEK *et al.*, 2011).

Especificamente, o polimorfismo do IL-1B (+3953) apresenta dois alelos T e C, que dão origem a três genótipos: CC, TT e TC. Investigações *in vitro* observaram que o alelo T do IL-1B (+3953) está associado a um aumento de duas à quatro vezes maior na produção da IL-1 β , quando comparado com o alelo C (KORNMAN, 1997; POCIOT *et al.*, 1999). Essa diferença na produção de IL-1 β pelo polimorfismo IL-1B (+3953) tem sido associada a um maior risco de doenças autoimune e também auto-inflamatórias, como a artrite reumatóide bem como ao aumento dos parâmetros séricos inflamatórios, mas também com a redução de risco de algumas infecções (POCIOT *et al.*, 1992; PARKHILL *et al.*, 2000; TAKAMATSU *et al.*, 2000; BUCHS *et al.*, 2001; LATKOVKIS *et al.*, 2004).

Investigações epidemiológicas mostraram que o alelo T polimorfismo IL-1B (+3953) apresenta uma baixa frequência populacional, portanto é considerado o alelo mais raro. Ao contrário, o alelo C que apresenta uma alta frequência nas populações caucasianas (SUZUKI *et al.*, 2009). Nos poloneses as frequências genotípicas são CC=56,4%; CT=36,8%; TT=6,8%) (EL-OMAR *et al.*, 2000), nos finlandeses são CC= 51,5%; CT= 41%; TT= 7,5% (HULKKONEN *et al.*, 2000). Já em populações asiáticas como os japoneses a frequência do alelo T tende a zero (CC=92,2%; CT= 7,8%; TT= 0,0%) (TKAMATSYU *et al.*, 2000).

Estudos prévios observaram associação do polimorfismo IL1B (+3953) com a massa gorda e o IMC corporal. Entretanto, essa associação não deixou de ser surpreendente, pois Lee e colaboradores (2008) encontraram a frequência do alelo T

diminuída em mulheres com sobrepeso/obeso. Strandberg e colaboradores (2006, 2008) também descreveram uma associação entre aumento da massa gorda em homens jovens e idosos e menor frequência do alelo T.

Portanto, pode se dizer, que os estudos que relacionam o polimorfismo IL1B (+3953) com a obesidade e indicadores de lipotoxicidade são ainda bastante incipientes. Assim, investigações adicionais poderiam auxiliar na elucidação do papel da IL-1 β como molécula obesogênica e lipotóxica através da avaliação de análises genéticas e bioquímicas integradas. Este é o caso deste estudo da associação entre o polimorfismo IL1B (+3953) e a prevalência da obesidade e do estudo da influência do polimorfismo IL1B (+3953) em níveis plasmáticos alterados de indicadores de glicolipotoxicidade (glicose, o perfil lipídico e o LDL-oxidado).

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Analisar a associação entre o polimorfismo +3953 do gene da IL-1B com a obesidade, e sua influência em indicadores de glicolipotoxicidade com destaque aos níveis glicêmicos, lipídicos e de LDL-ox.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar a associação entre a obesidade e o polimorfismo +3953 do gene IL-1B avaliando a potencial influência do gênero e da idade;
- Analisar a associação entre o polimorfismo +3953 da Interleucina-1B e alterações na modulação da glicemia e do perfil lipídico e a influência da obesidade, gênero e idade;
- Analisar a associação entre o polimorfismo +3953 da Interleucina-1B e alterações na modulação dos níveis plasmáticos de LDL oxidado e a influência da obesidade, gênero e idade.

A metodologia desenvolvida e os resultados obtidos neste estudos serão apresentados na forma de artigos.

3 ARTIGO 1

Association between inteleukin-1beta polymorphism (+3953) and obesity

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

Molecular and Cellular Endocrinology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/mce

Association between interleukin-1 beta polymorphism (+3953) and obesity

M.F. Manica-Cattani^a, L. Bittencourt^a, M.I.U. Rocha^b, T.D. Algarve^b, L.C. Bodanese^c, R. Rech^c,
M.M. Machado^a, G.F.F. Santos^a, M.G.V. Gottlieb^c, C.H.A. Schwanke^d,
J.E.C. Piccoli^b, M.F.F. Duarte^a, I.B.M. Cruz^{a,b,e,*}

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica Toxicológica), Universidade Federal de Santa Maria, Brazil

^b Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil

^c Serviço de Cardiologia, Hospital São Lucas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brazil

^d Instituto de Geriatria e Gerontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brazil

^e Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 April 2009

Received in revised form 30 July 2009

Accepted 31 July 2009

Keywords:

Interleukin-1 beta

IL-1 β +3953C/T polymorphism

Obesity

Body mass index

ABSTRACT

It now appears that obesity is associated with a low-grade inflammation of white adipose tissue resulting from chronic activation of the innate immune system as interleukin-1 beta (IL-1). Previous investigations have described a positive association between IL-1 β +3953 (C>T) gene polymorphism (rs 1143634) and obesity, suggesting functional effects on fat mass, fat metabolism and body mass. However, it is necessary to determine if these results occur in other populations and if they are influenced by sex and age. Therefore, we performed a case-control study using 880 Caucasian subjects (59.7 \pm 11.9 years old) from the Brazilian Aging Research Program (non-overweight = 283, overweight = 334, obese = 263) previously investigated in genetic studies, in whom we analyzed the IL-1 β +3953C/T polymorphism. We observed higher T allele (CT/TT) frequency in non-overweight than overweight and obese groups. The odds ratio showed 1.340 (95% CI: 1.119–1.605) times more chance of the obese group being CC carriers compared to non-overweight group independent of sex and age. This study corroborates the idea that the IL-1 system is linked to the development of obesity.

© 2009 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Obesity is a multifactorial disease and the genes controlling adipose tissue function may be of particular importance because increased fat mass is the most important feature of the obese phenotype (Aner, 2000). Adipose tissue has a key endocrine role as well as a metabolic function since it secretes several regulatory proteins such as cytokines. Cytokines, including interleukin 1 (IL-1) are regulatory agents in the homeostasis of energy and are produced not only in immunocompetent cells but also in adipocytes (Dianarello, 1996; Hotamisligil et al., 1995; Bruun et al., 2002).

In adipose tissue metabolism, cytokines are major regulators, particularly the IL-1 system which includes one of the most powerful inflammatory molecules. There are four main members of the IL-1 cytokine family: IL-1 α , IL-1 β , IL-1 receptor antagonist (IL-1ra) and IL-18. In general, the IL-1 family is considered to be pro-inflammatory and pro-atherogenic except IL-1ra which is considered an anti-inflammatory cytokine (Girn et al., 2007).

The common IL-1 β polymorphism which appears to have an influence on the IL-1 system activity has been described as a C to T single nucleotide polymorphism (SNP) at nucleotide +3953, a T to C SNP at nucleotide –31 (rs 1143634) from the transcription start, and the IL-1RN gene that contains a polymorphic region in the second introns, which has an 86-bp variable number tandem repeat (VNTR). Epidemiological investigations suggest that these polymorphisms are functional and associated to chronic diseases (Zeng et al., 2003; Machado et al., 2001; El-Omar et al., 2000; Garcia-Gonzalez et al., 2003; Zienolddiny et al., 2004; Seripa et al., 2005; Licastro et al., 2004; Oda et al., 2007).

The C to T single nucleotide polymorphism (SNP) at nucleotide +3953 from the transcription start of the IL-1 β gene seems to be functional because it has been associated with increased production of IL-1 β *in vitro*, worsened rheumatoid arthritis, enhanced inflammatory serum parameters and decreased risk of some infections (Pociot et al., 1992; Buchs et al., 2001; Latkovski et al., 2004; Parkhill et al., 2000).

Studies have investigated the possible association between these IL-1 gene polymorphisms and obesity based on experimental evidence from IL-1 knockout mice that suggested an influence on fat mass, fat metabolism and body mass and on the development of obesity (Garcia et al., 2006).

* Corresponding author at: UFSM, Av. Roraima 1000, Prédio 19, Sala 3126, Camobi, Santa Maria 97900-120, RS, Brazil. Tel.: +55 55 32208736; fax: +55 55 32208239.
E-mail address: ibmcruz@hotmail.com (I.B.M. Cruz).

Two epidemiological studies performed by the same research groups investigated if common polymorphisms of the IL-1 system, which are associated with IL-1 activity such as +3953 (C>T), were associated with fat mass in 1068 young men (Strandberg et al. (2006) and elderly men (Strandberg et al., 2008). The results showed that T variants (CT and TT) of the +3953 C to T had a significantly lower total fat mass and also significantly reduced arm, leg, and trunk fat compared with CC subjects. However, the investigation performed in 3014 elderly men by Strandberg et al. (2008) did not find an association with total fat mass. Another study that investigated the association between this polymorphism and body mass index (BMI) in 181 healthy females showed a significant decrease in the incidence of the IL-1 β +3953 polymorphism T allele in the overweight group compared with the lean group with a BMI < 25 kg/m² (Lee et al., 2008).

However, there have not been any previous investigations comparing the association between +3953 C to T IL-1 β polymorphism and obesity. Therefore, we performed a case–control study to determine if this association occurs in other populations and if sex and age have an influence.

2. Subjects and methods

The present study was conducted in subjects from the Southern Brazilian Aging Research Program which investigates genetic and environmental interactions in aging and related non-transmissible diseases. Previous studies have been published and described in more detail about this research project (Tauffer et al., 2005; Prado-Lima et al., 2006). The subjects included men and women, aged 18–92 years (59.7 \pm 11.9 years old).

As the study includes genetic variables, the samples were recruited by random selection of Brazilians of European ancestry from Rio Grande do Sul State. Additionally, we selected all overweight and non-overweight subjects without previous diseases such as heart disease, stroke, cancer, and other diseases or disorders that could influence the obese state, dietary pattern and genotype distribution. These exclusions are justified because these variables could interfere in the analyses. Therefore, out of 1058 subjects considered, a total of 880 subjects were selected and classified.

Obesity was determined as having a body mass index (BMI) over 30 kg/m², overweight with BMI \geq 25 < 30 kg/m² and control group (non-overweight) with BMI < 25 kg/m². The Research Ethics Committee approved the study protocol and informed consent was obtained from all individuals whose information was collected prospectively.

Biochemical analyses were performed on blood samples collected from subjects after an overnight fasting (12 h or more); snacks and coffee were offered afterwards. The following blood tests were performed for biochemical analysis: glucose, total cholesterol, HDL-c, LDL-c and triglycerides (TG) (Um et al., 2004a,b; Lancaster et al., 2003).

Plasma glucose, serum total cholesterol and triglycerides concentrations were measured using standard enzymatic methods using Ortho-Clinical Diagnostics[®] reagents on the fully automated analyzer (Vitros 950[®] dry chemistry system; Johnson & Johnson, Rochester, NY, USA). High-density lipoprotein cholesterol was measured in the supernatant plasma after precipitation of apolipoprotein B-containing lipoproteins with dextran sulfate and magnesium chloride as previously described (Bachorik and Albers, 1986). Low-density lipoprotein cholesterol was estimated with the Friedewald equation (1972).

Additionally, we performed an analysis if metabolic syndrome present in some subjects could be associated with IL-1B +3953 gene polymorphism. Definition of MS was that of the NCEP (Grundey et al., 2005), and a participant was deemed to have MS when three or more of the following criteria were satisfied: (1) high blood pressure: blood pressure \geq 130/85 mm Hg or known treatment for hypertension; (2) hypertriglyceridemia: fasting plasma triglycerides \geq 150 mg/dL; (3) low HDL: fasting HDL cholesterol < 40 mg/dL in men, < 50 mg/dL in women; (4) hyperglycemia: fasting glucose level of \geq 110 mg/dL or known treatment for diabetes; (5) central obesity: waist circumference >88 or >102 cm in women and men, respectively.

Genomic DNA was isolated from peripheral blood leukocytes using a GFX Genomic Blood DNA Purification (Amersham Biosciences Inc., Co.) kit. The amplification of a region from human genomic DNA in the IL-1B +3953 gene was performed using polymerase chain reaction (PCR) primers: (F) 5'-CTCAGGTGCTCTCGAAGAAATCAA-3' and (R) 5'-GTTTTTGTCTGTATCC-3'. PCR was performed in a total volume of 25 μ l containing 2.5 mM MgCl₂, 9.9 mM Tris-HCl (pH 8.8), 50 mM KCl, 0.1% Triton-X 100, 0.20 μ M deoxyribonucleotide triphosphate (dNTPs), 1 U Taq DNA polymerase, and 0.2 μ M of each primer. PCR conditions comprised an initial denaturation at 96 °C for 1 min followed by 30 cycles at 94 °C for 1 min, 60 °C for 1 min, and 70 °C for 1 min, with a final extension at 72 °C for 10 min. The final PCR products were digested with 10 U TaqI at 65 °C overnight. Digested products were visualized on a

6% agarose gel (Amersham Biosciences Inc., Co.) stained with ethidium bromide.

Data analysis was performed with SPSS (version 13.0.1; SPSS Inc., Chicago, IL). Existence of Hardy–Weinberg equilibrium was tested by χ^2 analysis. Because the T variant of the IL-1 β +3953 polymorphism has been reported to be dominant, we primarily pooled the CT and TT individuals for investigation of obesity, as done by several others (Buchs et al., 2001; Latkovski et al., 2004; Parkhill et al., 2000). Moreover, the TT genotype constituted only 6.5% of the population in the present study. A potential dose effect of the T allele was then investigated by comparing the CC and TT genotypes and obesity. Logistic regression (*Backward stepwise Wald method*) was used to investigate possible sex and age influence on the results. An age of 60 years was chosen as the cut-off to determine a possible age influence, because in developing countries such as Brazil persons >60 years old are considered elderly by the World Health Organization (WHO, 1995). Odds ratio values and 95% confidence intervals were also calculated. Biological and biochemical variables were also compared between obese, overweight and control subjects using one-way ANOVA analysis of variance followed by Bonferroni's *post hoc* test. The alpha value considered was set at 0.05, and all *p* values were two-tailed.

3. Results

The characteristics of the individuals investigated are shown in Table 1. The non-overweight group showed lower values for body weight, BMI, waist circumference and systolic blood pressure, than did overweight and obese subjects.

Multivariate analysis showed that the non-obese group showed lower weight, BMI, waist circumference and SBP than did the overweight and obese groups.

Genotype and allele frequencies of the IL-1 β +3953 polymorphism gene variant in obese and non-overweight subjects are described in Table 2. Allele frequencies for C and T in the +3953 IL-1 β polymorphism were 0.76 and 0.24, respectively (*p* = 0.812). Analysis showed no deviation from Hardy–Weinberg equilibrium in the sample investigated.

An analysis comparing the biomarkers between the three different genotypes did not show statistical differences. However, the genotype and allele frequencies of the IL-1 β +3953 polymorphism were different between the groups compared here. Residual analysis showed that this difference is due to a reduction in the CC genotype and an excess of the TC genotype in the non-overweight group ($\chi^2 = 30.619$, *p* = 0.0001) when compared to the overweight and obese groups.

A calculated dose–allele effect confirms this association of CC versus TT plus CT genotypes: $\chi^2 = 27.976$, *p* = 0.0001). The odds ratio showed 1.623 (95% CI: 1.349–1.952) times more chance of the overweight group being CC carriers compared to non-overweight and 1.340 (95% CI: 1.119–1.605) times more chance of the obese group being CC carriers compared to non-overweight group. Regression analysis confirmed that the association observed was independent of sex (Wald 0.145, *p* = 0.704) and age (Wald 0.156, *p* = 0.693) (Fig. 1).

MS prevalence in sample subjects was 31.7% (*n* = 280). The comparison of genotype frequencies between subjects with and without MS did not show distribution differences [CC = 161 (31.6%), TT = 21 (36.8%), CT = 97 (30.6%), $\chi^2 = 2.541$, *p* = 0.281]. Regression analysis confirmed that the association between obesity and the polymorphism studied here was independent of MS (Wald 0.577, *p* = 0.448).

4. Discussion

We describe here an association between the CC genotype of IL-1 β +3953 polymorphism and overweight and obesity in a Brazilian sample independent of sex and age. The number of studies reporting associations between DNA sequence variation in specific genes and obesity phenotypes has increased considerably, with 426 findings of positive associations with 127 candidate genes (Rankinen et al., 2006). However, the association between cytokine genes and obesity has been studied less as compared with other candi-

Table 1
Baseline values of characteristics of non-overweight, overweight and obese Brazilian subjects.

