

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANA CLÁUDIA MARTINS BRAGA GOMES TORRES

POLIMORFISMOS EM GENES DA VIA INFLAMATÓRIA E SUA RELAÇÃO
COM MARCADORES ANTROPOMÉTRICOS E BIOQUÍMICOS.

CURITIBA

2019

ANA CLÁUDIA MARTINS BRAGA GOMES TORRES

POLIMORFISMOS EM GENES DA VIA INFLAMATÓRIA E SUA RELAÇÃO
COM MARCADORES ANTROPOMÉTRICOS E BIOQUÍMICOS.

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em Genética, setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título em Doutor(a) em Genética.

Orientadora: Prof^a Dr^a Lupe Furtado Alle

CURITIBA

2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Torres, Ana Cláudia Martins Braga Gomes
Polimorfismos em genes da via inflamatória e sua relação com
marcadores antropométricos e bioquímicos. / Ana Cláudia Martins Braga
Gomes Torres. – Curitiba, 2019.
136 p. : il.

Orientadora: Lupe Furtado Alle

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Sistema imune 2. Inflamação – aspectos imunológicos 3.
Metabolismo 4. Polimorfismo (Genética) I. Título II. Alle, Lupe Furtado III.
Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa
de Pós-Graduação em Genética.

CDD (20. ed.) 571.96



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO GENÉTICA -
40001016006P1

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em GENÉTICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **ANA CLAUDIA MARTINS BRAGA GOMES TORRES** intitulada: **POLIMORFISMOS EM GENES DA VIA INFLAMATÓRIA E SUA RELAÇÃO COM MARCADORES ANTROPOMÉTRICOS E BIOQUÍMICOS**, que após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 31 de Maio de 2019.

LUPE FORTADO ALLE

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

FABIANA ANTUNES DE ANDRADE

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

GABRIEL ADELMAN CIPOLLA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

DAIANE PRISCILA SIMÃO-SILVA

Avaliador Externo (PONTIFICA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que me permitiu que chegasse até aqui!

A minha família em especial ao meu esposo Max e ao meu filho Matheus, pelo apoio e incentivo, pela compreensão nos períodos de ausência. Sem eles seria impossível a realização deste sonho. Aos meus pais Cláudia e Nei, que me ensinaram o valor do estudo e por sempre me apoiaram em todos os caminhos que optei trilhar. E aos meus irmãos Rafael e Daniel. Amo vocês!

À minha orientadora Lupe Furtado Alle, uma cientista e professora espetacular, muito obrigada pelos ensinamentos e paciência, mas principalmente por acreditar e confiar no meu potencial. Devo muito ao que sou hoje a você. Muito obrigada! Ao professor Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza, pela ajuda e suporte. À Luciane Tureck, pelo acompanhamento e auxílio em todas as etapas.

Aos excelentes professores com os quais tive a sorte de aprender nestes 6 maravilhosos anos de pós-graduação: professora Danielle Malheiros, Maria Luiza Petzl-Erler, Jaqueline de Oliveira, Angélica Boldt, Enilze Ribeiro, Iglénir Cavalli e Nina Pagnan.

As queridas amigas do laboratório de polimorfismos que me acolheram tão bem e que com carinho e descontração fizeram esse período muito mais leve e divertido: Luciane, Carla, Mayza, Saritha, Isadora, Silvia e Vanessa. Aos meus queridos colegas de pós-graduação: Talita, Vanessa Hauer, Lorena, Matilde, Gabriela e Luana. Obrigada a todas!

A minha parceira de todos estes anos Juliana Schauren, que sempre foi mais que uma amiga, uma irmã! Obrigada Ju!

A UFPR, por todo suporte nestes 6 anos de pós-graduação. Ao CNPQ e Fundação Araucária pelo auxílio financeiro na execução do trabalho e a Capes pela bolsa de estudo.

“Conhecimento não é aquilo que você sabe, mas o que você faz com aquilo que você sabe”.

Aldous Huxley

RESUMO

O sistema imune tem um papel fundamental na defesa do organismo e na manutenção da homeostase. Há várias décadas tem se investigado a sua participação na quebra da homeostase metabólica pelo desencadeamento da resposta inflamatória mediante excesso no consumo de nutrientes e de desequilíbrio de componentes do metabolismo lipídico e de glicose. O presente estudo teve por objetivo avaliar a influência de 21 polimorfismos em 10 genes codificantes de componentes do sistema imune e da resposta inflamatória (*TLR2*, *TLR4*, *NFKB1*, *NFKBIA*, *NLRC4*, *CARD8*, *NEK7*, *TNF*, *IL6* e *IL1B*) em variáveis antropométricas (índice de massa corporal (IMC), circunferência de cintura (CC), de quadril (CQ) e abdominal (CA), percentual de gordura corporal (GC)) e variáveis bioquímicas (glicose, insulina, LDL-C, HDL-C, triglicerídeos (TG), colesterol total (CT), HOMA-IR (*Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance*), QUICKI (*Quantitative Insulin Sensitivity Check Index*), adiponectina e visfatina) em duas amostras independentes: 158 crianças e adolescentes e 115 adultos. Os polimorfismos foram genotipados através da tecnologia Sequenom MassArray iPLEX. As comparações de médias das variáveis analisadas foram realizadas através do teste t ou Mann Whitney. Para verificar o efeito dos polimorfismos sobre as variáveis de interesse foram utilizadas análises de regressão logística ou regressão linear múltipla. Dos 21 polimorfismos analisados, 16 apresentaram associação com pelo menos uma variável de interesse. Para as variáveis antropométricas foram encontradas associações entre: IMC e os polimorfismos rs13105517 (*TLR2*); rs1927911 e rs1554973 (*TLR4*), rs1800629 (*TNF*) e rs3755867 (*NFKB1*); CQ e o SNP rs3755867 (*NFKB1*); GC e os polimorfismos rs385076, rs455060 (*NLRC4*), rs3755867 (*NFKB1*) e rs3917356 (*IL1B*). Para as variáveis do metabolismo de glicose foram encontradas associações entre: níveis de glicose e os polimorfismos rs3138053 (*NFKBIA*), rs7258674 (*CARD8*) e rs6671879 (*NEK7*); os valores de HOMA-IR e os polimorfismos rs13105517 (*TLR2*) e rs1927911 (*TLR4*); os valores de QUICKI e os polimorfismos rs13105517 (*TLR2*), rs212704 (*NLRC4*) e rs2069845 (*IL6*); os níveis de insulina e os polimorfismos rs212704 (*NLRC4*) e rs455060 (*NLRC4*). Para os parâmetros do metabolismo lipídico foram encontradas associações entre: níveis de LDL-C e os polimorfismos rs1554973 (*TLR4*), rs2069845 (*IL6*), rs3755867 (*NFKB1*) e rs6671879 (*NEK7*), níveis de HDL-C e os polimorfismos rs13105517 (*TLR2*) e rs7258674 (*CARD8*), níveis de CT e os polimorfismos rs3804099 (*TLR2*), rs6671879 (*NEK7*) e rs2069845 (*IL6*) e os níveis de TG e os polimorfismos rs1800629 (*TNF*), rs3138053 (*NFKBIA*), rs3804099 (*TLR2*), rs6509366 (*CARD8*) e rs6671879 (*NEK7*). Para as adipocinas mensuradas foram encontradas associações entre: adiponectina e os polimorfismos rs3138053 (*NFKBIA*) e rs696 (*NFKBIA*); visfatina e o SNP rs3138053 (*NFKBIA*). Associações aqui encontradas contribuem com o conhecimento a respeito da relação entre componentes da via inflamatória e os parâmetros antropométricos e bioquímicos e oferecerem evidências para futuras investigações sobre o mecanismo subjacente a essa relação.

Palavras-chave: sistema imune, resposta inflamatória, metabolismo, polimorfismos.

ABSTRACT

The immune system plays a key role in organism defense against pathogens and in homeostasis maintenance. For several decades immune system participation in the disruption of the metabolic homeostasis by triggering of inflammatory response when facing high intake of nutrients and imbalance of lipid and glucose metabolism. The aim of the present study was to investigate the effects of 21 polymorphisms on 10 immune system and inflammatory response components coding genes (*TLR2*, *TLR4*, *NFKB1*, *NFKBIA*, *NLRC4*, *CARD8*, *NEK7*, *TNF*, *IL-6* and *IL1B*) over anthropometric variables (body mass index (BMI), waist circumference (WC), hip circumference (HC), abdominal circumference (AC), body fat percentage (fat) and biochemical variables (glucose, insulin, LDL-C, HDL-C, triglycerides (TG), total cholesterol (TC), HOMA-IR (Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance), QUICKI (Quantitative Insulin Sensitivity Check Index), adiponectin and visfatin) in two independent samples: 158 children and adolescents and 115 adults. The polymorphisms were genotyped using Sequenom MassArray iPLEX technology. Mean comparisons of the variables analyzed were performed by t test or Mann Whitney test. To verify the effect of the polymorphisms over the variables analyzed, logistic regression or multiple linear regression analyzes were performed. Of the 21 polymorphisms analyzed, 16 were associated with at least one variable of interest. For the anthropometric variables were found associations between: BMI and polymorphisms rs13105517 (*TLR2*), rs1927911, rs1554973 (*TLR4*), rs1800629 (*TNF*) and rs3755867 (*NFKB1*); HC and SNP rs3755867 (*NFKB1*); fat and polymorphisms rs385076, rs455060 (*NLRC4*), rs3755867 (*NFKB1*) and rs3917356 (*IL1B*). For the variables of glucose metabolism, associations were found between: glucose levels and the polymorphisms rs3138053 (*NFKBIA*), rs7258674 (*CARD8*) and rs6671879 (*NEK7*); the HOMA-IR index and the polymorphisms rs13105517 (*TLR2*) and rs1927911 (*TLR4*); the QUICKI index and the polymorphisms rs13105517 (*TLR2*), rs212704 (*NLRC4*) and rs2069845 (*IL-6*); insulin levels and polymorphisms rs212704 (*NLRC4*) and rs455060 (*NLRC4*). For the parameters of lipid metabolism, associations were found between LDL-C levels and rs1554973 (*TLR4*), rs2069845 (*IL-6*), rs3755867 (*NFKB1*) and rs6671879 (*NEK7*); HDL-C levels and polymorphisms rs13105517 (*TLR2*) and rs7258674 (*CARD8*); TC levels and polymorphisms rs3804099 (*TLR2*), rs6671879 (*NEK7*) and rs2069845 (*IL-6*) and TG levels and polymorphisms rs1800629 (*TNF*), rs3138053 (*NFKBIA*), rs3804099 (*TLR2*), rs6509366 (*CARD8*) and rs6671879 (*NEK7*). For the adipokines measured, associations were found between: adiponectin and polymorphisms rs3138053 (*NFKBIA*) and rs696 (*NFKBIA*); visfatin and SNP rs3138053 (*NFKBIA*). Associations found here contribute to the knowledge about the relationship between components of the inflammatory pathway and the anthropometric and biochemical parameters and provide evidence for future investigations on the underlying mechanism of this relationship.

Key-words: immune system, inflammatory response, metabolism, polymorphisms.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - CONSERVAÇÃO DO SISTEMA IMUNE E METABÓLICO COMPARAÇÃO ENTRE DROSOPHILAS E HUMANOS.....	20
FIGURA 2 - VIA DE ATIVAÇÃO DE TLR4.....	25
FIGURA 3 - DESENHO ESQUEMÁTICO DA ESTRUTURA DO GENE <i>TLR2</i>	27
FIGURA 4 - DESENHO ESQUEMÁTICO DA ESTRUTURA DO GENE <i>TLR4</i>	28
FIGURA 5 - MECANISMO DE ATIVAÇÃO DE NLRP3.....	31
FIGURA 6 - ATIVAÇÃO DO INFLAMOSSOMO NLRC4.....	33
FIGURA 7 - DESENHO ESQUEMÁTICO DO GENE <i>CARD8</i>	34
FIGURA 8 - ATIVAÇÃO DE IKK e NF- κ B.....	38
FIGURA 9 - TNF E RESPOSTA A INSULINA.....	42
FIGURA 10 - DESENHO ESQUEMÁTICO DO GENE <i>TNF</i>	44
FIGURA 11 - MECANISMO DE RESISTÊNCIA A INSULINA MEDIADO POR IL-6.....	46
FIGURA 12 - DESENHO ESQUEMÁTICO DO GENE <i>IL6</i>	47
FIGURA 13 - MECANISMOS DE PROCESSAMENTO DE IL-1 β	48

LISTA DE SIGLAS

ABCA-1	- <i>ATP-binding cassette transporter A1</i>
ACC-1	- <i>Acetyl CoA carboxylase-1</i>
AGS	- Ácidos graxos saturados
AGLs	- Ácidos graxos livres
AIM2	- <i>Absent in melanoma 2</i>
AMPK	- <i>AMP-activated protein kinase</i>
AP-1	- <i>Activator protein 1</i>
ApoA-I	- Apolipoproteína A1
ASC	- <i>Apoptosis-associated speck-like protein containing CARD</i>
CA	- Circunferência abdominal
CAPS	- <i>Cryopyrin-associated periodic fever syndromes</i>
CARD	- <i>Caspase recruitment domain</i>
CARD8	- <i>Caspase recruitment domain family member 8</i>
CC	- Circunferência de cintura
CPT-1	- <i>Carnitine palmitoyl transferase-1</i>
CQ	- Circunferência de quadril
CT	- Colesterol total
DAMPs	- <i>Danger associated molecular patterns</i>
Dilp	- <i>Drosophila insulin like-peptides</i>
DL	- Desequilíbrio de ligação
ERK	- <i>Extracellular-signal-regulated kinase</i>
FCAS	- <i>Familial cold autoinflammatory syndrome</i>

GC	- Percentual de gordura corporal
GLUT4	- <i>Glucose transporter 4</i>
HOMA-IR	- <i>Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance</i>
I κ B	- <i>Inhibitor of κB</i>
IKK	- <i>Inhibitor of κB Kinase</i>
IL-1	- Interleucina 1
IL-1 β	- Interleucina 1 β
IL-4	- Interleucina 4
IL-6	- Interleucina 6
IL-10	- Interleucina 10
IMC	- Índice de massa corporal
IRS-1	- <i>Insulin receptor substrate-1</i>
JAK2	- <i>Janus kinase 2</i>
JNK	- <i>c-jun amino terminal quinase K</i>
LDL	- Lipoproteína de baixa densidade
LPL	- lipoproteína lipase
LPS	- Lipopolissacarídeos
LRR	- <i>Leucine rich repeats</i>
MCP-1	- <i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
MHC	- <i>Major histocompatibility complex</i>
MyD88	- <i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>
miRNA	- microRNA
NAIP	- <i>NLR, family, apoptosis inhibitory proteins</i>

NBD	- <i>Nucleotide binding domain</i>
NEK7	- <i>(Never in mitosis Gene A)-Related Kinase 7)</i>
NF- κ B	- <i>Nuclear fator κB</i>
NFKB1	- <i>Nuclear fator kappa B subunit 1</i>
NLR	- <i>Nod-like receptor</i>
NLRC4	- <i>NLR family CARD domain-containing protein 4</i>
NLRP1	- <i>NLR family pyrin domain-containing 1</i>
NLRP3	- <i>NLR family pyrin domain-containing 3</i>
ORF	- <i>Open reading frame</i>
PAMPs	- <i>Pathogens associated molecular patterns</i>
PI3K	- <i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PPAR- α	- <i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
PRR	- <i>Pattern recognition receptors</i>
PYD	- <i>Pyrin domain</i>
QUICKI	- <i>Quantitative Insulin Sensitivity Check Index</i>
RHR	- <i>Rel homology region</i>
RNA _m	- <i>RNA mensageiro</i>
RNA _t	- <i>RNA transportador</i>
SNP	- <i>Single nucleotide polymorphism</i>
SOCS	- <i>Supressor of cytokine signaling</i>
SREBP-1c	- <i>Sterol response element binding protein-1c</i>
TACE	- <i>TNF-α converting enzyme</i>
TG	- <i>Triglicerídeos</i>

TIR	- <i>Toll-interleukin 1 receptor</i>
TIRAP	- <i>TIR domain containing adapter protein</i>
TLR	- <i>Toll-like receptor</i>
TNF	- <i>Tumor necrose factor</i>
TRAM	- <i>TRIF-related adaptor molecule</i>
TRIF	- <i>TIR domain containing adaptor inducing interferons</i>
UTR	- <i>untranslated region</i>
VLDL	- Lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL.....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
3.1 SISTEMA IMUNE E O METABOLISMO	19
3.2 TECIDO ADIPOSEO E HOMEOSTASE METABÓLICA.....	21
3.3 TECIDO ADIPOSEO E INFLAMAÇÃO	24
3.4 SISTEMA IMUNE INATO E O METABOLISMO.....	25
3.4.1 TLRs – <i>Toll-like receptors</i>	25
3.4.1.1 Genes <i>TLR2</i> e <i>TLR4</i>	27
3.4.2 <i>NOD-like receptors</i> (NLRs) - inflamossomos	29
3.4.2.1 Gene <i>CARD8</i>	34
3.4.2.2 Gene <i>NEK7</i>	35
3.4.2.3 Gene <i>NLRC4</i>	36
3.4.3 Fator nuclear kappa B (NF-κB).....	37
3.4.3.1 GENES <i>NFKB1</i> (nuclear factor kappa B subunit 1)	40
3.4.3.2 Gene <i>NFκBIA</i> (NFKB inhibitor alpha)	41
3.4.2 Citocinas pró-inflamatórias	42
3.4.2.1 TNF (fator de necrose tumoral)	42
3.4.2.1.1 Gene <i>TNF</i>	44
3.4.2.2 Interleucina-6 (IL-6).....	45
3.4.2.2.1 GENE <i>IL6</i>	47
3.4.2.3 Interleucina 1beta (IL- β)	48
3.4.2.3.1 GENE <i>IL1B</i>	50
3.6 MEDIADORES INFLAMATÓRIOS EM RESPOSTA AO EXERCÍCIO.....	51

4 JUSTIFICATIVA	53
CAPÍTULO I.....	55
CAPÍTULO II.....	67
CAPÍTULO III.....	98
6 DISCUSSÃO GERAL	118
7 CONCLUSÕES.....	122
REFERÊNCIAS	124

1 INTRODUÇÃO

Inflamação é um processo adaptativo do organismo para combater potenciais estímulos externos, protegendo contra infecção por patógenos ou componentes que possam interferir na homeostase. A quebra da homeostase metabólica, causada pelo excesso no consumo de nutrientes, especialmente gorduras saturadas e glicose, é potencial ativadora da resposta inflamatória. Além disso, o excesso na ingestão de alimentos pode levar à hipertrofia do tecido adiposo, fato este que recruta macrófagos para o local e gera a liberação de citocinas pró-inflamatórias (JIN; HENAO-MEJIA; FLAVELL, 2013; LACKEY; OLEFSKY, 2015). Esta resposta é muito bem orquestrada por diversas células do sistema imune, como células dendríticas e monócitos, além dos macrófagos (CHENG; JOOSTEN; NETEA, 2014).

Células do sistema imune expressam receptores do sistema imune inato, os quais são responsáveis por reconhecer e ativar a resposta inflamatória. Essa ativação se dá pelo reconhecimento de PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*) endógenos e exógenos e DAMPs (*danger associated molecular patterns*). Diversos DAMPs e PAMPs, derivados de componentes da dieta e também das bactérias da flora intestinal (LPS-lipopolissacarídeos), têm sido capazes de ativar os dois principais receptores, os TLRs (*toll-like receptors*) e os NLRs (*nod-like receptors*), também conhecido como inflamossomo. Primeiramente, o excesso de nutrientes, LPS, ácidos graxos saturados e cristais de colesterol podem ativar TLR2 (*toll like receptor 2*) e TLR4 (*toll-like receptor 4*), desencadeando a cascata e levando à ativação do inflamossomo NLRP3 (*NLR family pyrin domain containing-3*), culminando na liberação de IL-1 β (interleucina 1 beta).

Além disso, TLRs são capazes de ativar a via de NF- κ B (*nuclear fator κ B*), o que resulta no aumento da expressão de diversas citocinas, como TNF (tumor necrose fator), IL-6 (interleucina-6), IL-1 β e de componentes do inflamossomo (JIN; HENAO-MEJIA; FLAVELL, 2013; LACKEY; OLEFSKY, 2015; RANKIN; ARTIS, 2018). Grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias são liberadas neste processo e podem prejudicar a sinalização da insulina, devido à fosforilação em sítios inibitórios de IRS-1 (*insulin receptor substrate 1*), além de ser um fator de risco para o desenvolvimento da

aterosclerose, por auxiliar na formação das placas ateroscleróticas. Aumento da expressão de citocinas, como TNF, tem sido associado a distúrbios, como obesidade (HOTAMISLIGIL et al., 1995), aterosclerose (MCKELLAR et al., 2009) e diabetes (HAMEED et al., 2018).

Polimorfismos nos genes dos receptores da resposta imune inata e também das citocinas pró-inflamatórias também têm sido associados a distúrbios metabólicos. Principalmente os que se localizam na região promotora do gene, pois podem aumentar a expressão destes componentes, como, rs1800629 (*TNF*), cujo alelo A parece ser responsável por aumentar a expressão de *TNF* (KARIMI et al., 2009). Este polimorfismo foi associado com obesidade (BRAND et al., 2001) e também influenciou os níveis de triglicerídeos em resposta à dieta mediterrânea (GOMEZ-DELGADO et al., 2014).

Considerando a relevância da via inflamatória para o metabolismo, o presente estudo teve por objetivo verificar o efeito de polimorfismos em genes codificantes de componentes da via inflamatória (*TLR2*, *TLR4*, *NFKB1*, *NFKBIA*, *NLRC4*, *CARD8*, *NEK7*, *TNF*, *IL-6* e *IL1B*) sobre variáveis antropométricas (peso, altura, circunferência abdominal, de cintura e de quadril e porcentagem de gordura) e bioquímicas (glicemia, insulina, HDL-C, LDL-C, triglicerídeos, colesterol total, HOMA-IR (*Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance*), QUICKI (*Quantitative Insulin Sensitivity Check Index*), adiponectina e visfatina) em duas amostras independentes, uma delas constituída de 158 crianças e adolescentes e a outra de 115 adultos. Também foi realizado um estudo longitudinal com a amostra de crianças e adolescentes submetidas a um programa de exercícios físicos. Neste estudo longitudinal, foi investigada a influência destes polimorfismos sobre a variação observada nas variáveis antropométricas e bioquímicas em resposta ao exercício.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos de polimorfismos nos genes da via inflamatória (*TLR2*, *TLR4*, *NFKB1*, *NFKBIA*, *NLRC4*, *CARD8*, *NEK7*, *TNF*, *IL-6* e *IL-1 β*) sobre variáveis metabólicas (antropométricas e bioquímicas).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Investigar os efeitos dos SNPs sobre as variáveis metabólicas (antropométricas e bioquímicas) em duas amostras independentes: crianças e adolescentes; e adultos.
- 2) Por meio de estudo longitudinal, investigar a influência dos polimorfismos sobre a variação observada nas variáveis antropométricas e bioquímicas em resposta ao exercício em uma amostra de crianças e adolescentes participantes de um programa de exercícios físicos.
- 3) Testar os diferentes modelos de interação alélica para cada um dos SNPs e o seu efeito sobre as variáveis metabólicas (antropométricas e bioquímicas).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 SISTEMA IMUNE E O METABOLISMO

As adaptações do sistema imune conferem a capacidade de combater infecções, danos teciduais, controlar o equilíbrio energético e ativação da resposta imune adaptativa. É preparado para reagir a fatores internos e externos e restaurar a homeostase do organismo garantindo sua sobrevivência (HOTAMISLIGIL, 2006). No entanto esse sistema de defesa tem alto custo energético e para manter as funções metabólicas normais dos organismos foi necessário garantir eficientes formas de aproveitamento desta energia, tanto no estoque quanto na produção de glicose. A capacidade de cooperação destes dois sistemas na proteção do organismo contra patógenos, na resposta a oscilações energéticas ambientais e na conservação metabólica de energia, se mostrou altamente vantajoso para o aumento da sobrevivência (HOTAMISLIGIL, 2017; ZMORA et al., 2017).