Variable		Normal weight	Overweight	Obese	p
Weight (kg)	Male	61.4 ± 8.6	72.5 ± 8.2	80.7 ± 10.3	0.0001
	Females	57.0 ± 11.1	66.4 ± 9.9	77.1 ± 9.7	
Height (cm)	Males	160.0 ± 8.8	161.2 ± 8.9	160.0 ± 7.1	0.980
	Females	153.6 ± 7.3	152.7 ± 16.5	154.3 ± 6.7	
BMI (kg/m ²)	Males	22.8 ± 1.4	27.2 ± 1.3	32.3 ± 3.1	0.0001
	Females	22.7 ± 2.5	27.5 ± 1.4	33.4 ± 3.2	
Waist circumference (cm)	Males	86.2 ± 17.3	95.6 ± 8.2	103.1 ± 12.0	0.0001
	Females	84.3 ± 10.7	90.2 ± 9.5	99.2 ± 11.2	
SBP (mmHg)	Males	127.2 ± 53.4	143.9 ± 27.5	146.2 ± 35.9	0.024
	Females	126.8 ± 40.0	137.5 ± 35.5	140.8 ± 32.5	
DBP (mmHg)	Males	81.7 ± 22.2	80.3 ± 12.3	84.3 ± 17.0	0.249
	Females	71.3 ± 17.7	76.5 ± 15.1	77.6 ± 15.3	
Glucose (mg/dL)	Males	105.1 ± 39.6	103.9 ± 19.2	105.9 ± 30.8	0.926
	Females	102.7 ± 27.4	106.3 ± 27.4	105.7 ± 25.7	
Cholesterol total (mg/dL)	Males	206.0 ± 53.1	206.7 ± 39.2	205.4 ± 37.3	0.202
	Females	210.3 ± 38.1	217.0 ± 35.3	217.1 ± 35.3	
HDL cholesterol (mg/L)	Males	46.1 ± 8.2	41.4 ± 8.8	40.9 ± 9.4	0.236
	Females	45.9 ± 10.2	46.3 ± 7.1	46.3 ± 9.9	
LDL cholesterol (mg/dL)	Males	128.9 ± 54.4	130.6 ± 41.1	133.3 ± 38.2	0.843
	Females	136.1 ± 36.1	139.9 ± 36.4	139.1 ± 35.8	
Triglycerides (mg/dL)	Males	160.3 ± 60.7	168.7 ± 70.9	155.8 ± 67.8	0.149
	Females	140.0 ± 66.7	152.9 ± 67.5	160.6 ± 79.4	

BMI: body mass index (kg/m²); normal weight: BMI < 25 kg/m²; overweight: BMI > 25 < 30 kg/m²; obese: BMI ≥ 30 kg/m²; SD: standard deviation; p: significant value from one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test.

date genes, even though cytokines appear to be major regulators of adipose tissue metabolism, especially the IL-1 cytokine family. This family comprises four main members: IL-1 α , IL-1 β , IL-1 receptor antagonist (IL-1ra) and IL-18. Although IL-1 can upregulate host defenses and act as an immunoadjuvant, the family is primarily considered to be pro-inflammatory. From previous investigations conducted, some evidence suggests that interleukin system polymorphism could be associated with obesity, such as the IL-1 β polymorphism. Therefore, our results corroborated the previous investigation in Caucasian (Strandberg et al., 2006, 2008) and Korean subjects (Um et al., 2004b) as well as the suggestion that the association between IL-1 and body fat regulation in humans is robust and not substantially affected by ethnicity, gender or age (Strandberg et al., 2008). Additionally, from our results we can suggest that this association is independent of other metabolic disorders such as MS.

Considering specifically IL-1 β +3953 polymorphism, previous studies indicate that this polymorphism is functional, affecting the production of inflammatory IL-1 β levels. Additionally, some studies have suggested an association between IL-1 β +3953 polymorphism and obesity (Um et al., 2004a,b; Strandberg et al., 2006, 2008; Lee et al., 2008). All studies described a significant decrease in the IL-1 beta T allele in the overweight and obese when compared to lean subjects. Our results corroborate the data previously published by Strandberg et al. (2006) describing that IL-1 β +3953 polymorphism

affects fat mass in young men. The general allele frequency was also similar between the study by Strandberg et al. (C=0.75, T=0.25) and the present work. This apparent discrepancy indicates a possible effect of intervening variables in the populations investigated, and thus, additional investigations need to be performed to clarify these contradicting results.

In addition, there are studies analyzing the association between obesity and other IL-1 alpha and beta polymorphisms. Carter et al. (2008) studied single nucleotide polymorphisms in the IL-1 gene family IL-1 alpha C-889T and IL-2 beta +3954 in a Western Australian coronary heart disease (CHD) population of 556. The authors described an association between these polymorphisms and larger waist circumference. The study performed by Song et al. (2008) also described a positive association between IL-1 α -880C/T polymorphism and obesity in a 182 healthy Korean females with a marked variation in BMI. Investigations analyzing the association between IL-1ra polymorphism and obesity have also been published, demonstrating that serum IL-1ra concentrations are increased in human obesity and that they are under strong genetic control. There are some studies that have described a positive association with such polymorphisms as observed in intron 2 in the IL-1ra gene (Di Renzo et al., 2007), but other investigators did not find this polymorphism to be significantly associated with obesity (Um et al., 2004a,b). Despite the relatively small number of studies, these investigations suggest a positive association between the IL-1 family and obesity, which needs to be better explored in further studies.

Strandberg et al. (2006) suggested that the possible mechanism of the effects of IL-1 could involve mediation of the effects of leptin at the hypothalamic level based on previous studies by Luheshi et al. (1999). Leptin is an adipocyte-derived hormone and cytokine that regulates energy balance through a wide range of functions. Leptin levels increase with adiposity, presumably to inform the brain regarding the quantity of stored fat (Considine et al., 1996; Seth et al., 2008). IL-1 β is expressed in the hypothalamus, and its levels are increased by leptin and reduced by fasting. IL-1 β has been reported to inhibit adipocyte differentiation from preadipocytes and also to decrease the lipid content of mature adipocytes (Simons et al., 2005). Moreover, IL-1 may increase leptin secretion from preadipocytes and seems essential for inflammation-induced release of leptin from adipose tissue

Table 2
Genotype and allele frequencies of IL-1 β +3983 gene polymorphism in non-overweight, overweight and obese subjects.

Genetic	Groups		
	Non-overweight	Overweight	Obese
Genotype			
CC	129 (45.6)	222 (66.5)	157 (59.7)
TT	19 (6.7)	22 (6.6)	16 (6.1)
CT	135 (47.7)	90 (26.9)	90 (34.2)
Allele			
C	0.694	0.799	0.768
T	0.306	0.201	0.232

Non-overweight: BMI < 25 kg/m²; overweight: BMI > 25 < 30 kg/m²; obese: BMI > 30 kg/m².

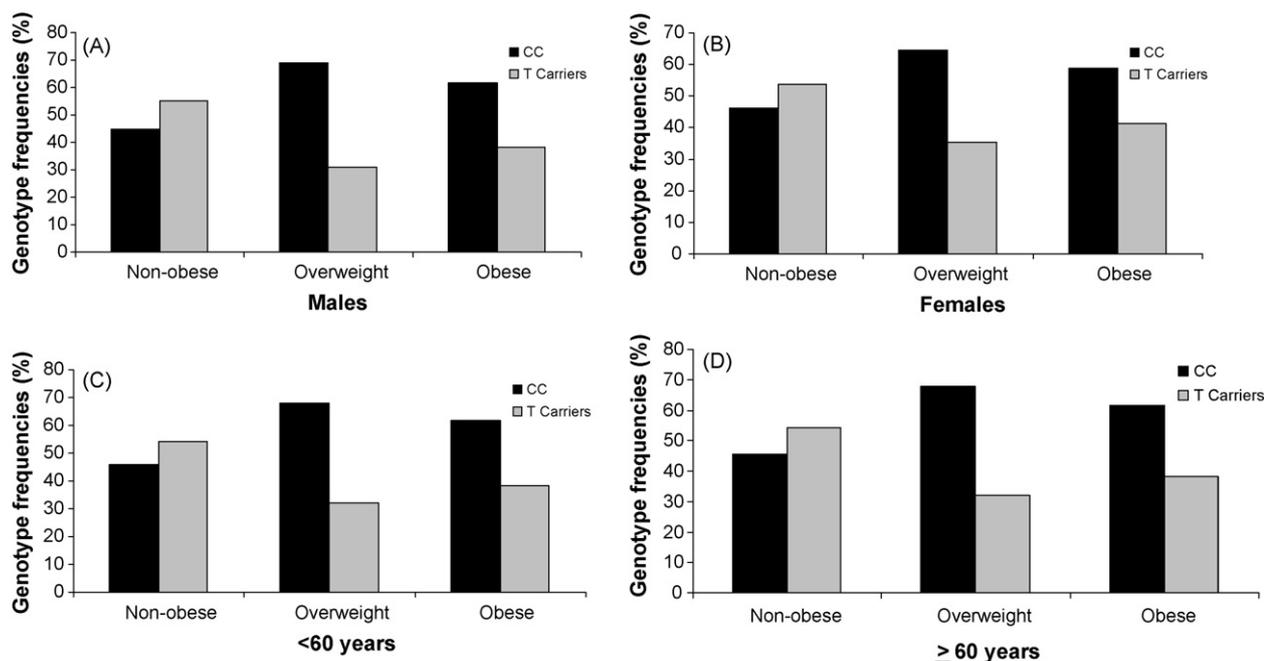


Fig. 1. CC and TT+CT distribution comparison of IL-1 β +3983 polymorphism between males and females (A and B) and subjects <60 years and subjects \geq 60 years (C and D). Sex and age did not show significant differences between genotype frequencies.

(Simons et al., 2005; Faggioni et al., 1998). Additionally, it is important to comment that IL-1 was one of the first cytokines to be implicated in vessel wall inflammation in atherosclerosis, and in facilitating early lesion formation. IL-1 molecules affect leukocyte recruitment and transmigration, allowing it to maintain a pro-inflammatory milieu once inflammation has been initiated (Dinarello, 1997; Libby et al., 1995; Girn et al., 2007).

Interleukin-1 β (*IL1B*) gene, part of a cluster of genes on chromosome 2 coding for a family of IL-1 proteins, has been shown to be an important modulator of inflammatory pathways, with potential involvement in the pathogenesis of atherosclerosis and other cardiovascular diseases.

Finally, it is important to ponder some considerations associated with our methodological design. Since obesity is strongly related to other morbidities, investigators looking for an association between gene and non-morbid obesity need to consider these morbidities as intervening variables. In fact, many investigations prefer to include all subjects in the study and perform further exclusions when the statistical analyses are conducted. Of course, that approach increases the sample number and permits more consistent statistical power. However, with the great quantities of variables included in the study and the large number of positive statistical associations sometimes found in these studies, it is then very difficult to discuss the results in biological terms. For these reasons, we selected obese subjects (mainly elderly) without previous history or morbidities such as cancer or other diseases that could influence the results described here. As MS is a condition broadly related to obesity, we did not exclude the affected subjects. However, this additional analysis did not show an interference of MS with the association between CC genotype and obesity.

Additionally, another possible methodological limitation is related to fact that we used in this investigation just BMI to classify the non-overweight, overweight and obese groups. We know that BMI is a non-specific measure that is influenced by fat mass, lean tissue mass and even height (Prentice and Jebb, 2001). However, BMI is a measure largely used in population studies, and several genetic studies have used this marker to compare differences in genetic distribution between obese, overweight and non-overweight sub-

jects (Genelhu et al., 2009; Vimalaswaran et al., 2009; Willer et al., 2009). Since the decreased BMI in IL-1 β +3953 T carriers observed here was previously described by Strandberg et al. (2008) and Um et al. (2004a,b), we believe that this association is not a product of chance.

The white adipose tissue (WAT) view has changed over the last decade, from an inert triglyceride storage tissue to a highly active metabolic organ. Indeed, WAT secretes pro-inflammatory cytokines such as interleukin-1 beta, as studied here, and other important molecules, including peptides with hormone-like actions, such as adiponectin, leptin and resistin. An imbalance of these molecules with paracrine actions, caused by functional genetic variations, can contribute to creating or maintaining a systemic inflammatory state, hypertension and insulin resistance, and can also affect central control of food intake. In most obese patients, obesity is associated with a low-grade inflammation of white adipose tissue (WAT) resulting from chronic activation of the innate immune system, which can subsequently lead to insulin resistance, impaired glucose tolerance, and even diabetes (Bastard et al., 2006). These physiological alterations also create conditions that can amplify chronic vascular inflammation, which is the hallmark of atherosclerosis (Girn et al., 2007).

Additionally, it is important to comment on a critical point in genetic studies performed in populations that have different genetic origins such as the Brazilian population. In this study, we analyzed just subjects who reported European ancestry; however, we cannot consider that this population is a stratified group. Some authors have dedicated special attention to the ancestry of European descendants who live in the southern Brazilian region population, such as Alves-Silva et al. (2000), Parra et al. (2003) and Marrero et al. (2005) who observed the occurrence of massive inter-ethnic crosses and remarkable heterogeneity in the 500 years of Brazilian history and underlined the large urban areas such as the Porto Alegre metropolitan area (3.5 million inhabitants). In this population, there were no isolated ethnic groups. For this reason, we consider the sample source as a unique population, discarding possible interference associated with samples from different ethnic groups in the results described here.

In conclusion, the results described here corroborate previous investigations suggesting an associated between IL-1 β +3953 polymorphism and obesity. Additional studies are needed to search for possible gene-gene and gene-environmental interactions to clarify how much this genetic variation affects body fat composition.

Acknowledgments

The authors are indebted to Denise Müzel, Leni Araújo Leite, Ricardo Ehlers and other researchers who helped in data collection and CNPq (Nos. 471233/2007-2 and 311231/2006-3), CAPES (No. 266/08) and FAPERGS for grants and fellowships. Dr. A. Leyva provided English editing of the manuscript.