No entanto, os organismos se adaptaram a poupar energia, visando garantir a manutenção da sobrevivência e não para a abundância de nutrientes da forma que temos hoje. O excesso na ingestão, principalmente de alimentos ricos em gorduras saturadas e açúcar pode desencadear uma extensa reação inflamatória, como parte da adaptação do organismo a flutuações energéticas (ZMORA et al., 2017). Além disso, como resultado da supernutrição ocorre uma rápida expansão do tecido adiposo, o qual libera na circulação ácidos graxos livres (AGLs), podendo desencadear a resposta inflamatória.

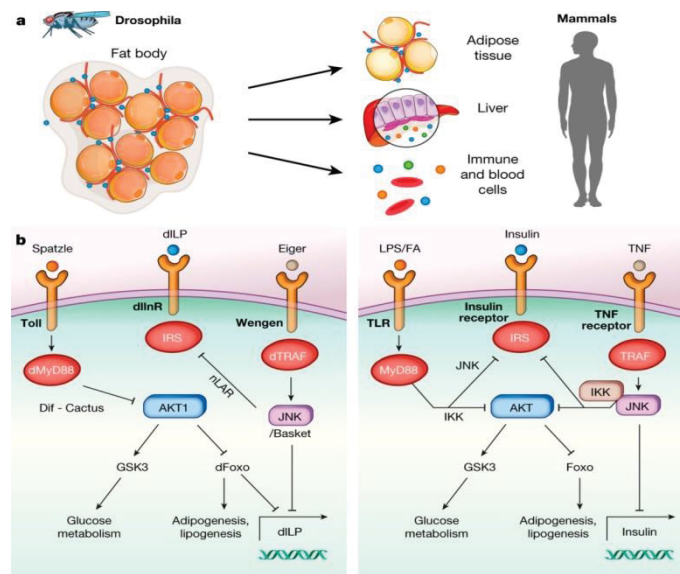
No entanto, com a liberação de AGLs e também com o excesso de nutrientes, o estímulo é constante e a resposta imune é sempre desencadeada. Isso pode levar ao estado inflamatório crônico, e ser responsável pelo desenvolvimento de diversas doenças metabólicas como a diabetes tipo 2, doença do fígado gorduroso não alcoólico e aterosclerose. (LEE; WOLLAM; OLEFSKY, 2018; REILLY; SALTIEL, 2017).

A relação entre sistema imune e metabolismo é conservada entre as espécies. O exemplo mais conhecido, o corpo gorduroso (*“fat body”*) em

Drosophila é uma estrutura homóloga ao fígado, sistema imune e tecido adiposo de mamíferos. O corpo gorduroso tem função de agir como sensor de nutrientes e detectar infecções. Nesta estrutura é produzido Eiger, o órtologo de *Drosophila* do TNF (fator de necrose tumoral). Ativação de Wenger (receptor de TNF) ou sinalização de TLR (toll-like receptor) resulta na inibição da ação da insulina através de JNK (c-jun amino terminal quinase K) e MyD88 (*Myeloid differentiation primary response gene 88*) (DIANGELO et al., 2009; HOTAMISLIGIL, 2017; WANG; BOHMANN; JASPER, 2005). Assim como em humanos, o excesso de alimentação ou dieta rica em açúcar resulta na resistência de Dilp (*Drosophila* insulin-like peptides) através da ação de JNK (FIGURA 1) (MORRIS et al., 2012; PASCO; LÉOPOLD, 2012). Além disso, a ação de Eiger através de Grindewald (outro receptor de TNF de *Drosophila*) controla o tamanho corporal durante a privação de alimento. Entretanto, o bloqueio de Grindewald do corpo gorduroso impede o desenvolvimento da hiperglicemia em uma dieta rica em açúcar (AGRAWAL et al., 2016).

Este exemplo mostra a importância do desenvolvimento de um sistema que se adapte a fatores externos e que realize controle da homeostase. No entanto, apesar deste controle existir em drosófilas e em modelos como *Caenorhabditis elegans* e *Danio rerio*, nenhum deles se adaptou ao excedente de nutriente tal como nós seres humanos estamos experimentando atualmente (HOTAMISLIGIL, 2006, 2017). Fato este com estreita relação entre a comum ocorrência das mais diversas comorbidades relacionadas à alimentação e ao sedentarismo. Neste contexto, a obesidade tem sido um bom objeto de estudo já que se configura como um fator de risco para estas doenças.

FIGURA 1 - CONSERVAÇÃO DO SISTEMA IMUNE E METABÓLICO, COMPARAÇÃO ENTRE DROSÓFILAS E HUMANOS.



FONTE: HOTAMISLIGIL (2017)

3.2 TECIDO ADIPOSEO E HOMEOSTASE METABÓLICA

A homeostase imune e metabólica requer a participação de diversos órgãos endócrinos, sendo o principal deles o tecido adiposo, o qual apresenta uma importante função na homeostase energética. É capaz de secretar citocinas chamadas de adipocinas que agem de forma local e sistêmica regulando diversas funções como controle da ingestão de alimentos, absorção de nutrientes, acúmulo de gordura, inflamação, entre outros (LAGO et al., 2009). Esses fatos o tiraram da posição de um simples reservatório energético e isolante térmico e o colocaram na posição de órgão endócrino.

O marco deste acontecimento foi a descoberta de leptina em 1994 (ZHANG et al., 1994), uma citocina produzida principalmente pelo tecido adiposo, é a citocina mais bem estudada no contexto metabólico. O aumento do tecido adiposo ativa várias regiões do hipotálamo, promovendo um aumento nos níveis circulantes de leptina, a qual desencadeia uma resposta para redução na ingestão de alimentos e aumenta o consumo de energia. Da mesma forma, falta de leptina circulante, por restrição calórica ou exercício, promove um aumento no apetite e diminuição do gasto energético. Os níveis circulantes de leptina são proporcionais a massa corporal. Em obesos, os

níveis circulantes de leptina são elevados. No entanto esses indivíduos podem desenvolver a resistência a leptina sendo incapaz de aumentar a saciedade e regular o tamanho corporal (LAGO et al., 2009; STERN; RUTKOWSKI; SCHERER, 2016). Um possível mecanismo do desenvolvimento da resistência a leptina é devido a alta expressão de citocinas pró-inflamatórias, no excedente nutricional, tais como TNF, IL-6 (interleucina 6) e IL-1 (interleucina 1). Além disso, dieta rica em gordura ativa NF- κ B (*nuclear fator κ B*) e seu inibidor IKK (*inhibitor of κ B Kinase*) através do aumento do estresse do retículo endoplasmático (CUI; LÓPEZ; RAHMOUNI, 2017).

Leptina tem uma importante função no metabolismo lipídico não apenas no tecido adiposo, mas em outros órgãos como fígado e músculo. Diminuiu a lipogênese e aumenta a hidrólise de triglicerídeos e aumenta a oxidação de ácidos graxos. Age principalmente na supressão de SREBP-1c (*sterol response element binding protein-1c*) e ativação de AMPK (*AMP-activated protein kinase*) a qual inibe a lipogênese através da fosforilação de ACC-1 (*acetyl CoA carboxylase-1*). Diminuição de ACC-1 inibe a atividade de CPT-1 (*carnitine palmitoyl transferase-1*) e aumenta o transporte de ácidos graxos para a mitocôndria para realização da β -oxidação (LAGO et al., 2009; STERN; RUTKOWSKI; SCHERER, 2016). No fígado, parece regular os níveis de triglicerídeos VLDL (lipoproteína de muito baixa densidade), pois ratos *knockout* para o receptor da leptina no fígado apresentaram maiores níveis de VLDL circulantes (HUYNH et al., 2013; STERN; RUTKOWSKI; SCHERER, 2016).

Leptina também executa uma importante função na sensibilidade à insulina através da ativação de IRS-1 (*insulin receptor substrate-1*) e JAK2 (*janus kinase 2*). Estes iniciam a sinalização através da via de PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinase*), o qual induz a translocação de GLUT4 (*glucose transporter 4*) para a superfície da célula e induz a absorção de glicose (STERN; RUTKOWSKI; SCHERER, 2016).

Adiponectina também é um citocina produzida no tecido adiposo, é associada à sensibilidade à insulina e aumento na oxidação dos ácidos graxos, possuindo efeito anti-diabetogênico e anti-aterogênico. Níveis circulantes de

adiponectina tendem a ser menores em obesos, seus níveis são aumentados com a perda de peso. Assim como a leptina, age via ativação de AMPK induzindo a oxidação de ácidos graxos via PPAR- α (*peroxisome proliferator-activated receptor*), diminuindo os níveis de triglicerídeos acumulados no músculo e no fígado e, desta forma, aumentando a sensibilidade insulínica. Adiponectina estimula absorção de glicose através de GLUT4 via fosforilação e ativação de AMPK por aumento de Ca^{2+} citosólico (STERN; RUTKOWSKI; SCHERER, 2016). Além disso, adiponectina parece aumentar a produção hepática de apoA1 (apolipoproteína A1) através do aumento da expressão de ABCA-1 (*ATP-binding cassette transporter A1*), o qual induz a formação de HDL, acarretando no transporte reverso de colesterol. Níveis de adiponectina são diretamente proporcionais aos de LPL (lipoproteína lipase), o qual hidrolisa triglicerídeos nas lipoproteínas ricas em triglicerídeos como VLDL e quilomicrons (CHRISTOU; KIORTSIS, 2013).

Existem ainda outras adipocinas que regulam a atividade metabólica como a visfatina, omentina e resistina entre outras. A visfatina é secretada principalmente pelo tecido adiposo visceral, tem sua função ainda debatida, mas indícios sugerem sua atividade pró-inflamatória com ativação de TNF e IL-6; seus níveis estão correlacionados com diminuída sensibilidade à insulina mediado por TNF (GOURANTON et al., 2014) e risco de doença oclusiva arterial periférica (PITOULIAS et al., 2017) entre outras (SADDI-ROSA et al., 2010). A omentina secretada pela gordura visceral (omento) parece exercer uma função anti-inflamatória, inibindo a expressão de TNF. Níveis plasmáticos de omentina estão diminuídos em pacientes obesos e diabéticos (ALISSA et al., 2016; LESNA et al., 2015). E finalmente, a resistina, secretada principalmente pelas células mononucleares do sangue periférico e pelos macrófagos, foi descoberta em 2001 e sua função relacionada a obesidade. A administração de resistina em camundongos prejudicou a tolerância a glicose e ação da insulina (STEPPAN et al., 2001). Resistina foi capaz de induzir a inflamação observada na resistência insulínica através de mecanismo dependente de TLR4 (toll-like receptor 4) (JIANG et al., 2016).

Essas e outras adipocinas exercem um papel fundamental na homeostase metabólica. No caso de desequilíbrio metabólico, com aumento da

inflamação local e sistêmica, seu papel pode exacerbar os efeitos das citocinas inflamatórias e prejudicar o metabolismo lipídico e de glicose.

3.3 TECIDO ADIPOSE E INFLAMAÇÃO

Vários mecanismos têm sido postulados para explicar o quadro inflamatório observado nos distúrbios metabólicos, especialmente a obesidade. Pode ser iniciado pelo excesso do consumo de nutrientes, principalmente ácidos graxos saturados e pelo aumento da permeabilidade intestinal, o qual libera componentes da flora intestinal como lipopolissacarídeos (LPS) provenientes da parede celular de bactérias Gram negativas. Outra possibilidade é através da rápida expansão do tecido adiposo, decorrente da hipertrofia dos adipócitos, causando hipóxia, ou seja, diminuição do aporte de oxigênio aos adipócitos podendo causar a morte e necrose. Além disso, os adipócitos hipertróficos liberam ácidos graxos livres que podem se acumular em tecidos ectópicos, causando lipotoxicidade (CHOE et al., 2016; REILLY; SALTIEL, 2017).

Esses eventos podem atrair uma maior quantidade de macrófagos para a região. Tanto os adipócitos hipertróficos quanto os macrófagos neste contexto de desequilíbrio energético e metabólico secretam citocinas pró-inflamatórias como TNF, IL-6, IL-1 β (interleucina 1 β) e quimiocina MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*). Aumento na liberação destas citocinas leva a fosforilação da serina de IRS-1 através da via de sinalização de NF- κ B e JNK resultando na resistência insulínica. Estes macrófagos com perfil pró-inflamatório (M1) também apresentam maior expressão em sua superfície de receptores do sistema imune inato TLR2 (*toll-like receptor 2*) e TLR4. Tecido adiposo de pacientes obesos apresentam prioritariamente o perfil M1 enquanto em tecido adiposo saudável (magro) os macrófagos apresentam em maior quantidade perfil M2 (anti-inflamatório), esses secretam citocinas como IL-10 (interleucina-10) e IL-4 (interleucina-4) e outras moléculas as quais tem propriedades imunossupressoras e são responsáveis pelo remodelamento do tecido adiposo e neutralização da inflamação (CASTOLDI et al., 2016).