References

- Alves-Silva, J., da Silva Santos, M., Guimarães, P.E., Ferreira, A.C., Baldet, H.J., Pena, S.D., Prado, V.F., 2000. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am. J. Hum. Genet.* 77, 444–461.
- Aner, P., 2000. Obesity, a genetic disease of adipose tissue? *Br. J. Nutr.* 83, 9–16.
- Bachorik, P.S., Albers, J.J., 1986. Precipitation methods for quantification of lipoproteins. *Methods Enzymol.* 129, 78–100.
- Bastard, J.P., Maachi, M., Lagathu, C., Kim, M.J., Caron, M., Vidal, H., Capeau, J., Feve, B., 2006. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur. Cytokine Netw.* 17, 4–12.
- Buchs, N., di Giovine, F.S., Silvestre, T., Vannier, E., Duff, G.W., Miossec, P.C., 2001. IL-1 β and IL-1Ra gene polymorphism and disease severity in rheumatoid arthritis: interaction with their plasma levels. *Gene Immun.* 2, 222–228.
- Bruun, J.M., Pedersen, S.T., Kristensen, K., Richelsen, B., 2002. Opposite regulation of interleukin-8 and tumor necrosis factor- α by weight loss. *Obesity Res.* 10, 499–506.
- Carter, K.W., Hung, J., Powell, B.L., Wiltshire, S., Foo, B.T., Leow, Y.C., McQuillan, B.M., Jennens, M., McCaskie, P.A., Thompson, P.L., Beilby, J.P., Palmer, L.J., 2008. Association of Interleukin-1 gene polymorphisms with central obesity and metabolic syndrome in a coronary heart disease population. *Hum. Genet.* 124, 199–206.
- Considine, R.V., Sinha, M.K., Heiman, M.L., 1996. Serum immunoreactive leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N. Engl. J. Med.* 334, 292–295.
- Dianarello, C.A., 1996. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 87, 2095–2147.
- Dianarello, C.A., 1997. Interleukin-1. *Cytokine Growth Factor Rev.* 8, 253–256.
- Di Renzo, L., Bigioni, M., Del Gobbo, V., Premrov, M.G., Barbini, U., Di Lorenzo, N., De Lorenzo, A., 2007. Interleukin-1 (IL-1) receptor antagonist gene polymorphism in normal weight obese syndrome: relationship to body composition and IL-1 α and beta plasma levels. *Pharmacol. Res.* 55, 131–138.
- El-Omar, E.M., Carrington, M., Chow, W.H., McColl, K.E., Bream, J.H., Young, H.A., Herrera, J., Lissowska, J., Yuan, C.C., Rothman, N., Lanyon, G., Martin, M., Fraumeni Jr., J.F., Rabkin, C.S., 2000. Interleukin-1 polymorphism associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* 404, 398–402.
- Faggioni, R., Fantuzzi, G., Fuller, J., Dianarello, C.A., Feingold, K.R., Grunfeld, C., 1998. IL-1 β mediates leptin induction during inflammation. *Am. J. Physiol.* 274, R204–R208.
- Friedewald, W.T., Levy, R.I., Fredrickson, D.S., 1972. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without the use of preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.* 18, 499–502.
- García-González, M.A., Lanás, A., Savelkoul, P.H., Santolaria, S., Benito, R., Crusius, J.B., Pena, A.S., 2003. Association of interleukin 1 gene family polymorphisms with duodenal ulcer disease. *Clin. Exp. Immunol.* 134, 525–531.
- García, M.C., Wernstedt, I., Berndsson, A., Enge, M., Bell, M., Hultgren, O., Horn, M., Ahren, B., Enerback, S., Ohlsson, C., Wallenius, V., Jansson, J.O., 2006. Mature-onset obesity in interleukin-1 receptor I knock-out mice. *Diabetes* 55, 1205–1213.
- Genelhu, V.A., Celoria, B.M., Pimentel, M.M., Duarte, S.F., Cabello, P.H., Francischetti, E.A., 2009. Association of a common variant of the leptin gene with blood pressure in an obese Brazilian population. *Am. J. Hypertens.* (Epub ahead of print).
- Girn, H.R.S., Orsbi, N.M., Homer-Vanniasinkam, S., 2007. An overview of cytokine interactions in atherosclerosis and implications for peripheral arterial disease. *Vasc. Med.* 12, 299–309.
- Grundy, M., Cleeman, J.I., Daniels, S.R., et al., 2005. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation* 112, 2735–2752.
- Hotamisligil, G.S., Arner, P., Caro, J.F., Atkinson, R.L., Spiegelman, B.M., 1995. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 95, 2409–2415.
- Lancaster, A., Nelson, M.P., Meyer, D., Thomson, G., Single, R.M., 2003. PyPop: a software framework for population genomics: analyzing large-scale multilocus genotype data. *Pac. Symp. Biocomput.*, 514–525.
- Latkowski, G., Licit, N., Kalnins, U., 2004. C-reactive protein levels and common polymorphism of the interleukin-1 gene cluster and interleukin-6 gene in patients with coronary heart disease. *Eur. J. Immunogenet.* 31, 207–213.
- Lee, J.H., Kwon, Y.D., Hong, S.H., Jeong, H.J., Kim, H.M., Um, J.Y., 2008. Interleukin-1 beta gene polymorphism and traditional constitution in obese women. *Int. J. Neurosci.* 118, 793–805.
- Libby, P., Sukhova, G., Lee, R.T., Galis, Z.S., 1995. Cytokines regulates vascular function related to stability of the atherosclerotic plaque. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 25, 9–12.
- Licastro, F., Chiappelli, M., Caldarella, C.M., Tampieri, C., Nanni, S., Gallina, M., Branzi, A., 2004. The concomitant presence of polymorphic alleles of interleukin-1beta, interleukin-6 and apolipoprotein E is associated with an increased risk of myocardial infarction in elderly men. Results from a pilot study. *Mech. Ageing Dev.* 125, 575–579.
- Luheshi, G.N., Gardner, J.D., Rushforth, D.A., Loudon, A.S., Rothwell, N.J., 1999. Leptin actions on food intake and body temperature are mediated by IL-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 7047–7052.
- Machado, J.C., Pharoah, P., Sousa, S., 2001. Interleukin 1B and interleukin-1RN polymorphisms are associated with increased risk of gastric carcinoma. *Gastroenterology* 121, 823–829.
- Marrero, A.R., das Neves Leite, F.P., de Almeida Carvalho, B., Peres, L.M., Kolmers, T.C., Cruz, I.B.M.C., Salzano, F.M., Ruiz-Linares, A., da Silva Junior, W.V., Bortolini, M.C., 2005. Heterogeneity of the genome ancestry of individuals classified as White in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Am. J. Hum. Biol.* 17, 496–506.
- Oda, K., Tanaka, N., Arai, T., Araki, J., Song, Y., Zhang, L., Kuchiba, A., Hosoi, T., Shirasawa, T., Muramatsu, M., Sawabe, M., 2007. Polymorphisms in pro- and anti-inflammatory cytokine genes and susceptibility to atherosclerosis: a pathological study of 1503 consecutive autopsy cases. *Hum. Mol. Genet.* 16, 592–599.
- Parkhill, J.M., Hennig, B.J., Chapple, I.L., Heasman, P.A., Taylor, J.J., 2000. Association of interleukin-1 gene polymorphism with early-onset periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* 27, 682–689.
- Parra, F.C., Amado, R.C., Lambertuci, J.R., 2003. Color and genomic ancestry in Brazilians. *PNAS* 100, 177–182.
- Prado-Lima, P.S., Cruz, I.B.M., Schwanke, C.H.A., Netto, C.A., Licinio, J., 2006. Human food preferences are associated with a 5-HT2A serotonergic receptor polymorphism. *Mol. Psychol.* 11, 889–891.
- Prentice, A.M., Jebb, S.A., 2001. Beyond body mass index. *Obes. Rev.* 2, 141–147.
- Pociot, F., Molvig, J., Wogensen, L.W., Orsaae, H., Nerup, J., 1992. A Taq I polymorphism in the human interleukin-1 β (IL-1 β) gene correlates with IL-1 β secretion in vitro. *Eur. J. Clin. Invest.* 22, 396–402.
- Rankinen, T., Zuberi, A., Chagnon, Y.C., Weisnagel, S.J., Argyropoulos, G., Walts, B., Pérusse, L., Bouchard, C., 2006. The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity (Silver Spring)* 14, 529–644.
- Seripa, D., Matera, M.G., Dal Forno, G., Gravina, C., Masullo, C., Daniele, A., Binetti, G., Bonvicini, C., Squitti, R., Palermo, M.T., Davis, D.G., Antuono, P., Wekstein, D.R., Dobrina, A., Gennarelli, M., Fazio, V.M., 2005. Genotypes and haplotypes in the IL-1 gene cluster: analysis of two genetically and diagnostically distinct groups of Alzheimer patients. *Neurobiol. Aging* 26, 455–464.
- Seth, S., Martin, B.S., Atif Qasim, M.D., Muredach, P., Reily, M.B., 2008. A possible interface of inflammation and metabolism in obesity-related cardiovascular disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 52, 1201–1210.
- Simons, P.J., van den Pangaart, P.S., van Roemen, C.P., Aerts, J.M., Boon, L., 2005. Cytokine-mediated modulation of leptin and adiponectin secretion during *in vitro* adipogenesis: evidence that tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β treated human preadipocytes are potent leptin producers. *Cytokine* 32, 94–103.
- Strandberg, L., Mellström, D., Ljunggren, O., Grundberg, E., Karlsson, M.K., Holmberg, A.H., Orwoll, E.S., Eriksson, A.L., Svedberg, J., Bengtsson, M., Ohlsson, C., Jansson, J.O., 2008. IL6 and IL1B polymorphisms are associated with fat mass in older men: the MrOS Study Sweden. *Obesity* 16, 710–713.
- Strandberg, L., Lorentzon, M., Hellqvist, A., Nilsson, S., Wallenius, V., Ohlsson, C., Jansson, J.O., 2006. Interleukin-1 system gene polymorphisms are associated with fat mass in young men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91, 2749–2754.
- Song, J.S., Jeong, H.J., Kim, S.J., Son, M.S., Na, H.J., Song, Y.S., Hong, S.H., Kim, H.M., Um, J.Y., 2008. Interleukin-1 α polymorphism –889C/T related to obesity in Korean taemin women. *Am. J. Chin. Med.* 36, 71–780.
- Tauffer, M., Peres, A., Sá, G.P., Aandrade, V., Bauer, M., Cruz, I.B.M., 2005. Is the Val16Ala manganese superoxide dismutase polymorphism a candidate gene associated to the aging process? *J. Gerontol.* 60, 432–438.
- Um, J.Y., Lee, K.M., Kim, H.M., 2004a. Polymorphism of interleukin-1 receptor antagonist gene and obesity. *Clin. Chim. Acta* 340, 173–177.
- Um, J.Y., Chung, H.S., Song, M.Y., Shin, H.D., Kim, H.M., 2004b. Association of interleukin-1 β gene polymorphism with body mass index in women. *Clin. Chem.* 50, 647–650.
- Vimalaswaran, K.S., Franks, P.W., Brage, S., Sardinha, L.B., Andersen, L.B., Wareham, N.J., Ekelund, U., Loos, R.J., 2009. Absence of association between the INSIG2 gene polymorphism (rs7566605) and obesity in the European Youth Heart Study (EYHS). *Obesity (Silver Spring)* (Epub ahead of print).
- World Health Organisation, 1995. *The World Health Report 1995: Bridging the Gaps*. WHO, Geneva.
- Willer, C.J., Speliotes, E.K., Loos, R.J., Li, S., Lindgren, C.M., Heid, I.M., Berndt, S.I., Elliott, A.L., Jackson, A.U., Lamina, C., Lettre, G., Lim, N., Lyon, H.N., McCarrroll, S.A., Papadakis, K., Qi, L., Randall, J.C., Roccasecca, R.M., Sanna, S., Scheet, P., Weedon, M.N., Wheeler, E., Zhao, J.H., Jacobs, L.C., Prokopenko, I., Soranzo, N., Tanaka, T., Timpon, N.J., Almgren, P., Bennett, A., Bergman, R.N., Bingham, S.A., Bonnycastle, L.L., Brown, M., Burt, N.P., Chines, P., Coin, L., Collins, F.S., Connell, J.M., Cooper, C., Smith, G.D., Dennison, E.M., Deodhar, P., Elliott, P., Erdos, M.R., Estrada, K., Evans, D.M., Giannini, L., Gieger, C., Gillson, C.J., Guiducci, C., Hackett, R., Hadley, D., Hall, A.S., Havulinna, A.S., Hebebrand, J., Hofman, A., Isomaa, B., Jacobs, K.B., Johnson, T., Jousilahti, P., Jovanovic, Z., Khaw, K.T., Kraft, P., Kuokka-

- nen, M., Kuusisto, J., Laitinen, J., Lakatta, E.G., Luan, J., Luben, R.N., Mangino, M., McArdle, W.L., Meitinger, T., Mulas, A., Munroe, P.B., Narisu, N., Ness, A.R., Northstone, K., O'Rahilly, S., Purmann, C., Rees, M.G., Ridderstråle, M., Ring, S.M., Rivadeneira, F., Ruukonen, A., Sandhu, M.S., Saramies, J., Scott, L.J., Scuteri, A., Silander, K., Sims, M.A., Song, K., Stephens, J., Stevens, S., Stringham, H.M., Tung, Y.C., Valle, T.T., Van Duijn, C.M., Vimalaswaran, K.S., Vollenweider, P., Waeber, G., Wallace, C., Watanabe, R.M., Waterworth, D.M., Watkins, N., Wellcome Trust Case Control Consortium, Wittman, J.C., Zeggini, E., Zhai, G., Zillikens, M.C., Alshuler, D., Caulfield, M.J., Chanock, S.J., Farooqi, I.S., Ferrucci, L., Guralnik, J.M., Hattersley, A.T., Hu, F.B., Jarvelin, M.R., Laakso, M., Mooser, V., Ong, K.K., Ouwehand, W.H., Salomaa, V., Samani, N.J., Spector, T.D., Tuomi, T., Tuomilehto, J., Uda, M., Uitterlinden, A.G., Wareham, N.J., Deloukas, P., Frayling, T.M., Groop, L.C., Hayes, R.B., Hunter, D.J., Mohlke, K.L., Peltonen, L., Schlessinger, D., Strachan, D.P., Wichmann, H.E., McCarthy, M.I., Boehnke, M., Barroso, I., Abecasis, G.R., 2009. Six new loci associated with body mass index highlight a neuronal influence on body weight regulation. *Nat. Genet.* 41, 25–34.
- Zeng, Z.R., Hu, P.J., Hu, S., Pang, R.P., Chen, M.H., Ng, M., Sung, J.J., 2003. Association of interleukin 1B gene polymorphism and gastric cancers in high and low prevalence regions in China. *Gut* 52, 1684–1689.
- Zienolddiny, S., Ryberg, D., Maggini, V., Skaug, V., Canzian, F., Haugen, A., 2004. Polymorphisms of the interleukin-1 beta gene are associated with increased risk of non-small cell lung cancer. *Int. J. Cancer* 109, 353–356.

4 ARTIGO 2

Effect of +3953 interleukin-1B gene polymorphism on serum oxidized low density lipoproteins levels



Effect of the interleukin-1B gene on serum oxidized low-density lipoprotein levels

Maria Fernanda Manica-Cattani^a, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte^b, Euler Esteves Ribeiro^c, Raul de Oliveira^a, Ivana Beatrice Mânica da Cruz^{a,b,*}

^a Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^b Laboratório de Biogenômica, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil

^c Universidade Aberta da Terceira Idade, Universidade do Estado do Amazonas, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 August 2011
received in revised form 27 February 2012
accepted 28 February 2012
Available online xxx

Keywords:

oxLDL
Interleukin-1beta polymorphism
Cardiovascular risk factor

ABSTRACT

Objectives: To investigate the association of the +3953 IL-1B gene polymorphism in healthy subjects with serum oxidized LDL (oxLDL) levels.

Design and methods: We selected 255 subjects who were non-smokers and who had no cardiovascular or other chronic degenerative diseases, and we measured the oxLDL and other glucose levels, lipid biomarkers and biological variables that are related to cardiovascular metabolism. The +3953 IL-1B gene polymorphism was determined using molecular genetics techniques (PCR-RFLP).

Results: A significant association among the +3953 IL-1B genotypes and the oxLDL level was observed. The TT genotype presented lower oxLDL levels than the other genotypes. A multivariate analysis showed that this result was independent of the sex, age, obesity and hypertension status of the subjects.

Conclusions: Our results suggest that the IL-1B gene polymorphism affects the modulation of serum oxLDL levels.

© 2012 The Canadian Society of Clinical Chemists. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

The oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) is a key contributor to the progression of atherosclerosis [1]. This molecule is also recognized as an oxidative stress marker that is positively associated with central obesity and metabolic syndromes [2,3]. Furthermore, oxLDL has a number of effects on endothelial cell function, including the activation of inflammatory cytokines such as interleukin-1beta (IL-1 β), interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factor alpha (TNF α) and adhesion molecules such as cellular-1 vascular adhesion (VCAM-1) [4]. Minimally modified oxLDL also induces pro-inflammatory effects in macrophages, including cytoskeletal rearrangements and macropinocytosis, the generation of reactive oxygen species, the survival of foam cells, a reduced phagocytic capacity toward apoptotic cells and the expression of inflammatory genes.

The cytokines produced by macrophages in atherosclerotic lesions are thought to be important in the initiation and amplification of IL-1 β -mediated inflammation [5]. IL-1 β induces alterations in endothelial cell function, enhances mitogenesis in vascular smooth muscle cells and recruits leukocytes to the subendothelial space [6,7] in atherosclerotic lesions [8].

However, the potential association between IL-1 β and oxLDL presents some controversies. Several reports have demonstrated that

oxLDL modulated the expression of several cytokines. For example, Fong et al. observed that native LDL did not affect IL-1 β mRNA expression in mouse peritoneal macrophages, while oxLDL inhibited expression [9]. Contrarily, Okumura et al. [10] showed that while the chylomicron remnants increased the amount of IL-1 β in the monocyte cell line THP-1 in a dose- and time-dependent manner, neither native LDL nor oxidized LDL (oxLDL) was shown to significantly increase the release of IL-1 β .