3.4 SISTEMA IMUNE INATO E O METABOLISMO

3.4.1 TLRs – *Toll-like receptors*

São um grupo de receptores do sistema imune inato, PRR (pattern recognition receptors) mais conhecidos. Sua função é reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) oriundos de microrganismos e padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) decorrente de lesão tecidual. São receptores transmembrânicos formados basicamente por um domínio extracelular com repetições ricas em leucina (LRR) responsável pelo reconhecimento de PAMPs/DAMPs e um domínio celular TIR (*Toll-interleukin 1 receptor*), homólogo ao receptor de IL-1, que promove a sinalização *downstream* (MEDZHITOV, 2001). Em humanos, são conhecidos mais de 10 tipos de receptores: TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR10, TLR11, TLR12 e TLR13 são encontrados expressos na superfície celular, enquanto TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 são encontrados em membranas endossômicas e do retículo endoplasmático (O'NEILL; GOLENBOCK; BOWIE, 2013).

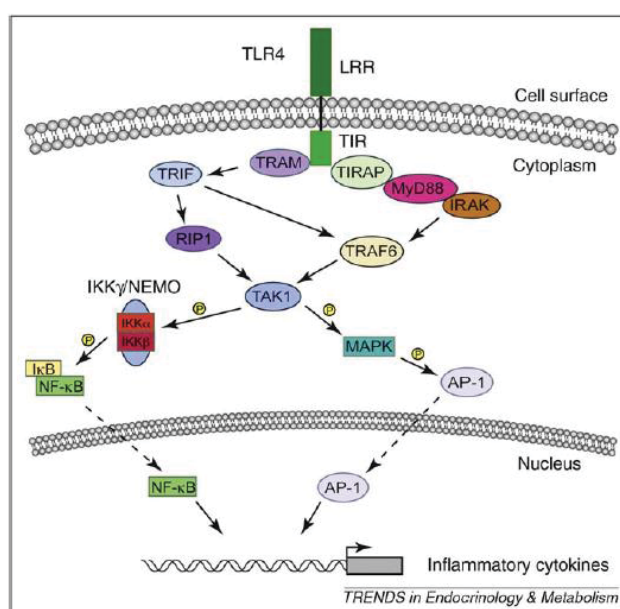
Reconhecimento de TLRs desencadeia uma via de sinalização que levará a ativação do fator de transcrição NF- κ B ou pelo fator de transcrição AP-1 (*activator protein 1*). Há duas vias principais de ativação de TLRs, sendo uma delas através da molécula adaptora MyD88, a qual pode se associar a molécula TIRAP (*TIR domain containing adapter protein*) e realizar o desencadeamento da resposta, culminando na liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF e IL-6. E ainda, através de uma via independente de MyD88, através do recrutamento de TRIF (*TIR domain containing adaptor inducing interferons*) e TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*), levando a produção de interferons do tipo 1 (interferon α e β) (FIGURA 2) (KÖNNER; BRÜNING, 2011; MEDZHITOV, 2001).

TLR2 e TLR4 são os dois principais TLRs que tem demonstrado ter um papel fundamental no desenvolvimento de doenças metabólicas. TLR2 e TLR4 são expressos em uma variedade de tipos celulares, principalmente células do sistema imune como células dendríticas e macrófagos. TLR4 é o TLR mais bem estudado, seu principal ativador são os LPS originados da microbiota

intestinal. Em macrófagos o ácido graxo constituinte do LPS é suficiente para ativar TLR4, mostrando o papel fundamental dos ácidos graxos nesta resposta.

Além disso, a ativação de TLR4 através de LPS e por LDL modificado, pode ser responsável pelo primeiro sinal para início da resposta inflamatória que irá ativar outro PRR da família NLR (*nod-like receptors*), o NLRP3 (NLR family pyrin domain-containing 3), induzindo a produção de IL-1 β . Na sequência, ocorre ativação de TLRs por LPS e ácidos graxos saturados, iniciando a cascata de sinalização de NF- κ B que induzirá a expressão de TNF e IL-6 e MCP-1 (LACKEY; OLEFSKY, 2015).

FIGURA 2 - VIA DE ATIVAÇÃO DE TLR4



LEGENDA: TLR4 (*toll-like receptor 4*) consiste de um domínio LRR (repetições ricas em leucina) e um domínio intracelular TIR (*toll-interleukin 1 receptor*). TLR4 ativa MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*) e vias dependentes de TRIF (*TIR intracelular toll/IL1 receptor domain*). As proteínas adaptadoras TIRAP (*TIR domain-containing adapter protein*) e TRAM (*TRIF-related adapter molecule*) são necessárias para ativação de MyD88, que irá desencadear a cascata levando à ativação de IKK (*inhibitor of NF- κ B kinase*) resultando na fosforilação de IκB (*inhibitor of NF- κ B*) e na translocação de NF- κ B para o núcleo. A ativação da via de MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) resulta na ativação de AP-1 (*activator protein 1*). NF- κ B e AP-1 controlam a expressão de citocinas pró-inflamatórias. FONTE: KÖNNER; BRÜNING (2011).

Por sua vez, TLR2 está mais relacionado ao reconhecimento de uma variedade de componentes de bactérias, fungos e vírus. Ambos, TLR2 e TLR4, podem ser ativados por ácidos graxos saturados (AGS), no entanto são

inibidos pelo ácido graxo poliinsaturado ômega-3. Além disso, os AGLs liberados na circulação também podem ser responsáveis pela ativação de TLRs. Fetuina-A, uma glicoproteína produzida no fígado, parece ser um importante mediador entre a AGL e TLR4, e em camundongos, a ausência de expressão de ambos, impediu a resistência insulínica mediada por AGLs (PAL et al., 2012). AGS parece ser um importante fator para desenvolvimento de resistência insulínica e a leptina pela ativação de TLR2, mas principalmente TLR4 desencadeando a sinalização de JNK e IKK.

Expressão de TLR2 e TLR4 tem sido associada a diversas doenças metabólicas, como a obesidade. Aumento de expressão de TLR2 e TLR4 foi associado a maiores níveis das citocinas TNF e IL-6 (AHMAD et al., 2012). TLR4 foi preferencialmente expresso em macrófagos nas placas ateroscleróticas tanto em humanos quanto em camundongos. Além disso, LDL modificado induziu a superexpressão de TLR4 nos macrófagos (XU et al., 2001). TLR2 e TLR4 podem influenciar também o desenvolvimento de doenças infecciosas e doenças auto-imunes, como artrite reumatoide e lúpus eritematoso sistêmico.

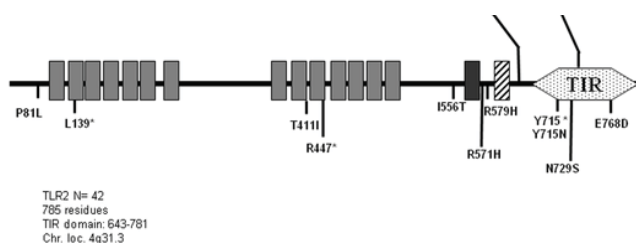
3.4.1.1 Genes *TLR2* e *TLR4*

O gene *TLR2* se encontra no cromossomo 4 (4q31.3), apresenta 3 éxons e o produto gênico possui 784 aminoácidos (GENECARDS) (FIGURA 3)(GEORGEL; MACQUIN; BAHAM, 2009). Polimorfismos neste gene têm sido associados com uma variedade de doenças inflamatórias e metabólicas.

O polimorfismo rs5743704 (c.1892C>A) é uma variante de sentido trocado (Pro631His), o alelo A foi associado à predisposição para tuberculose e à proteção contra meningite. A alteração do aminoácido prolina para histidina impacta a via de sinalização, causando uma menor ativação de TLR2 (ETOKEBE et al., 2010). Alelo G do polimorfismo rs1898830 (c.-147-616A>G) localizado na região intrônica de TLR2, confere proteção a diabetes tipo 2 (HUANG et al., 2015) e susceptibilidade ao citomegalovírus (TANIGUCHI et al., 2013).

Polimorfismo rs3804099 (c.597T>C) é uma substituição sinônima (p.Asn199=) que foi incluída neste estudo. O alelo T foi associado à susceptibilidade ao desenvolvimento da hanseníase (SANTANA et al., 2017), o genótipo TT conferiu maior risco ao desenvolvimento de câncer de colón em mulheres com idade inferior aos 50 anos (SEMLALI et al., 2018) e o genótipo CC foi relacionado à gravidade da aterosclerose coronariana (KUTIKHIN et al., 2016). Apesar da variante sinônima não alterar a sequência de aminoácidos, pode afetar a expressão gênica. Possivelmente pelo desvio no uso de códons, que pode acontecer devido a menor disponibilidade do RNA transportador (RNAt) daquele códon específico (MILLER et al., 2018).

FIGURA 3 - DESENHO ESQUEMÁTICO DA ESTRUTURA DO GENE *TLR2*



FONTE: GEORGEL; MACQUIN; BAHRAM (2009)

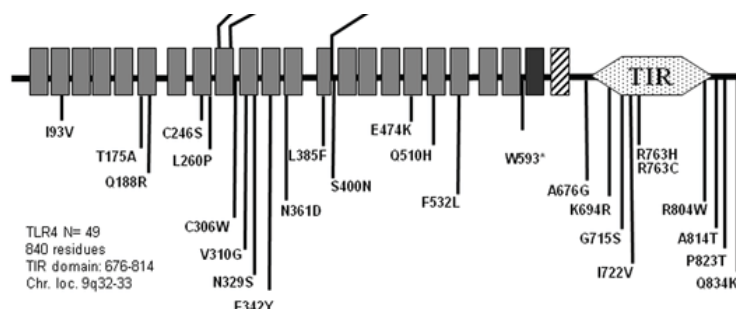
O gene *TLR4* localiza-se no cromossomo 9 (9q33.1), possui 3 éxons e o produto gênico apresenta 839 aminoácidos (GENECARDS) (FIGURA 4). Vários polimorfismos têm sido descritos no gene *TLR4*. Alguns deles na região codificante como o rs4986791 (c.1196C>T), um polimorfismo de sentido trocado (Asp299Gly) associada com doenças cardíacas, neuropatia diabética e outras. O alelo C parece ter efeito protetor contra infarto do miocárdio e aterosclerose (KIECHL et al., 2002). Considerando o papel de *TLR4* na diferenciação dos macrófagos em células espumosas estímulo por LDL modificado (XU et al., 2001), polimorfismos relacionados com o aumento da expressão de *TLR4* também têm sido associados com doenças cardíacas.

O polimorfismo rs1927911 está localizado na região intrônica (c.94-787A>G). O alelo A tem sido associado a menor risco de infarto do miocárdio (ENQUOBAHRIE et al., 2008) e maior susceptibilidade a diabetes tipo 2 (PENG et al., 2015). O polimorfismo rs1554973 (c.260+9805T>C) localiza-se na região

3'UTR (*untranslated region*). O alelo C foi associado a maior susceptibilidade à colite ulcerativa e doença do intestino irritável (BANK et al., 2014). É possível que o alelo T confira menor estabilidade ao RNAm, diminuindo a expressão de *TLR4*, por consequência menor ativação de TLR4. Esses dois SNPs foram incluídos neste estudo.

Polimorfismos que afetam a região reguladora do gene parecem impactar a expressão de *TLR2* e *TLR4* e causar uma menor ativação da sinalização, influenciando em uma menor liberação de citocinas inflamatórias. Esta condição pode ser responsável pela susceptibilidade a infecção por microrganismos e proteção contra o desenvolvimento de doenças como diabetes tipo 2.

FIGURA 4 - DESENHO ESQUEMÁTICO DA ESTRUTURA DO GENE *TLR4*



FONTE: GEORGEL; MACQUIN; BAHRAM (2009).

3.4.2 *NOD-like receptors* (NLRs) - inflamossomos

Os inflamossomos, assim como TLRs, são PRRs (pattern recognition receptors). No entanto, diferente dos TLRs, constituem um grupo de receptores citosólicos. São constituídos por um complexo mutiproteico, formado por três domínios principais: LRR (*leucine-rich repeat*), responsável pelo reconhecimento de PAMPs ou DAMPs; o domínio central NACHT ou NBD (*nucleotide binding domain*), que promove a formação das estruturas oligoméricas; e um N-terminal PYD (*pyrin domain*) ou CARD (*caspase recruitment domain*) que promove a sinalização *downstream*. Um N-terminal CARD geralmente ativa cascatas levando à transcrição de genes pró-

inflamatórios. Alternativamente, um N-terminal contendo PYD recrutará caspases pró-inflamatórias. As famílias podem ser subdivididas em NLRP ou NLRC de acordo com o N-terminal que possuem, ou seja, NLRP (PYD) e NLRC (CARD) (CONFORTI-ANDREONI; RICCIARDI-CASTAGNOLI; MORTELLARO, 2011; SCHRODER; TSCHOPP, 2010).

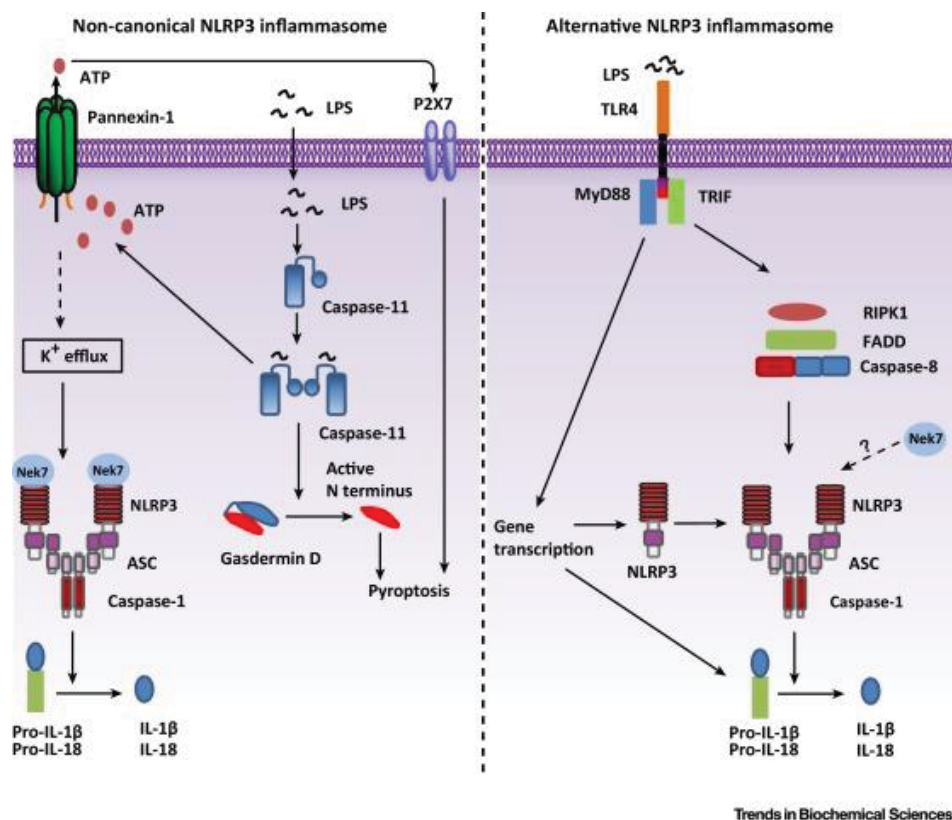
A ativação dos inflamossomos por meio do reconhecimento de PAMPs/DAMPs levará à oligomerização e à formação do complexo que resultará na clivagem da pró-caspase-1 em caspase-1, esta por sua vez será responsável pelo processamento de pro-IL-1 β e pró-IL-18 (interleucina-18) em suas formas ativas IL-1 β e IL-18, levando a piroptose, uma forma de morte celular mediada por inflamação. São quatro tipos principais que se apresentam na estrutura de inflamossomo e requerem a ativação de caspase-1: NLRP1 (*NLR family pyrin domain-containing 1*), NLRP3 (*NLR family pyrin domain-containing 3*), NLRC4 (*NLR family CARD domain-containing protein 4*) e, por último, um membro não NLR, AIM2 (*absent in melanoma 2*) (SCHRODER; TSCHOPP, 2010).

NLRP3 é o inflamossomo mais bem estudado no contexto metabólico. Sua ativação tem sido relacionada à patologia da aterosclerose, obesidade e resistência à insulina. Pode ser ativado por ácidos graxos livres (AGLs) e cristais de colesterol, que podem ser gerados pela internalização de LDL modificado. TLR4 inicia a sinalização através do reconhecimento de LPS, induzindo a expressão de NLRP3 através da ativação de NF- κ B. A oligomerização de NLRP3 recruta a proteína adaptadora ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing CARD*) e pro-caspase-1, desencadeando a ativação da caspase-1 e a maturação e secreção de IL-1 β e IL-18 em suas formas ativas. A expressão de IL-1 β prejudica a sensibilidade a insulina através da fosforilação da serina de IRS-1, dependente de JNK, impedindo a sinalização de PI3K-Akt nos órgãos alvo da insulina (GUO; CALLAWAY; TING, 2015; TSCHOPP; SCHRODER, 2010). Maiores níveis de IL-18 são relacionados à patogênese da aterosclerose, possivelmente pela ativação de células do sistema imune como macrófagos e células T, liberando interferons e outras citocinas inflamatórias (WANG et al., 2015).

A atividade de NLRP3 pode ser regulada por algumas moléculas, como CARD8 (*caspase recruitment domain family member 8*). Estudo inicial identificou o papel da família CARD na inibição da via de NF- κ B através da interação com I κ B (BOUCHIER-HAYES et al., 2001). Outro estudo demonstrou o papel de CARD8 na regulação de NF- κ B e caspase-1 e na indução à apoptose (RAZMARA et al., 2002). Ito e colaboradores (2014) demonstraram o papel de CARD8 como sendo um regulador negativo de NLRP3, através da inibição de ligação de ASC, impedindo a formação de NLRP3 (ITO; HARA; KUBOTA, 2014). A indução da expressão de CARD8 parece ser um fator protetor contra doenças inflamatórias. Apesar dos mecanismos envolvendo CARD8 ainda não terem sido totalmente elucidados, estes estudos demonstraram seu papel na regulação negativa de possíveis indutores da inflamação.

Mais recentemente, outro regulador de NLRP3 foi descrito, NEK7 (*(never in mitosis Gene A)-Related Kinase 7*) (HE et al., 2016). NEK7 é uma serina quinase com diversas funções celulares, especialmente relacionada à progressão do ciclo celular, na formação do fuso mitótico (MEIRELLES et al., 2014). NEK7 é essencial para oligomerização de NLRP3, formação de ASC e ativação da caspase-1. Interage com NLRP3 através do domínio catalítico de NEK7 e do domínio LRR de NLRP3 e essa interação é independente da atividade quinase de NEK7. Este controle é dependente do efluxo de potássio, evento obrigatório na ativação de NLRP3. NEK7 também foi necessário para ativação de NLRP3 em macrófagos contendo a mutação R258W (*NLRP3*). Camundongos quimera selvagem, *Nek7*^{-/-} ou *Nlrp3*^{-/-} apresentaram menores níveis de IL-1 β e, portanto, menor ativação de NLRP3. É possível que a diminuição do potássio intracelular cause mudanças na conformação de NLRP3 que permita NEK7 se ligar (HE et al., 2016; HE; HARA; NÚÑEZ, 2016) (FIGURA 5). Por esse motivo, a maior expressão de NEK7 pode ser um risco para distúrbios inflamatórios.

FIGURA 5 - MECANISMO DE ATIVAÇÃO DE NLRP3.



Legenda: A esquerda a ativação de NLRP3 (NLR family pyrin domain-containing 3), se dá através da entrada de LPS (lipopolissacarídeos) no citosol que irá ativar caspase-11. Esta desencadeia a abertura do canal pannexin-1 que induzirá o efluxo de potássio necessário para oligomerização e ativação de NLRP3 através de NEK7 (never in mitosis Gene A)-Related Kinase 7) e a liberação de IL-1 β (interleucina-1 beta). A direita mecanismo independente do efluxo de potássio, a ativação se dá através do reconhecimento de LPS por TLR4 (toll-like 4) levando a transcrição de genes relacionados a resposta inflamatória como NLRP3. FONTE: HE; HARA; NÚÑEZ (2016).

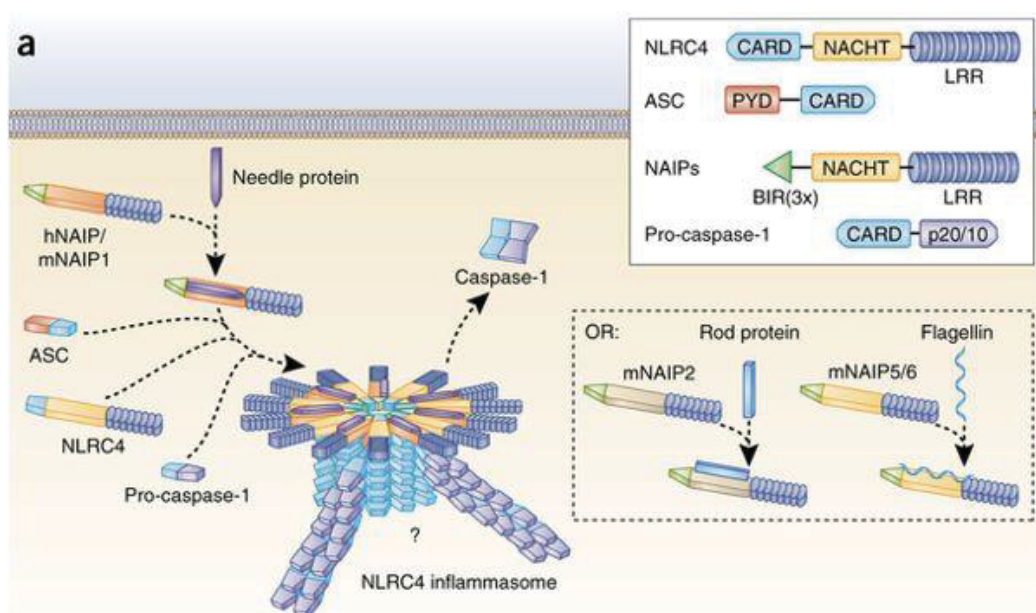
Algumas mutações no gene *NLRP3* são responsáveis por doenças autoinflamatórias hereditárias conhecidas como inflamossopatias. Uma delas é a CAPS (*cryopyrin-associated periodic fever syndromes*), uma doença que apresenta manifestações cutâneas e neurológicas incluindo dor de cabeça, perda da audição e problemas visuais. E FCAS (*familial cold autoinflammatory syndrome*), que apresenta sintomas como febre, urticária e inflamações na conjuntiva após a exposição ao frio. Mutações na região que codifica domínio NACHT têm sido implicadas na etiologia de doenças, como R258W (Arg258Trp), V198M (Val198Met) e Q703K (Gln703Lys). Ambas as mutações estão relacionadas a liberação de grandes quantidades de IL-1 β , responsáveis

pelas manifestações inflamatórias (CONFORTI-ANDREONI; RICCIARDI-CASTAGNOLI; MORTELLARO, 2011; KEDDIE et al., 2018).