IL-1 β plays an important role in the control of energy homeostasis, the suppression of adipose differentiation and the expression of several molecules. Previous studies, [11], suggested that the genetic polymorphisms present in the IL-1B gene are associated with obesity [12–14]. Our previous study showed that the IL-1B polymorphism (+3953) produces three genotypes (TT, TC and CC), and the genotypes with a higher T allele (CT/TT) were found with more frequency in the non-overweight group. The odds ratio showed a 1.340 (95% CI: 1.119–1.605)-times greater chance of the obese group being CC carriers compared with the non-overweight group, independent of sex and age. Therefore, we performed a complementary study to evaluate if the IL-1B polymorphism (+3953) could be associated with differential oxLDL levels.

Methods

Study population

We selected 255 subjects (51 males and 204 females, 57.3 \pm 6.6 years old) from a previous cross-sectional investigation performed

* Corresponding author at: Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima 1000, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil. Fax: +55 55 32208736.

E-mail address: ibmcruz@hotmail.com (I.B. Mânica da Cruz).

by Duarte et al. [15], in which volunteers were invited to participate and were prospectively enrolled at LABIMED in Santa Maria, RS, Brazil. Individuals who were selected for the study had to be ≥ 50 years old; have a non-smoking habit for the previous 24 months (non-smoker = 178, former = 77); be recreationally active; be taking no medications; and have no chronic morbidities, such as diabetes, severe hypertension (systolic blood pressure (SBP) ≥ 160 mm Hg, diastolic blood pressure (DBP) ≥ 100 mmHg), hypercholesterolemia (≥ 6.47 mmol/L), body mass index (BMI) ≤ 18.5 kg/m², hypothyroidism, cardiovascular, digestive or liver and renal diseases.

Because the study included genetic variables, the subjects were recruited from a random selection of Brazilians of European ancestry in Rio Grande do Sul State (RS). Compared with the Brazilian population as a whole, the population of this state is composed mainly of people of European ancestry (82%). Alves da Silva et al. [16] and Parra et al. [17] studied the ancestry of the Southern Brazilian regional population, emphasizing the massive inter-ethnic crosses that occurred during the 500 years of Brazilian history, and both of these research teams underscored the fact that the RS urban areas do not present significant isolated ethnic groups. A previous study performed by Cruz et al. [18] in different ethnic populations revealed different allele and genotype distributions, as well as different associations with diseases or biological characteristics among the various ethnic groups of this region. Therefore, we only analyzed subjects with the Caucasian phenotype, which represented the main ethnic group.

Laboratory analyses

After 12 h of overnight fasting, blood samples were collected by venipuncture using gray or red top Vacutainers® (BD Diagnostics, Plymouth, UK), which have sodium fluoride and potassium oxalate or no anticoagulant, respectively. The specimens were routinely centrifuged within 1 h of collection for 15 min at 2500 g, and aliquots of the serum samples were stored at -20 °C for a maximum of 4 weeks. The oxLDL level was determined by a capture ELISA following the manufacturer's instructions (Merckodia AB, Uppsala, Sweden) and as described by Holvoet et al. [19]. The epitope used in sandwich ELISA was based on the mouse monoclonal antibody 4E6, which is directed against a conformational epitope in oxidized ApoB-100. Additionally, the serum total cholesterol and triglyceride levels were measured by standard enzymatic methods using Ortho-Clinical Diagnostics® reagents in a fully automated analyzer (Vitros 950® Dry Chemistry System, Johnson & Johnson, Rochester, NY, USA). High-density lipoprotein cholesterol was measured as previously described in the plasma supernatant after the precipitation of apolipoprotein B-containing lipoproteins with dextran sulfate and magnesium chloride [20]. The low-density lipoprotein cholesterol was estimated using the Friedewald's equation [21].

We determined the intra-assay and inter-assay coefficients of variation as follows: oxLDL (1.5% and 1.9%, 1.5 mg/L), glucose (1.25% and 1.60%, 100 mg/dL), total cholesterol (2.30% and 2.81%, 150 mg/dL), triglyceride (2.27% and 2.52%, 100 mg/dL) and HDL cholesterol (3.30% and 3.65%, 40 mg/dL).

Biological variables analysis

The anthropometric variables investigated included height (measured in meters, without shoes) and weight (measured in kilograms, with heavy clothing removed and 1 kg deducted for remaining garments). The body mass index (BMI) was calculated as weight in kilograms divided by the square of the height in meters. We measured the waist circumference of standing subjects with a tape measure midway between the lowest rib and the iliac crest. Two blood pressure recordings (SBP and DBP) were obtained from the right arm of the patients in a sitting position after 30 min of rest; the

measurements were taken in 5 min intervals, and the mean values were calculated.

Genetic analysis: polymerase chain reaction and restriction endonuclease digestion

Genomic DNA was isolated from peripheral blood leukocytes using a GFX Genomic Blood DNA Purification kit (Amersham Biosciences Inc., Co., Sweden). The amplification of a region of the IL-1B + 3953 gene from human genomic DNA was performed using polymerase chain reaction (PCR) primers: (F) 5'-CTCAGGTGCTCCTCGAAGAAATCAAA-3' and (R) 5'-GTTTTTGTCTGTGATCC-3'. PCR was performed in a total volume of 25 μ L containing 2.5 mM MgCl₂, 9.9 mM Tris-HCl (pH 8.8), 50 mM KCl, 0.1% Triton-X 100, 0.20 μ M deoxyribonucleotide triphosphate (dNTPs), 1 U Taq DNA polymerase, and 0.2 μ M of each primer. The PCR conditions comprised an initial denaturation at 96 °C for 1 min, followed by 30 cycles at 94 °C for 1 min, 60 °C for 1 min and 70 °C for 1 min, with a final extension at 72 °C for 10 min. The final PCR product (194 base pairs, bp) was digested with 10 U TaqI at 65 °C overnight; the obtained products were 97 + 85 + 12 bp DNA products for allele C and 182 + 12 bp products for allele T. Therefore, the CC genotype presented just three bands (97 + 85 + 12 bp), the TT genotype presented just two bands (182 + 12 bp), and the CT genotype presented all four bands (182 + 97 + 85 + 12 bp). The digested products were visualized on a 6% agarose gel (Amersham Biosciences Inc., Co.) that had been stained with ethidium bromide.

Ethical considerations

This study was approved by the Ethics Committee of the Universidade Federal de Santa Maria (no. 23081.014840/2010-82), and the protocol was conducted within an ethical framework and with the informed consent of all the documented participants.

Statistical analysis

Data analysis was performed using the R software program (Version R-2.13.0, New Zealand). The association between the oxLDL subjects groups (HLG and ELG) and the IL-1B + 3953 polymorphism genotypes and alleles was tested using χ^2 analysis. The potential dose effect of the T allele was then investigated by comparing the CC and TT genotypes and the oxLDL groups. The results were expressed by frequency (%). Additionally, we analyzed the effect of the IL-1B + 3954 genotypes on the biochemical and biological variables in the two oxLDL groups using Student's *t* test. The results were expressed as mean \pm standard deviation (SD). Multivariate analysis was performed to analyze the possible intervenient effects on the association between the IL-1B genotypes and the oxLDL levels [22]. Two analyses were performed: first, we investigated the possible influence of gender, age, anthropometric and biochemical markers (waist circumference, BMI, cholesterol total, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol and triglycerides); and second, we investigated the possible influence of obesity and hypertension. To perform these analyses we used logistic regression (backward stepwise Wald's method). We considered the occurrence of intervenient factor when the variable added in the multivariate equation rises up the $p < 0.05$ obtained from statistical test. We compared the oxLDL levels among the IL-1B genotypes. If the variables did not change the *p* values, we considered that the association between the oxLDL levels and the IL-1B genotypes was independent of the variables included in the multivariate equation. We also calculated the odds ratio values and 95% confidence intervals. The alpha value considered was set at 0.05, and all *p* values were two-tailed.

Results

The baseline characteristics are shown in Table 1 and take both male and females subjects who were included in the study into consideration. The significant physical differences between males and females were observed in the waist circumference and BMI. The other variables were similar between genera.

Among the entire group of subjects, the IL-1B +3953 polymorphism genotype frequencies were CC = 56.9% (n = 145), TT = 11.8% (n = 30) and CT = 31.4% (n = 80). The C and T allele frequencies were 0.725 and 0.275, respectively. The genotype and allele frequencies were in Hardy–Weinberg equilibrium ($\chi^2 = 2.028$, $gI = 2$, $p > 0.05$).

The biochemical and biological variables were compared among subjects with different IL-1B +3953 genotypes. As seen in Table 2, all variables were similar among the genotypes, except oxLDL levels, which were significantly higher in the CC and CT subjects than in the TT subjects.

From this analysis, we were able to calculate the odds ratio that predicts the potential influence of the IL-1B gene polymorphism on oxLDL levels and to evaluate if the association between the IL-1B (+3953) gene polymorphism and the oxLDL levels was influenced by other biological variables, such as sex, age, obesity, hypertension and lipid and anthropometric parameters.

Two multivariate analyses were performed (Table 3) which first considered the IL-1B gene polymorphism as a dependent variable, because we compared the ox-LDL values between the TT and TC + CC subjects. In the first analysis, the statistical significance of the TT genotype and a lower oxLDL were maintained after correction for sex, age, waist circumference, BMI, cholesterol total, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol and triglycerides. The second analysis also maintained the statistical significance of the TT genotype and lower oxLDL and was determined independent of sex, age, obesity (BMI > 30 kg/m²) and moderate hypertension (SBP ≥ 140 mm Hg < 160 mm Hg; DBP ≥ 90 mm Hg < 100 mm Hg). The significance of $p < 0.05$ was maintained throughout the analysis.

In addition to the above analyses, we performed a complementary analysis considering the oxLDL as the dependent variable in a logistic regression analysis. To perform this analysis, we used the 50 percentile of oxLDL (0.5 nmol/mg) as the cut-off point. The subjects were grouped into two categories (oxLDL < 0.5 and ≥ 0.5 mmol/mg). In the sample, 134 subjects presented with oxLDL levels that were lower than 0.5 nmol/mg, and 121 subjects presented with oxLDL levels that were higher than or equal to 0.5 nmol/mg. The number of the TT carriers with oxLDL levels lower than 0.5 nmol/mg was significantly higher than the TC/CC carriers (TT = 76.7%, n = 23; TC/CC = 49.3%, n = 111) ($\chi^2 = 7.931$, $p = 0.005$). The odds ratio

Table 1
Characteristic baseline with male and female sample subjects.

Variables	Male Mean ± SD	Female Mean ± SD	p
n (255)	51	203	
Age	67.78 ± 8.15	67.22 ± 6.11	0.646
Waist circumference	96.01 ± 10.51	91.51 ± 10.25	0.006
BMI	27.48 ± 3.62	29.44 ± 4.47	0.001
PAS	153.60 ± 27.96	151.79 ± 26.55	0.667
PAD	81.43 ± 14.17	78.60 ± 12.42	0.160
Glucose	102.84 ± 28.21	103.32 ± 26.11	0.908
Cholesterol total	214.14 ± 37.62	217 ± 35.92	0.503
Triglycerides	144.64 ± 62.64	152.83 ± 69.83	0.446
HDL-cholesterol	42.76 ± 7.98	45.17 ± 8.26	0.062
LDL-cholesterol	140.68 ± 34.88	143.45 ± 30.81	0.576
oxLDL-cholesterol	0.52 ± 0.41	0.53 ± 0.38	0.871

Statistical comparison between male and female subjects was performed using Student's t test; SD = standard deviation.

Table 2

Comparison of Biochemical and biological variables among subjects with different IL-1β +3953 genotypes.

Variables	Genotypes			p
	CC Mean ± SD	TT Mean ± SD	CT Mean ± SD	
Waist circumference (cm)	92.8 ± 10.5	91.2 ± 9.0	92.2 ± 10.9	0.721
BMI (kg/m ²)	29.3 ± 4.3	28.2 ± 4.3	28.8 ± 4.5	0.398
Glucose (mmol/L)	5.8 ± 1.6	5.5 ± 1.2	5.5 ± 1.1	0.421
Cholesterol total (mmol/L)	5.7 ± 0.8	5.6 ± 0.9	5.4 ± 1.0	0.120
Triglycerides (mmol/L)	1.7 ± 0.7	1.4 ± 0.6	1.7 ± 0.8	0.137
HDL-cholesterol (mmol/L)	1.1 ± 0.2	1.1 ± 0.2	1.1 ± 0.2	0.913
LDL-cholesterol (mmol/L)	3.7 ± 0.8	3.6 ± 0.8	3.6 ± 0.8	0.339
oxLDL (nmol/mg)	0.55 ± 0.30	0.31 ± 0.21*	0.56 ± 0.41	0.006
SBP (mm Hg)	152.2 ± 27.0	155.5 ± 27.9	150.7 ± 26.1	0.710
DBP (mm Hg)	79.0 ± 12.7	80.4 ± 15.0	79.1 ± 12.2	0.854

BMI = body mass index; SBP = systolic blood pressure; DBP = diastolic blood pressure; SD = standard deviation; statistical differences (*) among genotypes were determined using analysis of variance followed by Bonferroni's test, p values < 0.05 were considered significant.

that the TC/CC carriers presented oxLDL levels higher than 0.5 nmol/mg when compared to the TT carriers was 3.375 (95% confidence interval, 1.392–8.180). In the other words, the TC/CC carriers presented approximately three times more risk to having higher oxLDL levels than the TT carriers. From these results, we performed an additional multivariate regression analysis that agreed with the significance independent of sex, age, obesity and hypertension variables.

Discussion

Herein, we report that oxLDL levels are associated with the IL-1B +3953 gene polymorphism genotype, suggesting a protective effect of the TT genotype that results in the production of less IL-1β molecules.

To the best of our knowledge, no previous study has addressed the potential correlation between oxLDL levels and IL-1B +3054 genetic polymorphisms. Due to the biological relevance of IL-1β in the inflammatory process, the search for factors that could stimulate cytokine production has clinical and epidemiological relevance. There are inter-individual differences in the production of IL-1 proteins,

Table 3
Multivariate analysis of association between IL-1B (+3953) gene polymorphism and oxLDL levels.

Variables	Wald	p
<i>Analysis 1</i>		
oxLDL	4.491	0.034
Sex	1.308	0.253
Age	0.138	0.710
Waist circumference	0.008	0.929
BMI	0.530	0.467
Cholesterol total	0.000	0.987
HDL-cholesterol	0.000	0.987
LDL-cholesterol	0.000	0.987
Triglycerides	0.000	0.987
<i>Analysis 2</i>		
oxLDL	8.752	0.003
Sex	0.015	0.902
Age	0.044	0.834
Obesity	0.580	0.810
Hypertension	1.497	0.221

Analysis 1 evaluates if the TT genotype of +3953 IL-1B polymorphism and oxLDL levels are influenced by sex, age, anthropometric and lipid parameters. Analysis 2 evaluates if the TT genotype of +3953 IL-1B polymorphism and oxLDL levels are oxLDL age, sex, obesity and hypertension.

which are encoded by three genes on chromosome 2q. The intron-organizational organization of these genes, which are mapped together, suggests a duplication of a single gene throughout the human evolution [5]. The IL-1B polymorphisms that were found to possibly influence the *in vitro* production of IL-1 include the C to T single nucleotide polymorphism (SNP) at nucleotide +3953 from the beginning of the transcription of the IL-1B gene [23,24].

A great deal of evidence has identified the uptake of oxLDL as the major cause of foam cell formation in the process of atherosclerosis, which is considered a chronic inflammatory process. Macrophages are induced by oxLDL to secrete IL-1 β [25]. The increase in IL-1 β levels appears to stimulate smooth muscle cells (SMCs) to over-express the platelet-derived growth factor (PDGF), which is involved in the migration and proliferation of SMCs; these processes are directly involved in atherosclerotic plaque formation. A previous *in vitro* study showed that incubation with very low-density lipoprotein (VLDL) enhances the macrophage IL-1 β expression in a caspase-2-dependent manner, which suggests a pro-inflammatory effect of the lipid loading in triglyceride-rich lipoproteins [26]. Therefore, IL-1 β was one of the first cytokines to be implicated in vessel wall inflammation in atherosclerotic patients and in facilitating early lesion formation [27–29].