O inflamossomo NLRC4 ativa a pró-caspase através da interação de CARD-CARD em resposta à infecção por *Salmonella*, flagelina e outros componentes bacterianos. A ativação de NLRC4 induz a montagem de um complexo formado com as proteínas NAIP (*NLR, family, apoptosis inhibitory proteins*). Ativadores de NLRC4 irão se ligar aos componentes NAIP e não diretamente a NLRC4. Em humanos, há apenas um tipo de proteína NAIP que reconhece T3SS (*type 3 secretory system*) bacteriano. T3SS é encontrado em uma grande quantidade de bactérias gram negativas. As proteínas NAIP ligadas, se oligomerizam com NLRC4 para formar o complexo ativador da caspase-1. A interação do domínio CARD de NLRC4 com CARD de caspase-1 é suficiente para clivagem da pró-caspase-1 e posterior maturação de IL-1 β e IL-18. No entanto ligação com ASC é requerida para aumentar a ativação da caspase-1 (GUO; CALLAWAY; TING, 2015; SHARMA; KANNEGANTI, 2016) (FIGURA 6). Kolb e colaboradores (2016) encontraram maior expressão de NLRC4 e liberação de IL-1, em pacientes obesas com câncer de mama. Uma possível explicação é a alteração da microbiota intestinal decorrente de dieta hiperlipídica, levando à liberação de componentes das bactérias intestinais, desencadeando a ativação de NLRC4. A decorrente liberação de IL-1 pode ter promovido a angiogênese, contribuindo para o desenvolvimento de câncer. No entanto, o mecanismo de NLRC4 é ainda pouco conhecido (KOLB et al., 2016).

Além da função de reconhecer componentes bacterianos, é possível que NLRC4 exerça uma função no reconhecimento de componentes relacionados ao desequilíbrio metabólico, como é o caso da alteração da flora intestinal. Ou até mesmo exercer a atividade de sensor de nutrientes, assim como TLR4 e NLRP3.

FIGURA 6 - ATIVAÇÃO DO INFLAMOSSOMO NLRC4.



Legenda: A ativação de NLRC4 (NLR family CARD domain-containing protein 4) se dá através de componentes bacterianos. NLRC4 forma um complexo com várias proteínas NAIP (*NLR, family, apoptosis inhibitory proteins*) que se oligomerizam em conjunto formam o inflamossomo. FONTE: GUO; CALLAWAY; TING (2015).

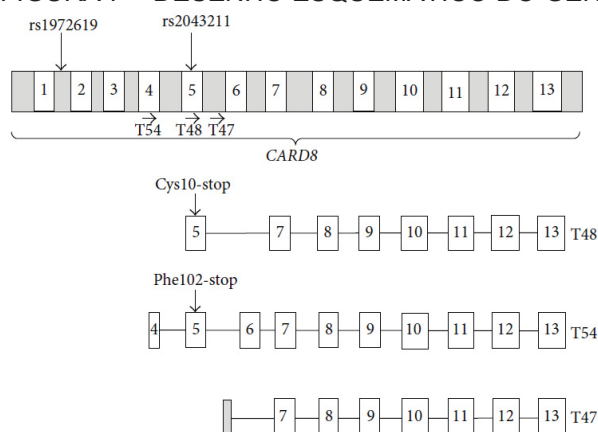
3.4.2.1 Gene *CARD8*

O gene *CARD8* localiza-se no cromossomo 19 (19q13.33), contém 13 éxons e codifica uma proteína com 487 aminoácidos. Bagnall (2008) e colaboradores descreveram várias isoformas de *CARD8* que resultam em mudança no sítio de transcrição e tradução de *CARD8*. A ORF (*open reading frame*) de T48 (transcrito 48) começa no éxon 5 e codifica 432 aminoácidos; a ORF de T54 começa no éxon 4 e codifica 487 aminoácidos. O polimorfismo mais bem estudado em *CARD8* é o rs2043211 (c.304T>A; C10X) que consiste em uma mutação sem sentido no éxon 5, levando à produção de uma proteína truncada. No entanto, com as diferentes isoformas, as consequências deste polimorfismo podem mudar: em T48 a transversoão A>T origina um códon de parada no códon 10 e em T54 leva a uma substituição no códon 52 que resulta na troca de fenilalanina por isoleucina (BAGNALL et al., 2008; PARAMEL; SIRSJÖ; FRANSÉN, 2015) (FIGURA 7).

A combinação deste polimorfismo e do rs35829419 do gene *NLRP3* é associada a certas doenças inflamatórias como Doença de Crohn (ROBERTS et al., 2010) e aneurisma da aorta abdominal (ROBERTS et al., 2011). O polimorfismo rs2043211 foi associado com acidente vascular isquêmico (BAI et al., 2014) e doenças inflamatórias como gota (CHEN et al., 2015a).

O SNP rs6509366 mostrou forte desequilíbrio de ligação com rs2043211 ($r^2 > 0,8$) em um estudo conduzido para identificar variantes relacionados com a infecção por *Salmonella*. Este, e mais dois *tag SNPs* no gene, foram incluídos no nosso estudo (rs7258674 e rs1968440). Polimorfismos que levam a perda de função ou menor expressão de *CARD8* estão relacionados com maior liberação de IL-1 β , conferindo maior susceptibilidade a infarto do miocárdio (ABBATE et al., 2013).

FIGURA 7 – DESENHO ESQUEMÁTICO DO GENE *CARD8*



FONTE: PARAMEL; SIRSJÖ; FRANSÉN (2015)

3.4.2.2 Gene *NEK7*

O gene *NEK7* se localiza no cromossomo 1 (1q31.3), contém 10 éxons e codifica uma proteína com 302 aminoácidos (GENECARDS). Em humanos, existem 11 genes que codificam proteínas NEK (*NEK1-NEK11*). A proteína *NEK7* apresenta um N-terminal catalítico e demais domínios relacionados com a função de serina-treonina quinase. Os domínios das proteínas NEK são moderadamente conservados e apresentam 40-50% de homologia entre si, exceto *NEK6* e *NEK7*, com 85% de identidade entre si (FRY et al., 2012). No

entanto, apenas NEK7 é capaz de regular a atividade de NLRP3. Ainda não foram realizados estudos de associação com polimorfismos em NEK7, para avaliar a sua relação com ativação de NLRP3 e distúrbios inflamatórios. No entanto, foi realizada análise de expressão de *NEK7*, *NLRP3*, *ASC*, *IL-1 β* e *IL-18* em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico. Pacientes apresentaram baixa expressão de *NEK7*, *NLRP3* e *ASC* e maior expressão de *IL-1 β* e *IL-18* comparados a controles. Maior expressão das citocinas inflamatórias pode estar relacionada a outras vias de ativação da inflamação em lúpus (MA et al., 2018).

3.4.2.3 Gene *NLRC4*

Gene *NLRC4* localiza-se no cromossomo 2 (2p22.3) apresenta 9 éxons e codifica um produto com 1024 aminoácidos. Polimorfismos em *NLRC4* têm sido associados a doenças autoimunes como esclerose múltipla (SOARES; OLIVEIRA; PONTILLO, 2019). Em um estudo analisando a susceptibilidade a colonização por *Aspergillus* em pacientes com fibrose cística, observou-se uma menor expressão do genótipo AA de rs212704 (c.2783-514G>A), CC de rs455060 (c.1824C>T; p.Ala608=) e TT de rs385076 (c.-119+805A>T). Sendo que o genótipo AA de rs212704 foi associado com a predisposição à colonização por *Aspergillus* nestes pacientes (IANNITTI et al., 2016). No estudo de Zeller et al (2015), foi encontrada associação entre menores níveis de IL-18 e genótipo TT do rs385076. Por meio de análise de expressão gênica, foi observada menor expressão de *NLRC4* em portadores do alelo T em monócitos. Através de ensaio de gene repórter, observaram que a variante afeta a ligação do fator de transcrição PU.1 na região 5'UTR, diminuindo a expressão do RNAm. Observaram também a associação do alelo T com menor mortalidade na doença arterial coronariana. (ZELLER et al., 2015). Todos os três polimorfismos citados foram incluídos no presente estudo

Recentemente, mutações em *NLRC4* também foram associadas a doenças autoinflamatórias hereditárias. Pacientes heterozigotos para variante H443P (His443Pro) apresentaram uma forma mais leve de FCAS (febre

neonatal, urticária induzida pelo frio e artralgia (dor articular)), esta forma foi denominada de FCAS4. Autoinflamação com enterocolite infantil (AIFEC), também causada por mutações em NLRC4, tem padrão de herança autossômico dominante. Pacientes apresentam enterocolite e reações inflamatórias ao longo da vida que podem ser fatais. Algumas mutações foram associadas a AIFEC, a maioria delas se localiza na região que codifica o domínio NACHT, como a V341A. Estas podem conferir ganho de função, promovendo maior ativação de NLRC4 e por consequência maior liberação de IL-1 β ou IL-18 (ROMBERG; VOGEL; CANNA, 2017).

3.4.3 Fator nuclear kappa B (NF- κ B)

NF- κ B é o mais conhecido fator de transcrição envolvido com a inflamação, oncogênese e imunidade. A família de proteínas NF- κ B pode ser ativada na resposta a ligação de muitos receptores como receptores de célula T, B, TNF, TLR e IL-1R. A família NF- κ B em mamíferos consiste das subunidades p65 (RelA), RelB, c-Rel, p50/p105 (NF- κ B1) e p52/p100 (NF- κ B2) (ZHENG; YIN; WU, 2011). Estes formam homo ou heterodímeros, sendo o heterodímero mais comum p50/p65. As subunidades p50 e p52 são sintetizadas pelos precursores p105 e p100, que sofrem processamento pós-traducional, gerando as subunidades p50 e p52, respectivamente (XIAO, 2004).

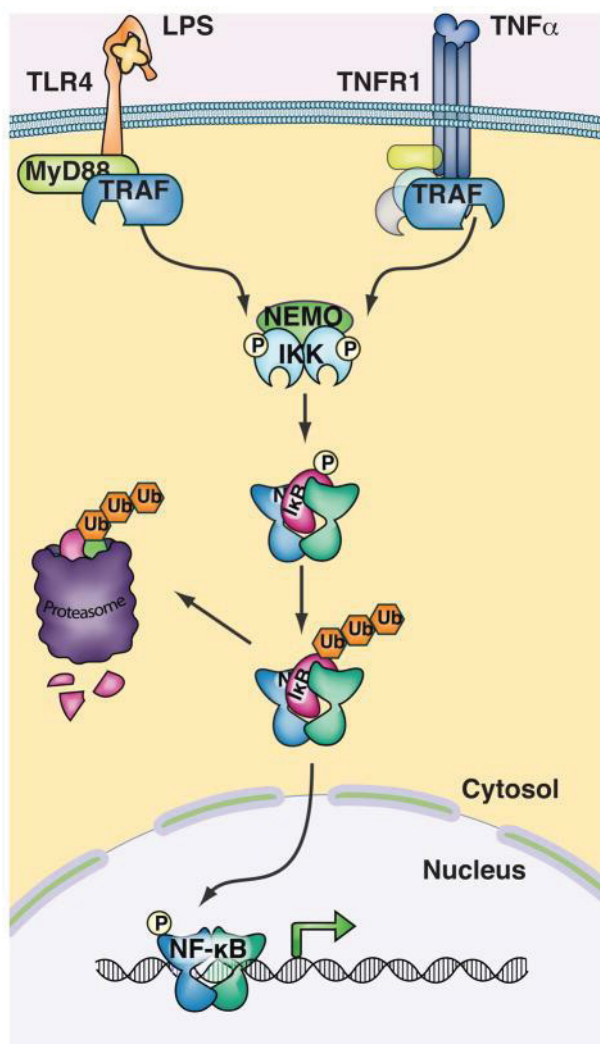
Na resposta inflamatória, NF- κ B age principalmente controlando a transcrição de genes alvo através do domínio de ligação e dimerização ao DNA chamado de RHR (Rel homology region). A atividade das subunidades de NF- κ B é regulada por membros do grupo I κ B (inhibitor of κ B), este inclui I κ B α e I κ B β , que sequestram NF- κ B do citosol e evitam a sua translocação ao núcleo. A ligação de citocinas e PAMPs aos receptores celulares inicia a cascata que converge na ativação do complexo I κ B (IKK). O complexo IKK consiste em três subunidades: as subunidades catalíticas IKK α (IKK1) e IKK β e a subunidade regulatória NEMO (IKK γ). IKK promove a fosforilação dos resíduos de serina das moléculas I κ B α , promovendo a poliubiquitinação que é o sinal para degradação de I κ B α pelo proteossomo. Este processo permite a translocação

nuclear das subunidades p50/p65 e p50/c-Rel, resultando na ativação canônica dos membros de NF- κ B. (BAKER; HAYDEN; GHOSH, 2011; LIU et al., 2017; XIAO, 2004) (FIGURA 8).

Por outro lado, a ativação não canônica depende da ativação através de ligantes da família TNFR (*tumor necrosis factor receptor*), por exemplo. Além disso, não envolve a degradação de I κ B α . A ativação não canônica leva ao processamento, fosforilação e ubiquitinação da subunidade p100, resultando na subunidade p52 e na translocação do complexo não canônico p52/RelB, que é responsável por outras funções na resposta imune adaptativa. O heterodímero p65/p50 é mais frequentemente regulado por I κ B α , que, quando estimulado, é degradado, liberando p65/p50 para o núcleo para ativar a transcrição de genes alvo como citocinas, quimionas e outros mediadores inflamatórios. Os homodímeros p50/p50 e p52/p52, por sua vez, podem reprimir a transcrição destes genes alvo (LIU et al., 2017; XIAO, 2004).

O papel de NF- κ B tem sido amplamente estudado como mediador da resposta imune em diversas vias pró-inflamatórias, incluindo a ativação do inflamossomo. Após a ativação do primeiro sinal através do reconhecimento de PAMPs/DAMPs por TLR4, haverá a ativação da sinalização de NF- κ B, promovendo a transcrição de genes codificantes de NLRP3, IL-1 β e IL-18. NF- κ B tem sido avaliado na fisiopatologia de diversas doenças como esclerose múltipla, doença do intestino irritável e aterosclerose. Na aterosclerose, o acúmulo de partículas de LDL no tecido endotelial, envolve a participação de diversas células do sistema imune. Neste contexto, NF- κ B pode mediar a expressão de citocinas pró-inflamatórias, de quimiocinas e moléculas de adesão celular, que irão recrutar monócitos que irão se diferenciar em macrófagos para eliminar o acúmulo de LDL. No entanto, os macrófagos eventualmente podem fazer parte das células espumosas, as quais contribuem para formação das placas ateroscleróticas (BAKER; HAYDEN; GHOSH, 2011; LIU et al., 2017).

FIGURA 8 – ATIVAÇÃO DE IKK e NF-κB



Legenda: Sinalização de MyD88 (*myeloid differentiation primary response gene 88*) resulta na fosforilação de IKK (IκB kinase) e ativação do complexo IKK. NF-κB (nuclear fator κB) está ligado a molécula IκB, a qual é responsável por manter NF-κB no citosol. A fosforilação dos resíduos de serina em IκB promove a sua poliubiquitinação e degradação, permitindo que NF-κB entre no núcleo e ative a transcrição de genes alvo. FONTE: BAKER; HAYDEN; GOSH (2011).

3.4.3.1 GENES *NFKB1* (nuclear factor kappa B subunit 1)

Gene *NFKB1*, está localizado no cromossomo 4 (4q24) apresenta 24 éxons e codifica uma proteína com 969 aminoácidos. Codifica a subunidade p105 de NF- κ B que sofrerá processamento pós-traducional produzindo a subunidade p50 (GENECARDS). O polimorfismo rs28362491, o mais bem descrito de *NFKB1*, é uma deleção/inserção de quatro bases na região promotora (-94 inserção/deleção ATTG). O alelo deleção (del) reduziu a expressão de p50, pois possivelmente tem menor capacidade de ligação de fatores transcrpcionais. Homozigotos para o alelo deleção (del) parecem ter risco aumentado para doenças cardíacas (ZHOU et al., 2009) e colite ulcerativa (KARBAN et al., 2004), por exemplo. Uma possível explicação alternativa seria a diminuição na formação de dímeros p50/p50, levando à formação de outros dímeros envolvidos na transcrição de genes inflamatórios (SUN; ZHANG, 2007).

No presente estudo foram incluídos dois *tag SNPs* do gene *NFKB1*, rs3755867 e rs3774932. O polimorfismo rs3774932 em um estudo com câncer de mama foi associado ao tempo de recorrência em mulheres com ER (receptor de estrógeno) e PR (receptor de progesterona) positivos (MURRAY et al., 2013). E o genótipo GG do polimorfismo rs3755867 foi associado ao câncer gástrico em uma população chinesa (LI et al., 2017). Ambos SNPs se encontram na região intrônica, e, por se tratarem de tag SNPs, podem estar em desequilíbrio de ligação com possíveis variantes causais. Ambos os polimorfismos rs3755867 e rs3774932 estão em DL com rs28362491 (c.953-372A>G), com $D' = 0,96$ e $D' = 0,99$, respectivamente. Outra possível variação é rs4648068 (também associada ao câncer gástrico) cujo genótipo GG pode superexpressar *NFKB1*, especialmente após a estimulação por LPS (CHEN et al., 2015b). Esta variante também está em DL com rs3755867 ($D' = 0,99$) e com rs3774932 ($D' = 0,96$). Variantes no gene *NFKB1* podem afetar a expressão da subunidade p50, que, quando associada a subunidade p65, aumenta a expressão das citocinas pró-inflamatórias, enquanto que em homodímero (p50/p50), bloqueia a transcrição destes genes.

3.4.3.2 Gene *NFKBIA* (NFKB inhibitor alpha)

O gene *NFKBIA* está localizado no cromossomo 14 (14q13.2), contém 6 éxons e a proteína codificada possui 317 aminoácidos. Codifica o inibidor de NF- κ B, o I κ B α . O éxon 1 codifica a região N-terminal contendo os resíduos de serina; o domínio *ankirin*, o qual está fisicamente relacionado com as proteínas NF- κ B, é codificado pelos éxons 2 a 5; e a região C-terminal é codificada pelo éxon 6 (SUN; ZHANG, 2007). Polimorfismos neste gene têm sido relacionados com doenças inflamatórias e metabólicas. Um dos polimorfismos mais estudados é rs696 (c.*126G>A), que está localizado na região 3'UTR. Este sítio é alvo de microRNAs e o alelo A favorece a ligação do miR449-a, diminuindo a expressão de *NFKBIA* (SONG et al., 2011). O genótipo AA juntamente com o genótipo TT do rs3746444 (pre-miR-449) foi associado com maior risco de aterosclerose (ONER et al., 2017). A combinação de rs696 com rs28362491 foi associada com a susceptibilidade a doença de Behçet. A combinação do genótipo ins/ins de rs28362491 (*NFKB1*) em conjunto com genótipo AA de rs696 (*NFKBIA*) foi associada a maior susceptibilidade de desenvolver a doença (YENMIS et al., 2015). O polimorfismo rs3138053 (-881 A>G) se encontra na região regulatória e portadores de esclerose múltipla tiveram maior frequência do alelo A quando comparados aos controles. Em outro estudo de metanálise, observaram que rs3138053 foi um fator de risco para diversos tipos de cânceres (ZHANG et al., 2015). Ali e colaboradores avaliaram funcionalmente o efeito de três SNPs localizados na região promotora do gene, incluindo o rs3138053, rs2233406 e rs2233409. Observaram que o haplótipo ACC expressou níveis 25% maiores de transcrito que o haplótipo GTT. Polimorfismos localizados na região promotora podem afetar a ligação de diversos fatores transcricionais, diminuindo a afinidade e especificidade do processo de transcrição e impactando os níveis proteicos (ALI et al., 2013). Variantes no gene *NFKBIA* podem afetar a sua expressão e diminuir a sua capacidade de inibir NF- κ B, levando ao desencadeamento da resposta inflamatória. Dessa forma, polimorfismos em ambos os genes tem sido relacionados com desordens envolvendo a ativação de NF- κ B.

3.4.2 Citocinas pró-inflamatórias

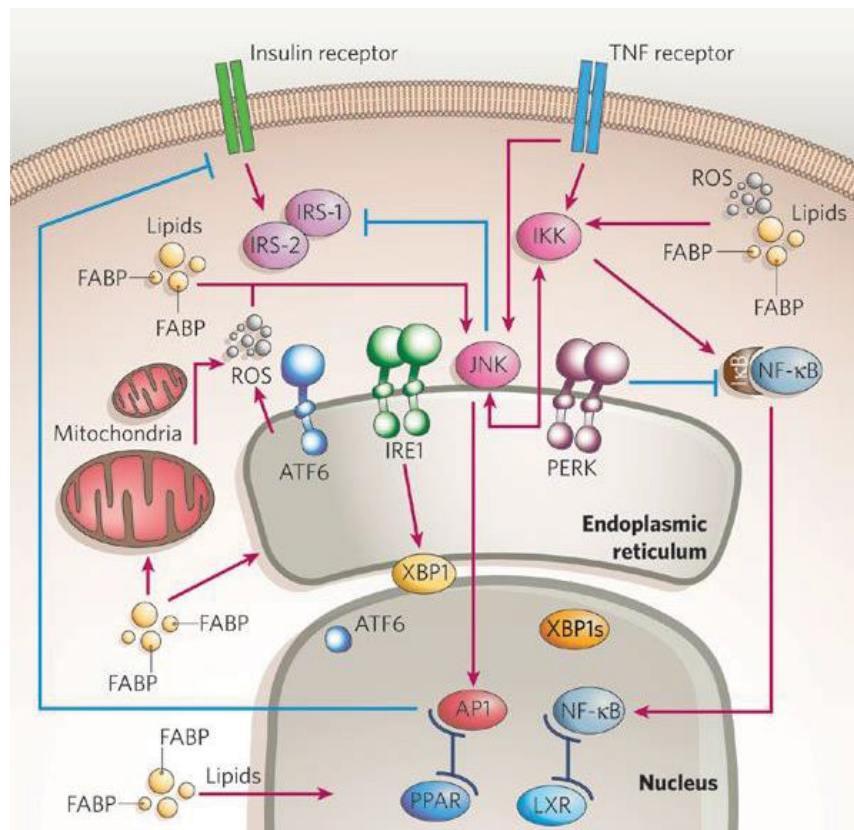
3.4.2.1 TNF (fator de necrose tumoral)

Além das adipocinas, as citocinas inflamatórias também executam uma importante função na regulação do metabolismo no tecido adiposo. TNF foi identificado há mais de 40 anos com seu papel na citotoxicidade em linhagens tumorais e por causar necrose tumoral em modelos animais (WAJANT; PFIZENMAIER; SCHEURICH, 2003). Apenas em 1993 o seu papel no metabolismo começou a ser elucidado. As primeiras evidências vieram da descoberta da expressão de TNF no tecido adiposo de camundongos obesos e depois em humanos (HOTAMISLIGIL; SHARGILL; SPIEGELMAN, 1993). Pouco depois, a sua função na resistência insulínica foi demonstrada; através da neutralização de TNF em camundongos foi observado aumento na sensibilidade à insulina e melhora no metabolismo da glicose (LING et al., 1994). No entanto, ainda não havia se entendido o seu papel na mediação inflamatória e na via de sinalização da insulina. Pouco depois, foi observado que TNF inibia a cascata de sinalização do receptor da insulina, primeiramente em adipócitos e depois em tecido adiposo de indivíduos obesos (HOTAMISLIGIL et al., 1994).

TNF é uma citocina pleiotrópica que exerce tanto papel inflamatório quanto na angiogênese e apoptose. É expressa pelos adipócitos, mas principalmente pelos macrófagos infiltrados no tecido adiposo, por linfócitos, células endoteliais e fibroblastos. TNF é sintetizado primeiramente em uma forma precursora: TNF transmembrana organizada em homotrímeros, constituindo um peptídeo de 233 aminoácidos. Após isso, é clivado pela enzima metaloproteinase TACE (*TNF- α converting enzyme*) em uma forma solúvel homotrimérica (sTNF) de 157 aminoácidos. sTNF liberado irá mediar as atividades biológicas através da ligação com receptores de TNF tipo 1 (TNFR1) ou do tipo 2 (TNFR2). TNFR1 é amplamente expresso em diversos tecidos, enquanto TNFR2 é encontrado mais frequentemente nas células do sistema imune (HORIUCHI et al., 2010; WAJANT; PFIZENMAIER; SCHEURICH, 2003).

Reconhecimento de TNF pelo seu receptor pode ativar duas vias principais, IKK e JNK, que são capazes de desencadear a fosforilação da serina 307 de IRS-1 e, conseqüentemente, inibir a sinalização da insulina. Além disso, a ativação destas duas vias leva à expressão de diversas citocinas pró-inflamatórias (HOTAMISLIGIL, 2006) (FIGURA 9).

FIGURA 9 – TNF E RESPOSTA A INSULINA.