Human beings inherit from their parents specific genotypes that determine the differences in the gene products over the course of an entire lifetime. This genetic determination manifests through structural traits, such as eye color, and through metabolic traits, such as enzymes, cytokines and other biochemical molecules. Previous evidence has shown that the T allele can differentially interfere in IL-1 β levels when compared to the A allele. In other words, the carriers of the TT IL-1B gene polymorphism investigated here potentially produces different IL-1B concentrations than the subject carriers of the CC and CT genotypes. However, IL-1 β is not a constitutively expressed protein in the same concentrations in all body tissues. The modulation of IL-1 β is dependent on the tissue type and the pro-inflammatory or non-inflammatory body state. Previous studies have indicated that IL-1 β is also involved in several non-transmissible diseases, including myocardial infarction, stroke, type 2 diabetes, osteoarthritis and gastric cancer; in addition, these studies showed that IL-1 β worsened rheumatoid arthritis and enhanced inflammatory serum parameters, adult periodontitis, gastric cancer and obesity [30–34]. IL-1 β has also regulate inflammatory reactions and immune responses by promoting the expression of other cytokines, such as IL-6 and IL-12 [35,36].

In our study where the CC genotype presented just three bands (97 + 85 + 12 bp), the TT genotype presented just two bands (182 + 12 bp), and the CT genotype presented all four bands (182 + 97 + 85 + 12 bp), we investigated whether the IL-1B modulation in the subjects was genetically determined, *i.e.*, whether subjects' different IL-1B genotypes correlated with the different oxLDL levels over the course of their lives. This hypothesis is based on the concept that when subjects have some gene functional polymorphism inherited from parents, they can produce different levels of molecules such as IL-1 β , which are regulated in a tissue-specific manner. Therefore, the CC genotype presented just three bands (97 + 85 + 12 bp), the TT genotype presented just two bands (182 + 12 bp), and the CT genotype presented all four bands (182 + 97 + 85 + 12 bp). This chronic condition could determine a greater or lesser susceptibility to diseases and disorders. Therefore, if the IL-1B gene polymorphism has some influence on oxLDL levels, the subjects with different genotypes will present with different levels of this atherogenic molecule. Our results support this hypothesis. Notably, however, because the IL-1 β is an inflammatory cytokine, its serum levels in non-inflammatory states can be low and similar among the different IL-1B genotypes [21]. For this reason, the influence the IL-1B gene on the serum oxLDL levels is not necessarily accompanied by an increase in protein levels of IL-1 β in the serum.

However, positive association was not found between the IL-1 gene cluster polymorphism and cardiovascular diseases. In a large investigation performed in a prospective cohort of American men, no association was found between the risk of athero-thrombotic disorders and the IL-1 gene cluster [14,9,16].

Our results suggest that oxLDL could have some modulatory effect on IL-1 β and that the IL-1B gene could influence oxLDL levels. This hypothesis is corroborated by the results of the cardiometabolic variables such as obesity and type 2 diabetes.

Finally, it is important to discuss certain features of our methodological design. Our results need to be interpreted with caution because the oxLDL levels are related to biological and metabolic imbalances that are caused by oxidative stress, which is due to both endogenous and exogenous factors. Because of this variable, we cannot be certain that the sample group studied was truly homogenous. To reduce potential confounding variables, we excluded from the samples dysfunctions and morbidities that could have some influence on the results. The exclusion of these samples resulted in a small number of subjects included in the study.

Additionally, we need to consider that some genetic differences often are statistically significant without any clinical relevance. Therefore, in this study we cannot predict whether the differences of the observed oxLDL levels from the different IL-1B genotypes have clinical and epidemiological importance. Complementary studies, preferentially using an interventional design, could help to resolve this question. Another methodological question concerns the IL-1 levels. We considered measuring the IL-1B levels in our samples; however, based on previous investigations which demonstrated that IL-1 β levels are low in the circulating peripheral blood, we decided not to measure this parameter as it is very expensive and probably would not be very informative.

Conclusion

In summary, our data suggest that the TT genotype could represent a protective factor against elevated oxLDL levels. We speculate that the low IL-1 β levels observed in the TT carriers could influence lower oxLDL levels when compared to subjects with other genotypes. However, further studies are required to elucidate the causal mechanism through which oxLDL and IL-1 β are linked as well as the potential relevance of these data towards new biochemical biomarkers that may be used in cardiovascular and other disease risk assessments.

Acknowledgments

The authors are indebted to the Biogenomic Lab research team, who helped in data collection and to CNPq, CAPES, FAPEAM and FAPERGS for grants and fellowships.

References

- [1] Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002;420:868–74.
- [2] Holvoet P, De Keyser D, Jacobs DR. Oxidized LDL and the metabolic syndrome. *Future Lipidol* 2008;3:637–49.
- [3] Holvoet P, Lee DH, Steffes M, Gross M, Jacobs Jr DJ. Association between circulating oxidized low-density lipoprotein and incidence of the metabolic syndrome. *JAMA* 2008;299:2287–93.
- [4] Jovinge S, Ares MP, Kallin B, Nilsson J. Human monocytes/macrophages release TNF-alpha in response to ox-LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:1573–9.
- [5] Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996;87:2095–147.
- [6] Libby P, Wyler DJ, Janicka MW, Dinarello CA. Differential effects of human interleukin-1 on growth of fibroblasts and vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 1985;5:186–91.
- [7] Thomas CE, Jackson RL, Ohlweiler DF, Ku G. Multiple lipid oxidation products in low density lipoproteins induce interleukin-1 beta release from human blood mononuclear cells. *J Lipid Res* 1994;35:417–27.
- [8] Tipping PG, Hancock WWW. Production of tumor necrosis factor and interleukin-1 by macrophages from human atherosclerotic plaques. *Am J Pathol* 1993;142:1721–8.
- [9] Fong LG, Fong TA, Cooper AD. Inhibition of lipopolysaccharide-induced interleukin-1 beta mRNA expression in mouse macrophages by oxidized low density lipoprotein. *J Lipid Res* 1991;32:1899–910.

- [10] Okumura T, Fujioka Y, Morimoto S, Masai M, Sakoda T, Tsujino T, et al. Chylomicron remnants stimulate release of interleukin-1beta by THP-1 cells. *J Atheroscler Thromb* 2006;13:38–45.
- [11] Manica-Cattani MF, Bittencourt L, Rocha MI, Algarve TD, Bodanese LC, Rech R, et al. Association between interleukin-1 beta polymorphism (+3953) and obesity. *Mol Cell Endocrinol* 2010;314:84–9.
- [12] Suzuki K, Inoue T, Yanagisawa A, Kimura A, Ito Y, Hamajima N. Association between Interleukin-1B C-31T polymorphism and obesity in Japanese. *J Epidemiol* 2009;19:131–5.
- [13] Lee JH, Kwon YD, Hong SH, Jeong HJ, Kim HM, Um JY. Interleukin-1 beta gene polymorphism and traditional constitution in obese women. *Int J Neurosci* 2008;118:793–805.
- [14] Yu Z, Han S, Cao X, Zhu C, Wang X, Guo X. Genetic polymorphisms in adipokine genes and the risk of obesity: a systematic review and meta-analysis. *Obesity* June 9 2011, doi:10.1038/oby.2011.148.
- [15] Duarte MMMF, Moresco RN, Duarte T, Santi A, Bagatini MD, Cruz IBM, et al. Oxidative stress in hypercholesterolemia and its association with Ala16 Val superoxide dismutase gene polymorphism. *Clin Biochem* 2010;43:1118–23.
- [16] Alves-Silva J, Santos MS, Guimarães PEM, Ferreira ACS, Bandelt HJ, Pena SDJ, et al. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am J Hum Genet* 2000;67:444–61.
- [17] Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. *PNAS* 2003;100:177–82.
- [18] Cruz IBM, Oliveira G, Taufer M, Leal NF, Schwanke CH, Glock L, et al. Angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism in two ethnic groups living in Brazil's southern region: association with age. *J Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.*, 58; 2003. p. 851–6.
- [19] Holvoet P, Stassen JM, Van Cleemput J, Collen D, Vanhaecke J. Oxidized low density lipoproteins in patients with transplant-associated coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:100–7.
- [20] Bachorik PS, Albers JJ. Precipitation methods for quantification of lipoproteins. *Methods Enzymol* 1986;129:78–100.
- [21] Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499–502.
- [22] Valle Gottlieb MG, da Cruz IBM, Duarte MMF, Moresco RN, Wiehe M, Schwanke CH, et al. Associations among metabolic syndrome, ischemia, inflammatory, oxidatives, and lipids biomarkers. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:1–6.
- [23] Pociot F, Molvig J, Wogensen L, Worsaae H, Nerup J. A Taq 1 polymorphism in human interleukin-1β (IL-1β) gene correlates with IL-1β secretion *in vitro*. *Eur J Clin Invest* 1992;22:392–402.
- [24] Santila S, Savinainen K, Hurme M. Presence of the IL-1RA allele 2 (IL1RN*2) is associated with enhanced IL-1beta production *in vitro*. *Scand J Immunol* 1998;47:195–8.
- [25] Ku G, Thomas CE, Akeson AL, Jackson RL. Induction of interleukin 1beta expression from human peripheral blood monocyte-derived macrophages by 9-hydroxyoctadecadienoic acid. *J Biol Chem* 1992;267:14183–8.
- [26] Stollenwerk MM, Lindholm MW, Porn-Ares MI, Larsson A, Nilsson J, Ares MP. Very low-density lipoprotein induces interleukin I beta expression in macrophage. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;335:603–8.
- [27] Libby P, Sukhova G, Lee RT, Galis ZS. Cytokines regulates vascular function related to stability of the atherosclerotic plaque. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995;25:9–12.
- [28] Oda K, Tanaka N, Arai T, Arai J, Song Y, Zhang L, et al. Polymorphism in pro and anti-inflammatory cytokine genes and susceptibility to arteriosclerosis: a pathological study of 1503 consecutive autopsy cases. *Hum Mol Genet* 2007;16:592–9.
- [29] Girn HRS, Orsbi NM, Homer Vanniasinkam S. An overview of cytokine interactions in arteriosclerosis and implications for peripheral arterial disease. *Vasc Med* 2007;12:299–309.
- [30] Kornman KS, Crane A, Wang HY, di Giovane FS, Newman MG, Pirk FW, et al. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1997;24:72–7.
- [31] El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA, et al. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* 2000;404:398–402.
- [32] Strandberg L, Mellström D, Ljunggren O, Grundberg E, Karlsson MK, Holmberg AH, et al. IL6 and IL1B polymorphisms are associated with fat mass in older men: the MrOS Study Sweden. *Obesity* 2008;16:710–3.
- [33] Dinarello CA. A clinical perspective of IL-1β as the gatekeeper of inflammation. *Eur J Immunol* 2011;41:1203–17.
- [34] Licastro F, Chiappelli M, Caldarera CM, Tanpieri C, Nanni S, Gallina M, et al. The concomitant presence of polymorphic allele of interleukin-1beta, interleukin-6 and apolipoprotein E is associated with an increased risk of myocardial infarction in elderly men. Results from a pilot study. *Mech Ageing Dev* 2004;125:575–9.
- [35] Karasneh J, Hajeer AH, Barret J, Ollier WE, Thornhill M, Gull A. Association of specific interleukin 1 gene cluster polymorphism with increased susceptibility for Behçet's disease. *Rheumatology* 2003;42:339–41.
- [36] He X, Jiang L, Fu B, Zhang X. Relationship between interleukin-1B and interleukin-1 receptor agonist gene polymorphism and susceptibility to gastric cancer. *J Jiangsu Univ* 2006;16:339–41.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo foi descrito a associação entre o polimorfismo +3953 do gene da IL-1B e obesidade, independente do gênero e da idade dos sujeitos amostrados. Adicionalmente foi observada a associação entre este polimorfismo e a modulação de moléculas do perfil lipídico-oxidativo, como o LDL-ox. Os níveis elevados de LDL-ox foram observados em indivíduos portadores dos genótipos CC/CT. Essa associação também foi independente do gênero e da idade bem como da obesidade. Desse modo, parece que o genótipo TT confere proteção contra o desenvolvimento da obesidade e de alterações de moléculas aterogênicas como o LDL-ox (Figura 1). Uma recente meta-análise feita por Yu e colaboradores (2011) demonstrou associação da obesidade entre polimorfismos dos genes de adipocinas como: a leptina, o receptor da leptina, a resistina, a adiponectina, a IL-6, o TNF- α e a IL-1 β . Essa meta análise confirmou a potencial associação do polimorfismo +3953 IL-1B com a obesidade.

Em relação à associação aqui observada entre o polimorfismo investigado e a obesidade a mesma corrobora investigações prévias conduzidas tanto em indivíduos caucasianos (STRANDBERG *et al.*, 2006; 2008) quanto em coreanos (UM *et al.*, 2004b; LEE *et al.*, 2008). Os resultados também corroboram a sugestão da associação entre os níveis de IL-1 β e a quantidade de gordura corporal independente de etnia, gênero e idade (STRANDBERG *et al.*, 2006; 2008). O IMC diminuído nos portadores do alelo T, observado nesse estudo, também foi previamente descrito por Strandberg e colaboradores (2008) e Um e colaboradores (2004a,b).

Existem também estudos que observaram associação entre a obesidade e outros polimorfismos dos genes IL-1A e IL-1B. Carter e colaboradores (2008) estudaram um SNP no gene da família IL-1A C-889T e IL-2B +3954, em uma população de 556 indivíduos ocidentais australianos com doenças coronarianas (CHD). Os autores descreveram uma associação entre esses polimorfismos e uma maior circunferência da cintura. O estudo realizado por Song e colaboradores (2008) também descreveu uma associação positiva entre o polimorfismo IL-1A -880C/T e obesidade em 182 mulheres coreanas saudáveis com uma variação marcada no IMC. As Investigações analisando a associação entre o polimorfismo IL-1RN e a obesidade também foram publicados, demonstrando que as concentrações de soro de IL-1ra estão muito aumentadas nos obesos e que ele está sob um forte controle genético. Outra investigação, também descreveu a associação entre obesidade e um polimorfismo no intron 2 do gene do IL-1RN (DI RENZO *et al.*, 2007). Portanto, o conjunto dessas pesquisas sugere que alterações em moléculas da família da IL-1 estão relacionadas à obesidade.

Antes de serem considerados os possíveis efeitos bioquímicos relacionados aos resultados obtidos se faz necessário tecer um comentário sobre a frequência do alelo T observada na amostra estudada. A frequência alélica do polimorfismo +3953 do gene IL-1B encontrada nesta investigação foi similar à descrita no estudo de Strandberg e colaboradores, que investigou indivíduos caucasianos (C=0,75 e T=0,25). Uma vez que a cor da pele no Brasil não é capaz de identificar com precisão a origem étnica do indivíduo dada a grande miscigenação populacional (PARRA *et al.*, 1999), mesmo que a amostra aqui estudada tenha sido inicialmente considerada caucasiana a análise genética poderia ter indicado influência de outras etnias. No entanto, este não parece o caso em se tratando do polimorfismo

investigado que apresenta proporção compatível a outras populações caucasianas onde foi investigado.

O número de investigações descrevendo associações entre variações de sequência de DNA em genes específicos e fenótipos da obesidade tem aumentado consideravelmente nestes últimos anos. Aproximadamente 426 genes já foram estudados apresentando algum nível de associação positiva com a obesidade. Destes, 127 genes são fortes candidatos a serem considerados “genes da obesidade” (RANKINEN *et al.*, 2006). Porém, a associação entre genes de citocinas e obesidade tem sido menos estudada, principalmente relacionada a IL-1 β .

O genótipo ,de qualquer gene, sempre é herdado dos pais (alelo materno e alelo paterno) podendo ou não gerar fenótipos diferentes conforme o tipo ou a quantidade de proteína estrutural ou funcional que é produzida pela célula. Essa determinação genética ocorre tanto em proteínas relacionadas à formação de traços estruturais do corpo como a cor dos olhos, dos cabelos, da pele, a conformação do corpo, bem como a moléculas peptídicas e protéicas relacionadas ao metabolismo bioquímico e fisiológico o qual inclui enzimas, citocinas e outras moléculas.

Desse modo, a citocina IL-1 β não é uma proteína constitutiva e, portanto, não é expressa nas mesmas concentrações em todos os tecidos do corpo durante o tempo todo. A modulação da IL-1 β depende do tipo de tecido e do estado pró-inflamatório ou não inflamatório do organismo. Por ser uma proteína inflamatória com uma potente ação o corpo precisa controlar a produção da IL-1 β de modo rigoroso. Quando esse controle é interrompido, como ocorre em estados inflamatórios de baixo nível encontrados na obesidade, aterosclerose e diabetes *mellitus* do tipo 2, os efeitos desta molécula podem acelerar ou aguçar a evolução destes distúrbios e suas complicações clínicas .

Em termos funcionais, além da IL-1 β ser uma molécula chave no desencadeamento da resposta inflamatória, essa também regula a resposta imune através da promoção da expressão de outras citocinas, como a IL-6 e IL-12 (KARASNEH *et al.*, 2003; HE *et al.*, 2006). Dado o seu papel na função imune, muitos estudos indicaram que alterações na produção da IL-1 β estão associadas ao desenvolvimento de muitas doenças não transmissíveis, incluindo infarto agudo no miocárdio ou derrame, diabetes tipo 2, osteoartrite, câncer gástrico e até mesmo a obesidade (KORNAMAM *et al.*, 1997; EL-OMAR *et al.*, 2000; LICASTRO *et al.*, 2004; STRANDBERG *et al.*, 2008; DINARELLO, 2011).

Portanto, acredita-se que a associação entre o polimorfismo estudado e a obesidade não seja um produto do acaso. Entretanto, o presente trabalho postula que se a IL-1 β é uma proteína, com efeito, glicolipotóxico essa condição também alteraria outras moléculas e funções metabólicas do organismo (POITOUT E ROBERTSON, 2008; GABRIANO E STURLEY, 2009).

Para tanto, foi testada a potencial influência do polimorfismo nos níveis sanguíneos de glicose, do perfil lipídico e do LDL-oxidado. No presente estudo a influência do polimorfismo +3953 do gene IL-1B nos níveis glicêmicos não chegou a ser tão marcante. Outros estudos mostraram que a IL-1 β reduz a sinalização da insulina e a entrada de glicose nas células, e podendo levar, inclusive à morte das células β do pâncreas (MATSUKI *et al.*, 2003; MEADLER *et al.*, 2002). Assim, o aumento da IL-1 β tem sido associado à resistência insulínica e a potencial evolução do diabetes tipo 2. Entretanto, este estudo do efeito glicotóxico da IL-1 β não foi observado quando se comparou o nível de glicemia entre indivíduos com diferentes genótipos. Porém, para confirmar a baixa influência do polimorfismo no metabolismo glicêmico se faz necessária a avaliação complementar de outros marcadores

relacionados à modulação da glicemia incluindo os níveis de insulina e de hemoglobina glicada.

Já o efeito do polimorfismo da IL-1 β nos níveis de LDL-ox observados neste estudo, considerando a literatura publicada até o presente momento, é um resultado novo. Porém, tal resultado corrobora investigações prévias que descreveram que o LDL-ox tem capacidade de indução de monócitos a produzirem diversos tipos de citocinas inflamatórias incluindo a IL-1 β (PERSSON *et al.*, 2006; PASINI *et al.*, 2007; CHÁVEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2010). Contudo, estudos complementares precisam ser conduzidos para confirmar tal associação.

Com base nos resultados aqui obtidos, é importante também ser discutido o possível mecanismo causal relacionado ao alelo T que interferiria diminuindo a suscetibilidade a obesidade e aos níveis aumentados de LDL-oxidado.

A relevância deste achado relaciona-se a um corpo grande de evidências que tem associado o LDL-ox com a formação das células espumosas na camada sub-endotelial. A formação dessas células desencadeia o início da aterogênese que é considerado um processo inflamatório crônico. Estudos prévios observaram que o LDL-ox induz os macrófagos a secretar diversas moléculas inflamatórias incluindo a IL-1 β (KU *et al.*, 1992). O aumento nos níveis de IL-1 β , por sua vez, estimula a super expressão da molécula PDGF pelas células musculares lisas dos vasos sanguíneos. Essa molécula estimula a migração e proliferação das células musculares lisas que passam a formar uma espécie de “capa” envolta das células espumosas constituindo assim o ateroma (HOLVOET E COLLEN, 1994).

Portanto, o LDL-ox está diretamente relacionado aos processos que envolvem a formação da placa da aterosclerose. Em um estudo anterior *in vitro* mostrou que a incubação com VLDL aumenta a expressão de IL-1 β pelos macrófagos numa

maneira dependente de caspase-2, sugerindo um efeito pró-inflamatório dos lipídios carregados com lipoproteínas ricas em triacilglicerol (STOLLENWERK *et al.*, 2005). É de suma importância comentar que investigações também têm descrito associação entre polimorfismos do gene da IL-1B incluindo o +3953 com níveis de outros marcadores inflamatórios como é o caso da PCR (KIKUCHI *et al.*, 2007; ENQUOBAHRIE *et al.*, 2009).

Portanto, o presente estudo corrobora à associação entre a IL-1 β e o LDL-ox sugerindo que não só o aumento dos níveis de LDL-ox podem induzir o aumento dos níveis de IL-1 β , mas que o contrário também é verdadeiro. Isso significa que, pode existir um circuito de retroalimentação positiva entre essas moléculas e outras citocinas inflamatórias bem como outras moléculas lipídicas que potencialmente se relacionam aos estados inflamatórios de baixo grau observados na obesidade e na aterosclerose.

Essa sugestão se apoia em estudos prévios sobre o polimorfismo IL-1B +3953 que indicaram que o mesmo é funcional, afetando a produção dos níveis da IL-1 β (CULLUP *et al.*, 2001). Evidências mostraram que o alelo T interfere diferencialmente na produção da IL-1 β , aumentando os níveis desta citocina quando comparado com os níveis produzidos a partir de indivíduos portadores do alelo C (KORNMAN, 1997; POCIOT *et al.*, 1999). Em outras palavras, os sujeitos portadores do genótipo TT do polimorfismo +3953 do gene da IL-1B produzem potencialmente concentrações mais elevadas de IL-1 β do que os sujeitos que carregam os genótipos TC/CC.

Especulações sobre o possível efeito causal dessa associação também tem sido feitas. Strandberg e colaboradores (2006) sugeriram que o possível efeito da IL-1 na obesidade envolve a mediação desta molécula de outras moléculas regulatórias

importantes como a leptina. Essa hipótese está baseada em estudos como o de Luheshi e colaboradores (1999) que observaram que IL-1 β é expressa no hipotálamo, e os níveis dessa citocina são aumentados pela leptina e reduzidos pelo jejum. A IL-1 β também parece inibir a diferenciação de adipócitos a partir de pré-adipócitos, e também, diminuir o conteúdo de lipídios dos adipócitos maduros (SIMONS *et al.*, 2005). Adicionalmente, a IL-1 pode aumentar a secreção de leptina dos pré-adipócitos e parece essencial à liberação de leptina induzida pela inflamação do tecido adiposo (FAGGIONI *et al.*, 1998; SIMONS *et al.*, 2005).

No entanto, um paradoxo é levantado, o genótipo TT que produz maior quantidade de IL-1 β confere maior proteção a obesidade e a níveis elevados de LDL-ox. Uma das possíveis explicações para tal fenômeno talvez esteja relacionada à instabilidade da molécula de IL-1 β sintetizada a partir do alelo C e do alelo T. Caso, mesmo ocorrendo maior produção de IL-1 β essa poderia ter uma taxa de degradação mais elevada impedindo a produção continuada da citocina inflamatória que tende a ocorrer nos estados obesogênicos e aterogênicos. Assim, o alelo T teria uma resposta inflamatória aguda e o alelo C uma resposta inflamatória crônica. No entanto, esta hipótese precisa ser testada a partir de estudos complementares.

A outra hipótese pode estar relacionada com a IL-1 β sintetizada pelos diferentes alelos T e C do polimorfismo +3953. Após a sua indução, a IL-1 β necessita ser clivada para se transformar na forma madura. Essa clivagem ocorre pela ação da caspase-1 (ARULKUMARAN *et al.*, 2011). Esse processo pode apresentar algum nível de alteração que afete a função da IL-1 β e por consequência a influência na obesidade e nos níveis de LDL-ox. Essa questão baseia-se na ideia de que uma produção maior de transcritos que dão origem a pró-IL-1 β , não é diretamente proporcional à produção da IL-1 β madura liberada para o meio

extracelular. Outro ponto que pode explicar esse paradoxo, seria , como ocorre na leptina, os receptores da IL-1 β apresentariam algum tipo de modificação na sua estrutura que dificultasse a IL-1 β sintetizada a partir do alelo C se encaixar corretamente e assim ter seu efeito reduzida, apesar de ter sua expressão e síntese aumentada. Porém, estudos nesta área precisam ser realizados.

Com base nas evidências publicadas na literatura e aqui encontradas, o polimorfismo +3953 do gene IL-1B corrobora a sugestão de que a interleucina 1 β é uma molécula lipotóxica. A Figura 1 apresenta uma síntese com efeito potencial do polimorfismo relacionado à obesidade e aos níveis alterados de LDL-ox considerando os dois genótipos homozigóticos.

Parece então que a IL-1 β , é uma molécula de fundamental importância para regulação da homeostase corporal e possui efeitos obesogênicos e lipotóxicos relevantes. A maior frequência do alelo C na população poderia estar relacionada à hipótese de que, apesar de 10 mil anos de evolução, a frequência dos genes humanos ainda são as mesmas dos tempos pré-históricos. No caso, esses seriam selecionados pela sua maior eficiência em armazenar energia. Entretanto, nos dias de hoje, a grande oferta de alimentos e principalmente os altos níveis de sedentarismo contribuiriam para o estabelecimento da obesidade e de estados lipotóxicos desencadeados por moléculas como os ácidos graxos e parece que também pela interleucina 1 β .

Apesar das evidências aqui descritas estudos complementares deverão ser conduzidos a fim de elucidar se a regulação dos níveis da IL-1 β ocorre de modo diferenciado conforme o genótipo do polimorfismo + 3953. E também a influência desse polimorfismo na regulação de outros marcadores oxidativos e inflamatórios precisará ser mais bem investigada.

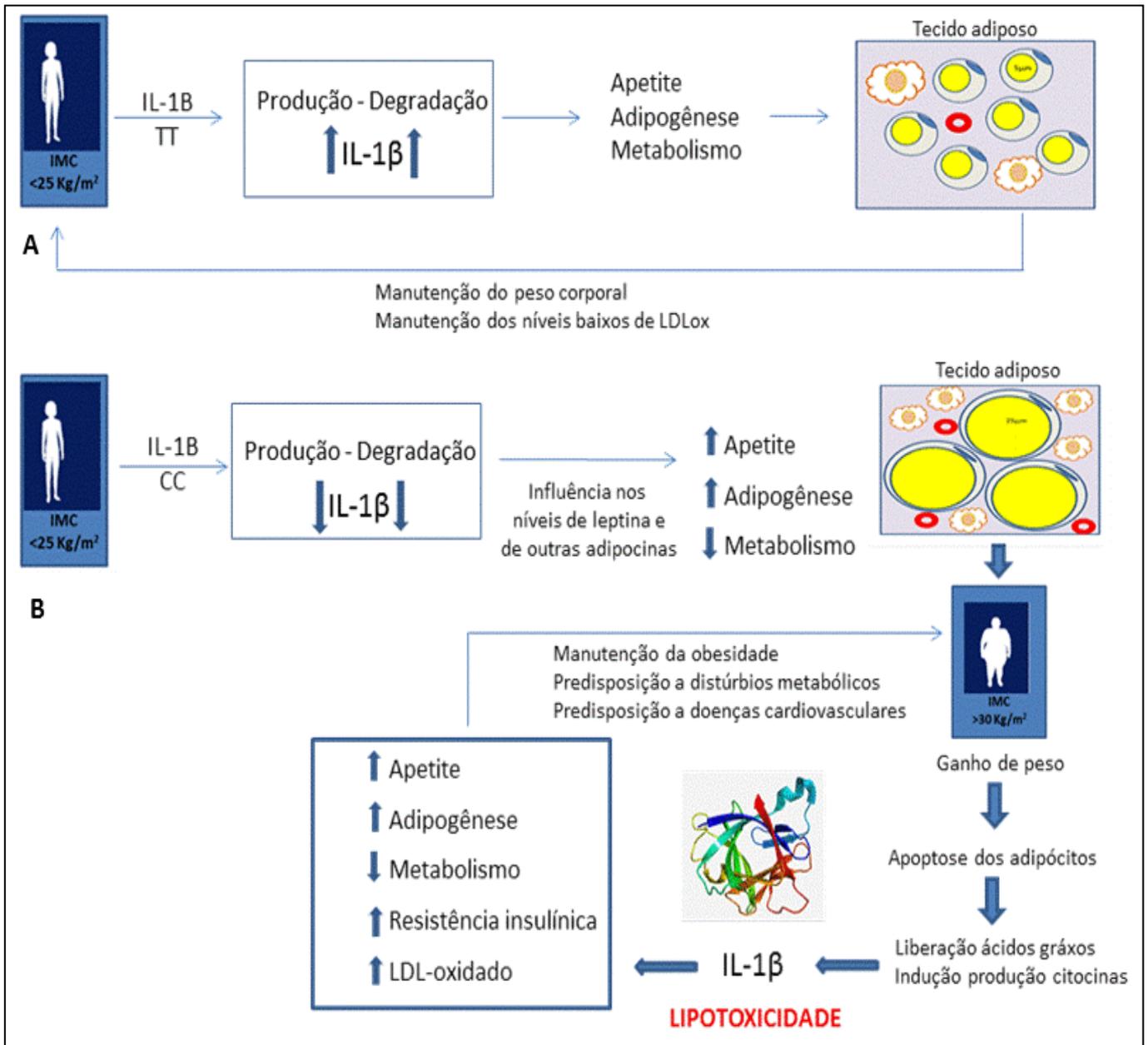


Figura 1. Síntese do potencial efeito lipotóxico da IL-1 β a partir das evidências obtidas no polimorfismo +3953 IL-1B. A= o genótipo TT, potencialmente produziria maior quantidade de IL-1 β que seria inativado mais rapidamente dificultando o estabelecimento de um processo inflamatório crônico de baixo grau. Esta condição auxiliaria na manutenção do equilíbrio entre ingestão e gasto energético e assim na manutenção do peso corporal. B= o genótipo CC, por apresentar uma produção menor de IL-1 β com uma taxa de inativação também menor propiciaria o aparecimento de um quadro obesogênico induzindo aumento do apetite, diminuição da taxa metabólica através da sua ação na modulação da leptina, induziria o estabelecimento de um quadro inflamatório crônico através do estímulo da produção de outras citocinas inflamatórias e também da própria IL-1 β . O ganho de peso elevado, por sua vez levaria a apoptose dos adipócitos com elevação dos níveis de ácidos graxos no sangue. Esta condição estimularia o circuito inflamatório com aumento continuado na produção da IL-1 β que passaria a exercer efeitos lipotóxicos incluindo aumento nos níveis de LDL-oxidado.

6 CONCLUSÃO

No presente estudo foi observada:

- a associação positiva entre este polimorfismo IL-1B +3953 com a obesidade foi independente do sexo e da idade dos indivíduos amostrados. Sendo que o genótipo CC apresentou maior prevalência nos indivíduos obesos e, portanto maior risco de obesidade. O alelo T apresentou uma baixa frequência na população e menor prevalência em indivíduos obesos o que sugere um efeito protetor;
- associação entre o polimorfismo IL-1B +3953 com os níveis de LDL-ox. Portadores do genótipo TT apresentaram níveis mais baixos de LDL-ox do que os portadores dos genótipos CC e CT. Sugerindo que o genótipo TT tenha um efeito protetor.
- que a associação entre o polimorfismo IL-1B +3953 e os níveis de LDL-ox foi independente do sexo e da idade e também da obesidade dos indivíduos amostrados;
- a não ocorrência de associação do polimorfismo IL-1B +3953 com a glicemia e outros marcadores bioquímicos investigados;
- O conjunto dos resultados corrobora evidências prévias e sugere que a IL-1 β é uma molécula com ação obesogênica e lipotóxica.

7 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.; POBER, J. *Imunologia celular molecular*. Rio de Janeiro. **Revinter**, 1998.

AILHAUD, G., HAUNER, H. Development of White adipose tissue. In: Bray AGB, editor. *Handbook of obesity: etiology and pathophysiology*. Nova York, EUA: **Marcel Decker**. 2004.

ANDERSSON, N. et al. Variants of the interleukin-1 receptor antagonist gene are associated with fat mass in men. **International Journal of Obesity**. v.33, n.5, p.525-533, maio, 2009.

ARULKUMARAN, N.; UNWIN, R.J.; TAM, F.W.K. A potential therapeutic role for P2X7 receptor (P2X7R) antagonist in the treatment of inflammatory diseases. **Expert opinion on Investigation Drugs**. v.20, n.7, p.897-915, julho, 2011.

BASTARD, J.P. et al. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. **European Cytokine Network**. v.17, n.1, p.4-12, 2006.

BARRES, R; ZIERATH, J.R. DNA methylation in metabolic disorders. **American Journal of Clinical Nutrition**. v.93, n.4, p. 897-900, 2011.

BERG, A.H., SCHERER, P.E. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. **Circulation Research**. v.96, p.939–949, março, 2005.

BIRSE, R.T; BODMER, R. Lipotoxicity and cardiac dysfunction in mammals and drosophila. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**. V.46, n.5, p.376-385, agosto, 2011.

BORRADAILE, M.N, et al. Disruption of endoplasmic reticulum structure and integrity in lipotoxic cell death. **Journal of Lipid Research**. v.46, n.12, p. 2726–2537, dezembro, 2006.

BULLÓ, M. et al. Systemic inflammation, adipose tissue tumor necrosis factor, and leptin expression. **Obesity Research**, v.11, n.4, p.525–531, abril, 2003.

- BUCHS, N. et al.. IL-1B and IL-1Ra gene polymorphism and disease severity in rheumatoid arthritis: interaction with their plasma levels. **Gene & Immunity**. v.2,n.4, p. 222-228, junho, 2001.
- COLEMAN, R.A.; Lee D.P. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. **Progress in Lipid Research**. v.43, n.2, p.134-176, março, 2004.
- COTTAM, D.R. et al. The Dysfunctional immune-privilege in morbid obesity: implications and effect of gastric bypass surgery. **Obesity Surgery**. v.13, n.1,p. 49-57, fevereiro, 2003.
- CARTER, K.W.et al. Association of Interleukin-1 gene polymorphisms with central obesity and metabolic syndrome in a coronary heart disease population. **Human Genetics**. v.124,n.3, p.199-206,outubro, 2008.
- CIPOLLETTA, C. et al. Activation of peripheral blood CD14+ monocytes occurs in diabetes. **Diabetes**. v. 54, n.9, p. 2779-2786, setembro, 2005.
- CULLUP, H. et al. Donor interleukin 1 receptor antagonist genotype associated with acute graft-versus-host disease in human leukocyte antigen-matched sibling allogeneic transplants. **British Journal of Haematology**. n.113, p.807-813, janeiro, 2001.
- DAS, U.N. Is obesity an inflammatory condition? **Nutrition**. v.17, n. 11-12, p 953–966, dezembro, 2001.
- DE FRONZO, R.A. Dysfunctional fat cells, lipotoxicity and type 2 diabetes. **Journal of Clinical Practice**. v. 143, p.9-12, outubro, 2004.
- DELAIGLE, A. et al. Induction of adiponectin in skeletal muscle of type 2 diabetic mice: in vivo and in vitro studies. **Diabetologia**. v.49, n.6, p.1311–1323, junho, 2006.
- DESRUISSEAU, N.S. et al. Adipocyte, adipose tissue and infectious diseases. **Infection and Immunity**. v. 75, n.3, p. 1066-1078, março, 2007.
- DI RENZO, et al.. Interleukin-1 (IL-1) receptor antagonist gene polymorphism in normal weight obese syndrome: relationship to body composition and IL-1 alpha and beta plasma levels. **Pharmacology Research**. v.55, n.2, p.131-138, fevereiro, 2007.
- DINARELLO, C.A. Biology of interleukin-1. **The FASEB Journal**. v.2, n.2, p.108-115, fevereiro, 1988.
- DINARELLO, C.A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. **Blood**. v.87, n.6, p.2095-2147, março, 1996.

DINARELLO, CA: Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. **International Reviews of Immunology** v.16, n.5, p.457– 499, março, 1998.

DINARELLO, CA. Interleukin-18 and the pathogenesis of inflammatory diseases. **Seminars in Nephrology**. v.27, n.1, p.98–114, janeiro, 2007.

DINARELLO, C.A. Blocking interleukin-1 β in acute and chronic autoinflammatory diseases. **Journal of Internal Medicine**. n.269, p. 16-28, 2011.

DOERRLER, W.; FEINGOLD, K.R.; GRUNFELD, C. Cytokines induce catabolic effects in cultured adipocytes by multiple mechanisms. **Cytokine**. v.6, n.5, p.478–484, setembro, 1994.

DOMOUZOGLOUS, E.M.; MARATOS-FLIER, E. Fibroblast growth factor 21 is a metabolic regulator that plays a role in the adaptation to ketosis. **American Journal of Clinical Nutrition**. v.93, n.4, p. 901-905, junho, 2011.

DUARTE, M.M.F. et al. Oxidative stress in hypercholesterolemia and its association with Ala 16Val superoxide dismutase gene polymorphism. **Clinical Biochemistry**. v.43, n., p. 1118-1123, julho, 2010.

EL-OMAR, E.M. et al. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. **Nature**. v.404, n. 6776, p.398–402, março, 2000.

ENDRES, S. et al. In vitro production of IL1 β , IL1 α TNF and IL2 in healthy subjects: distribution, effect of cyclooxygenase inhibition and evidence of independent gene regulation. **European Journal of immunology**. v., n.19, p.2327-2333, mês. 1989.

ENQUOBAHRIE, D.A. et al. IL1B genetic variation and plasma C-reactive protein level among young adults: The CARDIA study. **Atherosclerosis**. v. 202, n.2, p. 513–520, fevereiro, 2009.

FAGGIONI, R. et al. IL-1 β mediates leptin induction during inflammation. **American Journal of Physiology**. v.274, n1., p. 204–208, janeiro, 1998.

FAIN, J.N. et al. Resistin release by human adipose tissue explants in primary culture. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 300, n.3, p.674–678, janeiro, 2003.

FARSHAD, S. et al. Antimicrobial susceptibility of Helicobacter pylori strains isolated from patients in Shiraz, Southern Iran. **World Journal of Gerontology**. v.16, n.45, p.5746-5751, dezembro, 2010.

- FERNANDEZ-MARCOS, P.J; AUWERX, J. Regulation of PGC-1 α , a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. **American Journal of Clinical Nutrition**. v.93, n.4, p. 8845-8905, abril, 2011.
- FINCK, B.N. et al. The cardiac phenotype induced by PPAR α overexpression mimics that caused by diabetes mellitus. **Journal of Clinical Investigation**. v.109, n.1, p.121–130, janeiro, 2002.
- FRISARD, M; RAVUSSIN, E. Energy metabolism and oxidative stress: impact on the metabolic syndrome and the aging process. **Endocrine**, v.29, n.1, p.27-32, fevereiro, 2006.
- FUKUHARA, A, et al. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. **Science**.v. 307, n.5708, p.426-430, janeiro, 2005.
- FURUKAWA, S. et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **Journal of Clinical Investigation**.v.114, n.12, p1752-1761, dezembro, 2004.
- GABRIANO, J; STURLEY, S.L. Saturated fat: new perspectives on lipotoxicity. **Current Opinion in Clinical Nutrition Care**. v.12, n.2, p.110-116, março, 2009.
- GAUTRON, L.; ELMQUIST, J.K. Sixteen years and counting: an update on leptin in energy balance. **Journal of Clinical Investigation**. v.121, n.6, p.2087-2093, junho, 2011.
- GARCIA,M.C. et al. Mature-onset obesity in interleukin-1 receptor I knockout mice. **Diabetes**.v.5, p.1205–1213, maio, 2006.
- GIRN, H.R.S.; ORSBI, N.M.; HOMER-VANNIASINKAM, S. An overview of cytokine interactions in atherosclerosis and implications for peripheral arterial disease. **Vascular Medicine**. v.12, n.4, p. 299-309, novembro., 2007.
- GOONES, L. et al. Weight parameters and pathological eating as predictors of obesity treatment outcome in children and adolescents. **Eating Behaviors**. v.10, n.1, p.71-73, janeiro, 2009.
- GOODPASTER, B.H. et al. Obesity, regional body fat distribution, and the metabolic syndrome in older men and women. **Archives of Internal Medicine**. v.165, n.7, p.777–783, mês, 2005.
- GOTTLIEB, MG. et al. Association between the Gln223Arg polymorphism of the leptin receptor and metabolic syndrome in free-living community elderly. **Metabolic Syndrome and Related Disorders**. v.7,n.4, p.341-348, agosto, 2009.

GREGOIRE, F.M. et al. Understanding adipocyte differentiation. **Physiological Reviews**. v.78, n.3, p. 783-809, janeiro, 1998.

GREGOR, M.F; HOTAMISLIGIL, G.S. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease. **Journal of Lipid Research**. v.48, n.9, p.1905-1914, maio, 2007.

HAMON, Y. et al. Interleukin-1 β secretion is impaired by inhibitors of the ATP binding cassette transport, ABC1. **Blood**. v.90, n.8, p.2911- 2915, outubro, 1997.

HAN, T.S. et al. The influences of height and age on waist circumferences as an index of adiposity in adults. **International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders**. V. 21, n.1, p. 83-89, janeiro, 1997.

HARDIE, D.G. Sensing of energy and nutrients by AMP-activated protein kinase. **American Journal of Clinical Nutrition**. v.93, n.4, p.891-896, 2011.

HAUNER, H. The new concept of adipose tissue function. **Physiology and Behavior**. v.83, n.4, p.653-658, dezembro, 2004.

HE, X.; JIANG, L.; FU, B. ZHANG, X. Relationship between interleukin-1B and interleukin-1 receptor agonist gene polymorphism and susceptibility to gastric cancer. **Journal of Jiangsu University**. v.16, p.339-341,2006.

HIGDON, J.V; FREI, B. Obesity and oxidative stress: a direct link to CVD? **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**. v.23, n.3, p. 365-367, março, 2003

HIGGINS, G.C. et al. Interleukin 1 beta propeptide is detected intracellularly and extracellularly when human monocytes are stimulated with LPS in vitro. (1994) **Journal of Experimental. Medicine**.v. 180, n.2, p 607-614, agosto. 1994.

HJELMBORG, J.B. et al. Genetic influences on growth traits of BMI: a longitudinal study of adult twins. **Obesity**, v.16, n.4, p.847–852, setembro, 2008.

HOTAMISLIGIL, G.S; SHARGILL, N.S; SPIEGELMAN, B.M. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha:direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**. v.259, n.5091, p.87–91, janeiro,1993.

HOTAMISLIGIL, G.S. Endoplasmic reticulum and the inflammatory basis of metabolic disease. **Cell**. v.140, n.6, p. 900-917, março, 2010.

HOLVOET, P.; COLLEN, D. Oxidized lipoproteins in atherosclerosis and thrombosis. **FASEB Journal**. v.8, n.94, p.1279-1284, 1994.

HOVOELT, P. et al., Association between circulating oxidized low-density lipoprotein and incidence of the metabolic syndrome. **JAMA**. v.299, n.19, p. 2287-2293, maio, 2008.

HULKKONEN, J.; LAIPPALA, P.; HURME, M. A rare allele combination of the interleukin-1 gene complex is associated with high interleukin-1 beta plasma levels in healthy individuals. **European Cytokine Network**. v.11,n., p.251-255, junho, 2000.

HUTLEY, L.; PRINS, J.B. Fat as an endocrine organ: relationship to the metabolic syndrome. **American Journal of the Medicine Sciences**. v.330, n.6, p.280-289, dezembro, 2005.

JAGER, J. et al. Interleukin-1beta-induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of insulin receptor substrate-1 expression. **Endocrinology**. v.148, n.1, p. 241–251, janeiro., 2007.

JENSEN, M.D. Health consequences of fat distribution. **Hormone Research**. v. 48, suppl 5: p.88-92, 1997.

JO, J. et al. Hypertrophy and/or hyperplasia: Dynamics of adipose tissue growth. **PLoS Computacional Biology**. v.5, n.3, p 1000324, março, 2009.

KAMPF, C. et al. Marked increase in white adipose tissue blood perfusion in the type 2 diabetic GK rat. **Diabetes**. v.54, n.9, p.2620-2627. Setembro, 2005.

KANEMAKI, T. et al. Interleukin 1beta and interleukin 6, but not tumor necrosis factor alpha, inhibit insulin-stimulated glycogen synthesis in rat hepatocytes. **Hepatology**. v.27, n.5, p.1296 –1303, dezembro, 1998.

KARASNEH, J. et al. Association of specific interleukin 1 gene cluster polymorphism with increased susceptibility for Behçet's disease. **Rheumatology**. v.42, n.7, p.339-341, abril, 2003.

KHOVIDHUNKIT, W. et al. Effects of unfection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanism and consequences to the host. **Journal of Lipid Research**. v.45, n.7, p. 1169-1196. abril, 2004.

KIKUCHI. M. et al. Associations between Serum C-reactive Protein (CRP) Levels and Polymorphisms of CRP, Interleukin 1B, and Tumor Necrosis Factor Genes among Japanese Health Checkup Examinees. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**. v.8, n.1, p. 87-92, Janeiro-Março, 2007.

KLYDE, B.J; HIRSH, J. Isotopic labeling of DNA in rat adipose tissue: evidence for proliferating seek association with mature adipocyte. **Journal of Lipid Research**. v.20, n.6, p. 691-704, agosto, 1979.

KOBAYASHI, Y. et al. Interaction of the pre-domain of interleukin-1 with the mature domain. **Journal of Biochemistry**.v. 121, n.5,p.896-901, maio, 1997.

KONIECZNY S.F.; EMERSON C.P JR. 5-Azacytidine induction of stable mesodermal stem cell lineages from 10T1\2 cells: evidences of a regulatory genes controlling determination. **Cell**. v.38, n.3, p.791-800, outubro, 1984.

KORNMAN, K.S A. et al. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. **Journal of Clinical Periodontology**. v.24, n.1, p.72-77, janeiro, 1997.

KU, G. et al - Induction of interleukin 1 beta expression from human peripheral blood monocyte-derived macrophages by 9-hydroxyoctadecadienoic acid. **Journal Biology Chemistry**. v.267, n., p.14183-14188, mes,1992.

LAVROVSKY, Y. et al. Role of redox-regulated transcription factors in inflammation, aging and age-related diseases. **Experimental Gerontology**. v.35, n.5, p.521–532, agosto, 2000.

LATKOVSKI, G., LICIS, N., KALNINS, U. C-reactive protein levels and common polymorphism of the interleukin -1 gene cluster and interleukin -6 gene in patients with coronary heart disease. **European Journal of Immunogenetics**. v.31, n.5, p. 207-213, outubro, 2004.

LEONARD, W.R; ROBERTSON, M.L. Evolutionary perspectives on human nutrition: The influence of brain and body size on diet and metabolism. **American Journal of Human Biology**. v.6, n.1, p.77–88,1994.

LEE, Y. et al. β Cell lipotoxicity in the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus of obese rats: impairment in adipocyte- β -cell relationships. **Proceeding National Academy Science USA**. v. 91, n.23, p.10878–10882, novembro, 1994.

LEE, J.H. et al. Interleukin-1 beta gene polymorphism and traditional constitution in obese women. **International Journal of Neuroscience**. v.118, n.6, p.793-805, jun., 2008.

LIBBY, P.; SUKHOVA, G.; LEE, R.T.; GALIS, Z.S. Cytokines regulate vascular functions related to stability of the atherosclerotic plaque. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**. v. 25, sup. 2, p.S9-12,1995.

- LICASTRO, F. et al. The concomitant presence of polymorphic alleles of interleukin-1beta, interleukin-6 and apolipoprotein E is associated with an increased risk of myocardial infarction in elderly men. Results from a pilot study. **Mechanism of Ageing Development**.v.125, n.8, p. 575-579, agosto, 2004.
- LIN, Y, et al. The hyperglycemia-induced inflammatory response in adipocytes: the role of reactive oxygen species. **Journal of Biological Chemistry**. v.280, n.6, p.4617-4626, 2005.
- LOOS, R.J.F. Recent progress in the genetics of common obesity. **British Journal of Clinical Pharmacological**. v.68, n.6, p.811-829, dezembro, 2009.
- LUHESHI, G.N. et al. Leptin actions on food intake and body temperature are mediated by IL-1. **Proceeding of the National Academy of Sciences USA**. v.96,n.12, p.7047–7052, junho, 1999.
- MACKENZIE A, et al. Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. **Immunity**. v. 15, n.5, p.825–835, novembro, 2001.
- MADDUX, B.A. et al. Protection against oxidative stress-induced insulin resistance in rat L6 muscle cells by micromolar concentrations of α -lipoic acid. **Diabetes**. v.50, n.2, p.404–410, fevereiro, 2001.
- MASELLA, R. et al. Oxidised LDL modulate adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes by affecting the balance between cell proliferation and differentiation. **FEBS Letters**. v.580, n.10, p.2421–2429, maio, 2006.
- MATSUKI, T.; HORAI, R.; SUDO, K.; IWAKURA, Y. IL-1 plays an important role in lipid metabolism by regulating insulin levels under physiological conditions. **Journal of Experimental Medicine**.v.198, n.6, p.877–888, set., 2003.
- MAZIÈRE, C. et al. Inhibition of insulin signaling by oxidized low density lipoprotein: protective effect of the antioxidant vitamin E. **Atherosclerosis**. v.175, n.1, p.23-30, julho, 2004.
- MEADLER, K. et al. Glucose-induced beta cell production of IL-1beta contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. **Journal of Clinical Investigation**. v.110, n.6, p.851–860, setembro,2002.
- MERKEL, M. et al. Inactive lipoprotein lipase (LPL) alone increases selective cholesterol ester uptake in vivo, whereas in the presence of active LPL it also increases triglyceride hydrolysis and whole particle lipoprotein uptake. **Journal of Biological Chemistry**. v.277, n.9, p.7405–7411, 2002.

MOHAMED-ALI V. et al. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. v.82, n.12, p. 4196-4299, dezembro, 1997.

MOLVIG, J. et al. Endotoxin-stimulated human monocyte secretion of interleukin-1, tumor necrosis factor alpha, and prostaglandin E2, show stable interindividual differences. **Scandinavian Journal of Immunology**. v.27, n.6, p. 705-716, junho, 1988.

MONTANO, M.A.E.; LERA, J.P.B.; GOTTLIEB, M. G. V.; SCHAWNKE, C. H. A.; ROCHA, M. I. U. M.; MANICA-CATTANI, M.F.; SANTOS, G. F.; CRUZ I.B.M. Association between manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene polymorphism and elderly obesity. **Molecular Cellular Biochemistry**. v.328, n.1, p.33-40, março, 2009.

MUTCH, N.J; WILSON, H.N.; BOOTH, N.A. Plasminogen activator inhibitor-1 and haemostasis in obesity. **Proceedings of the Nutrition Society**. v.60, n.3, p.341-347, agosto, 2001.

NATHAN, C. Epidemic inflammation: pondering obesity. **Molecular Medicine**. v.14, n.7-8, p. 485-492, julho, 2008.

NICKLIN, M.J.; WEITH, A.; DUFF, G.W. A physical map of the region encompassing the human interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-1 receptor antagonist genes. **Genomics**. v.19, n.2, p.382-384, janeiro, 1994.

NISHIKAWA, T., et al.. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. **Nature**. v.404, n.6779, p.787-790, agosto, 2000

NISHIMURA, S. et al. Adipogenesis in obesity requires close interplay between differentiating adipocytes, stromal cells, and blood vessels. **Diabetes**. v.56, n.6, p.1517-1526, junho, 2007.

NOV, O. et al. Interleukin-1beta may mediate insulin resistance in liver-derived cells in response to adipocyte inflammation. **Endocrinology**. v.151, n.9, p.4247-56, setembro, 2010.

OGURA Y, SUTTERWALA FS, FLAVELL RA. The inflammasome: First line of the immune response to cell stress. **Cell**. v.126, n.4, agosto, p.659-662, 2006.

OUEDRAOGO, R. et al. Adiponectin suppression of high-glucose-induced reactive oxygen species in vascular endothelial cells: evidence for involvement of a cAMP signaling pathway. **Diabetes**. v.55, n.6, p.1840-1846, junho, 2006.

PACHER, P.; BECKMAN, J.S.; LIAUDET, L. Nitrite oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiology Reviews**. v.87, n.1, p.315–424, janeiro, 2007.

PANG, C. et al. Macrophage on filtration into adipose tissue may promote angiogenesis for adipose tissue remodeling in obesity. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**. v.295, n.2, p.313-322, maio, 2008.

PARKHILL, J.M. et al. Association of interleukin-1 gene polymorphism with early-onset periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**. v.27, n.9, p. 682-689, setembro, 2000.

PARRA, F.C. et al. Color and genomic ancestry in Brazilians, **Proceedings of the National Academy of Science**. v.100, n.1, p.177–182, janeiro, 2003

PERSSON, J.; NILSSON, J.; LINDHOLM, M.W. Cytokine response to lipoprotein lipid loading in human monocyte-derived macrophages. **Lipids in Health and Disease**. v. 5, n.17, p.1-8, junho, 2006.

PICCOLI, J.C. et al. Association between 894G>T endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and metabolic syndrome. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**. v.52, n.8, p.1367-1373, novembro, 2008.

POCIOT, F. et al.. A Taq I polymorphism in the human interleukin -1 β (IL-1 β) gene correlates with IL-1 β secretion in vitro. **European Journal of Clinical Investigation**. v.22, n.6, p. 396-402, junho, 1992.

POITOUT, V.; ROBERTSON, R.V. Glucolipototoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction. **Endocrine Reviews**, v.29, n.3, p.351-366, novembro, 2008.

PURNELL, J.Q. et al. Enhanced cortisol production rates, free cortisol, and 11 β -HSD expression correlate with visceral fat and insulin resistance in men: effect of weight loss. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**. v.296, n.2, p.351-357, fevereiro, 2009

QUEIRÓZ J.C.F. et al. Controle da adipogênese por ácidos graxos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**. v.53, n. 9, p.582-594, dezembro, 2009.

RANKINEN, T. et al. The human obesity gene map the 2005 update. **Obesity**. v.14, n.4, p. 529-644, abril, 2006.

RECH R.L. et al. Association between periodontal disease and acute coronary syndrome. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. v.88, n.2, p.185-90, fevereiro, 2007.

REILLY, M.P. et al. Resistin is an inflammatory marker of atherosclerosis in humans. **Circulation**. v.111, n.7, p.932–939, fevereiro, 2005.

ROSS, S.E., et al. Microarray analyses during adipogenesis: understanding the effects of Wnt signaling on adipogenesis and the roles of liver X receptor alpha in adipocyte metabolism. **Molecular and Cellular Biology**. v.22, n.16, p.5989–5999, agosto, 2002.

ROTH, MD. Evolutionary Speculation About Tuberculosis and the Metabolic and Inflammatory Processes of Obesity. **JAMA**. v.301, n.24, p.2586-2588, junho, 2009.

SAGHIZADEH, M., et al. The expression of TNF alpha by human muscle. Relationship to insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**. v.97, n., p.1111–1116, fevereiro, 1996.

SANTILLA, S.; SAVINAINEN, K.; HURME, M. Presence of the IL-1RA allele 2 (IL1RN*2) is associated with enhanced IL-1 beta production in vitro. **Scandinavian Journal of Immunology**. v., n.47, p.195-198, 1998.

SALVEMINI D.; ISCHIROPOULOS, H.; CUZZOCREA S. Roles of nitric oxide and superoxide in inflammation. **Methods in Molecular Biology**, v 225, n.3, p.219-303, abril, 2003.

SCHENKE, D.C.; CAREW, T.E. Initiation of atherosclerosis lesions in cholesterol-fed rabbits, II: selective retention of LDL vs selective increases in LDL permeability in susceptible sites of arteries. **Arteriosclerosis**. v.9, p.908-18, 1989.

SIM, E. Humoral factors. Nova York. **Oxford University Press**. 1993.

SIMIONESCU, N.; SIMIONESCU, M. Endothelial cell biology in health and disease. Nova York: **Plenun Press**. 1988.

SIMONS, P. et al. Cytokine-mediated modulation of leptin and adiponectin secretion during in vitro adipogenesis: evidence that tumor necrosis factor- α -and interleukin-1 β treated human preadipocytes are potent leptin producers. **Cytokine** v.32, n.2, p.94–103, outubro, 2005.

SHI, H. et al. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**.v.116, n.11, p.3015–3025, novembro., 2006.

SHIMABUKURO, M. et al. Role of nitric oxide in obesity-induced beta cell disease. **Journal of Clinical Investigation**. v.100, n.2, p.290-295, julho, 1997a.

SHIMABUKURO, M. et al. Direct antidiabetic effect of leptin through triglyceride depletion of tissues. **Proceeding of the National Academy of Science USA**. v.94, n.9, p.4637–4641, abril, 1997b.

SIMONSEN, L.; ENEVOLDSEN, L.H; BÜLLOW, J. Determination of adipose tissue blood flow with local ¹³³Xe clearance. Evaluation of a new labeling technique. *Clinical Physiology Functinal Imaging*. v.23, n.6, p.320-323, novembro, 2003.

SIMOPOULOS AP. Essential fatty acids in health and chronic disease. **American Journal of Clinical Nutrition**. v.70, n.3, 560-569, setembro, 1999.

SONG, J.S. et al. Interleukin-1 α polymorphism – 889C/T related to obesity in Korean taemin women. **American Journal of Chinese Medicine**.v.36, n.1, p.771-780, 2008.

SOOKOIAN, S; PIROLA, C.J. Genetics of the cardiometabolic syndrome: new insights and therapeutic implications. **Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease**, vol.1, no.1, p. 37-42, outubro, 2007.

SOUKAS, A, et al. Leptin-specific patterns of gene expression in white adipose tissue. **Genes and Development**. v.14, n.8,p.963-980, janeiro,2000.

SPALDING K.L., et al. Dynamics of fat cell turnover in humans. **Nature**. v.453, p.783-787, maio, 2008.

STEPPAN, CM, LAZAR, MA. The current biology of resistin. **Journal of Internal Medicine**. v.255, n.4, p.439-447, abril, 2004.

STENGEL, D. et al. Inhibition of LPL expression in human monocyte-derived macrophages is dependent on LDL oxidation state: a key role for lysophosphatidylcholine. **Arterioscler Thrombosis and Vascular Biology**.v.18, n.7, p.1172–1180, julho, 1998.

STOLLENWERK, M.M. et al. Very low-density lipoprotein induces interleukin I beta expression in macrophage. **Biochemic and Biophysics Research Communications**.v.335, n.2, p. 603-608, setembro, 2005.

STRANDBEG, L. et al. Interleukin-1 system gene polymorfism are associated with fat mass in young men. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. v.91, n.7, p.749-2754, mes, 2006.

STRANDBERG, L. et al. IL6 and IL1B polymorphisms are associated with fat mass in older men: the MrOS Study Sweden. **Obesity**. v.16, n.3, p.710-713, março., 2008.

SUTTERWALA, F.S.Y. et al. Critical role for NALP3/CIAS1/cryopyrin in innate and adaptive immunity through its regulation of caspase-1. **Immunity**. V. 24, n., p. 317-327, 2006.

SUZUKI, K. et al. Association between interleukin-1B C-31T polymorphism and obesity in Japanese. **Journal of Epidemiology**. V.19, n.3, p.131-135, abril, 2009.

TAKAMATSU, M. et al. Genetic polymorphisms of interleukin-1beta in association with the development of alcoholic liver disease in Japanese patients. **American Journal of Gastroenterology**. v.95, n. 5, p.1305–1311, maio, 2000.

THORNBERRY, N.A. et al. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. **Nature**. v. 356, n.6372, abril, p.768–774, 1992.

TSILIDIS, K.K. et al. Association of common polymorphism in IL-10, and in other genes related to inflammatory response and obesity with colorectal cancer. **Cancer Causes Control**. v.20, n.9, p.1739-1751, novembro, 2009.

TOCCI, M.J.; SCHMIDT, J.A. Interleukin-1: Structure and function. *In* cytokines in health and disease, second edition. D.G. Remick and J.S. Friedland, editors. Marcel Dekker, Inc., New York.1–27. 1997.

TRAYHURN P.; BEATTIE J.H. Physiological role of adipose white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. **Proceedings of the Nutrition Society**. v 60, n 3, p.329–339, agosto, 2001.

TRAYHURN, P.; WOOD, I.S. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. **British Journal of Nutrition**. v. 92, n.3, p. 347–355, setembro, 2004.

TRAYHURN, P. Endocrine and signalling role of adipose tissue: new perspectives on fat. **Acta Physiologica Scandinavica**. v.184, n. 4, p. 285–293, agosto, 2005.

TURPIN, S.M. et al. Apoptosis in skeletal muscle myotubes is induced by ceramides and is positively related to insulin resistance. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**. v.291, n.6,p.1341–1350, dezembro,2006.

UM, J.Y., LEE, K.M., KIM, H.M. Polymorphism of interleukin-1 receptor antagonist gene and obesity. **Clinica Chimica Acta**. v.340, n.1, p.173-177, fevereiro, 2004a.

UM, J.Y. et al. Association of interleukin-1β gene polymorphism with body mass index in women. **Clinical Chemistry**. v.50, n.3, p.647–650, março, 2004b.

UNGER RH, ZHOU YT, ORCI L: Regulation of fatty acid homeostasis in cells: novel role of leptin. **Proceedings of the National Academy of Science USA**. v.96, n.5, p.2327–2332, março, 1999.

UZUN, H. et al. Changes in leptin, plasminogen activator factor and oxidative stress in morbidly obese patients following open and laparoscopic Swedish adjustable gastric banding. **Obesity Surgery**. V.14, n.5, p.659-665, maio, 2004.

VIRTUE, S.; VIDAL-PUIG, A. Adipose tissue expandability, lipotoxicity and metabolic syndrome: an allostatic perspective. **Biochimica and Biophysica Acta**. v.1801, n.3, p.338-349. março, 2010.

WAUMAN, J.; TAVERNIER, J. Leptin receptor signaling: pathways to leptin resistance. **Frontiers in Bioscience**. v.16, p. 2771-2793, junho, 2011.

WANG, Y.I. et al. Endothelial inflammation correlates with subjects trycerides and waist size after a high-fat meal. **American Journal of Phisiology Heart and Circulatory Physiology**. v.300, n.3, p784-791, dezembro, 2010.

WEINBERG, JM. Lipotoxicity. **Kidney International**.v.70, n.9, p.1560-1566, novembro, 2006.

WEISBERG, SP, et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **Journal of Clinical Investigation**. v. 112, n.12, p.1796-1808, dezembro, 2003.

WELLEN, K.E.; HOTAMISLIGIL, G.S. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. **Journal of Clinical Investigation**. v.112, n.12, p.1785–1788, dezembro, 2003.

WELLEN, K.E.; HOTAMISLIGIL, G.S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**. v.444, n.7121, p.860-867, dezembro, 2005.

WHEELER, D. et al. Effects of dietary fatty acids in an animal model of focal glomerulosclerosis. **Kidney International**. v.39, p.930-937, dezembro, 1991.

WOLF, M.G.M. et al. Coexpressed immune and metabolic genes in visceral and subcutaneous adipose tissue from severely obese individuals are associated with plasma HDL and glucose levels: microarray study. **BMC Medical Genomics**. v.3, n.34, p. 2-15, agosto, 2010.

WORLD HEALTH ORGANISATION. Geneva: WHO; 2007. Physical status: the use and interpretation of anthropometry.

YU, Z. et al. Genetic Polymorphisms in Adipokine Genes and the Risk of Obesity: A Systematic Review and Meta-Analysis, **Obesity**. v.148, junho, 2011.

XU, H, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**. v.112, n.12, p.1821-1830, dezembro, 2003.

ZALESIN, K.C. et al. Impact of obesity on cardiovascular disease. **Medical Clinics of North America**. v.95, n.5, p.919-937, setembro, 2011.

ZEYBEK, U. et al. Effect of TNF- α and IL-1 β genetic variants on the development of myocardial infarction in Turkish population. **Molecular Biology Reports**. v.38, n.8, p. 5453-5457, novembro, 2011.

ZHANG, Y. et.al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**. v.372, n.6505, p.425–432, dezembro, 1994.