Legenda: ligantes ao receptor de TNF (fator de necrose tumoral) através da sinalização de outras citocinas ou de componentes lipídicos ativam JNK (c-jun terminal kinase) que leva à fosforilação da serina de IRS-1 (insulin receptor substrate 1) e IRS-2 (insulin receptor substrate 2), prejudicando a sinalização da insulina. De forma semelhante ocorre a ativação de IKK (IkB kinase) e a via de NF-κB. FONTE: HOTAMISLIGIL (2006).

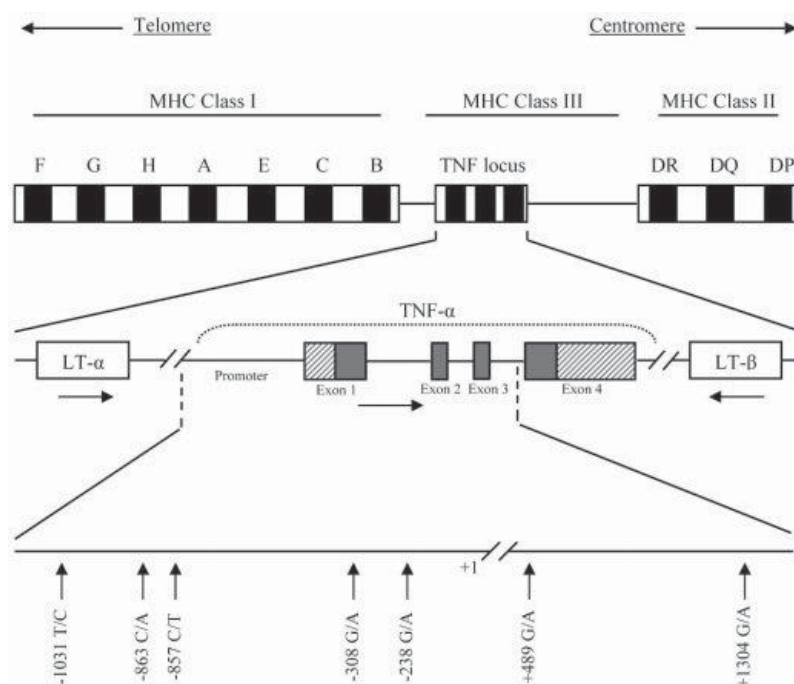
Além de TNF outros possíveis componentes são capazes de prejudicar a sinalização insulínica. Na desregulação metabólica devida à intensa lipólise e liberação de AGLs na circulação, pode ser ativada resposta imune e desencadear a resposta inflamatória que leva à expressão de outros componentes inflamatórios, incluindo TNF. Algumas evidências sugerem que TNF também tem participação na lipólise mediada por glicose, sendo capaz de

realizar lipólise em cultura de adipócitos (GREEN et al., 2004). Além disso, outro mecanismo possível é por diminuir a expressão de perilipina (PLIN). PLIN é localizado na superfície das gotículas lipídicas de triglicerídeos e protege contra a ação da LPL. Diminuição nos níveis de PLIN causa o aumento na lipólise. Maior atividade lipolítica mediada por TNF aumenta os AGLs circulantes e leva à resistência insulínica (DICKER et al., 2007; NIETO-VAZQUEZ et al., 2008).

Elevados níveis de TNF têm sido implicados na fisiopatologia de diversas doenças, como artrite reumatoide (VASANTHI; NALINI; RAJASEKHAR, 2007), lúpus eritematoso sistêmico (ARINGER; SMOLEN, 2008), diabetes tipo 2 (SWAROOP; RAJARAJESWARI; NAIDU, 2012) e aterosclerose (SATTAR et al., 2003).

3.4.2.1.1 Gene *TNF*

O gene *TNF* localiza-se no cromossomo 6 (6p21.33), dentro do MHC (*major histocompatibility complex*), apresenta 4 éxons e codifica uma proteína com 233 aminoácidos (FIGURA 10) (REGO-PEREZ; FERNANDEZ-MORENO; BLANCO, 2008). Vários polimorfismos têm sido identificados na sua região promotora; o principal deles, associado com diversas doenças, é o rs1800629 (-308 G>A). Este polimorfismo tem sido amplamente relacionado com diversas doenças como aterosclerose (ANTONICELLI et al., 2005), diabetes tipo 2 (GOLSHANI et al., 2015), doença de Chron (FERREIRA et al., 2005) entre outras. O alelo A foi associado ao maior risco de infarto do miocárdio (ANTONICELLI et al., 2005) e com menores níveis de insulina (GOLSHANI et al., 2015). O alelo A foi associado a um aumento na expressão de *TNF* (HAMEED et al., 2018; KARIMI et al., 2009), o que pode aumentar a expressão de citocinas inflamatórias, culminando em um maior risco de formação de placas ateroscleróticas e resistência a insulina. Por se tratar de um polimorfismo na região promotora, pode aumentar a afinidade para ligação de fatores transcripcionais, aumentando os níveis de RNAm (RNA mensageiro).

FIGURA 10 – DESENHO ESQUEMÁTICO DO GENE *TNF*

FONTE: REGO-PEREZ; FERNANDEZ-MORENO; BLANCO (2008).

3.4.2.2 Interleucina-6 (IL-6)

É uma citocina com função pleiotrópica capaz de mediar a resposta imune, inflamação e a hematopoiese. Assim como TNF, tem alta expressão no tecido adiposo, no entanto, sua relação com a obesidade ainda é debatida. A família das citocinas IL-6 é composta por um grupo diverso de citocinas, incluindo IL-6, IL-11, IL-27, IL-31, oncostatina, cardiotropina-1 entre outras. IL-6 secretada se liga ao receptor IL-6R, formando um complexo que se associará com outro receptor de membrana chamado glicoproteína 130 (g130), comum a todos os membros da família (exceto IL-31). Também há a forma solúvel de IL-6R (sIL-6R), formada pela clivagem por metaloproteínases e por splicing alternativo, gerando uma IL-6R sem o domínio transmembrana (SCHELLER et al., 2011; TANAKA; NARAZAKI; KISHIMOTO, 2014).

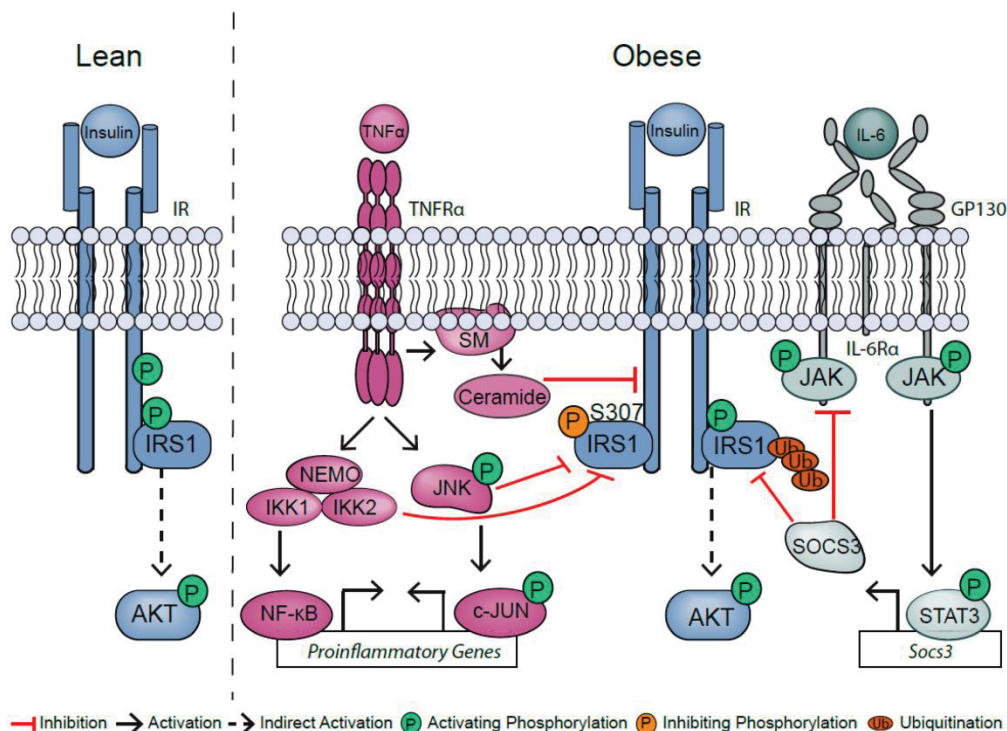
A ligação de IL-6/IL-6R acarretará na ativação das vias de JAK/STAT (*janus/kinase signal transducers and activators of transcription*), ERK (extracellular-signal-regulated kinase) e PI3K, vias responsáveis pela

diferenciação celular e com papel na oncogênese (SCHELLER et al., 2011; TANAKA; NARAZAKI; KISHIMOTO, 2014).

Assim como TNF, aumento na expressão de IL-6 no tecido adiposo se deve à liberação das células do sistema imune. Células endoteliais liberando citocinas, como TNF, IL-6 e IL-1 β , levam à ativação da via inflamatória, produzindo outras citocinas, quimiocinas, que atrairão macrófagos e neutrófilos. Além de ser responsável por ativar células T e pela diferenciação das células B, IL-6 também apresenta um papel na resistência insulínica, no entanto, IL-6 aumenta a expressão de SOCS (*supressor of cytokine signaling*) no tecido adiposo, o qual prejudica a ação da insulina através da ligação a IRS-1 e IRS-2 que leva a ubiquitinação e degradação de ambos os substratos (FIGURA 11) (KERN et al., 2019). Além disso, a participação de IL-6 tem sido reconhecida também no metabolismo lipídico. IL-6 promove o acúmulo de LDL modificado e a formação de células espumosas (HASHIZUME; MIHARA, 2012), fator de risco para aterosclerose. Além disso, LDL modificado aumenta MC-P1 aumentando a concentração de IL-6. No entanto, IL-6 aumenta o efluxo de colesterol através da expressão da apoA1 nos macrófagos, devido à ativação de ABCA1 (ATP binding cassette transporter 1). ABCA1 medeia o efluxo de colesterol das células para as apolipoproteínas, desta forma protegendo contra a aterosclerose (HASHIZUME; MIHARA, 2011; REISS; SIEGART; DE LEON, 2017).

Mauer e colaboradores demonstraram o papel de IL-6 na potencialização da ativação do perfil M2 de macrófagos através da ativação de IL-4 (anti-inflamatória). Camundongos com inativação do gene que codifica o receptor de IL-6 (IL-6R α), em células mieloides, foram suscetíveis ao desenvolvimento de obesidade e de intolerância à glicose, além da exacerbação da resposta a LPS, durante uma dieta hiperlipídica (MAUER et al., 2014). Possivelmente IL-6 providencie uma resposta adaptativa ao estresse metabólico, criando um mecanismo de *feedback* ativando um outro perfil de macrófagos no excesso de nutrientes. Dessa forma é possível que o seu efeito anti e pró-inflamatório pode ser modulado pelos hábitos de vida como alimentação e atividade física (COVARRUBIAS; HORNG, 2014).

FIGURA 11 - MECANISMO DE RESISTÊNCIA A INSULINA MEDIADO POR IL-6



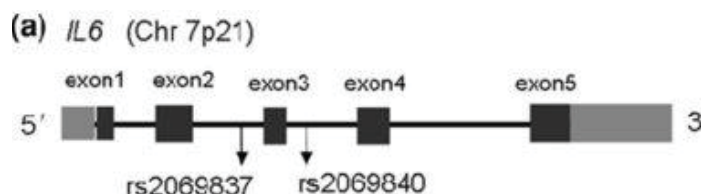
Legenda: TNF (fator de necrose tumoral) e IL-6 (interleucina 6) têm sido relacionados com aumento da resistência insulínica em indivíduos obesos. IL-6 tem efeitos pró e anti-inflamatórios. IL-6 media a ativação de STAT3 e leva a expressão de SOCS (supressor of cytokine signalling), que por sua vez interfere na ação de IRS-1 (insulin receptor substrate 1), prejudicando a ação da insulina. No entanto, a expressão de SOCS3 no fígado previne a resistência insulínica. FONTE: KERN et al. (2019).

3.4.2.2.1 GENE *IL6*

Está localizado no cromossomo 7 (7p15.3), possui 5 éxons e codifica uma proteína de 212 aminoácidos, incluindo uma sequência de 28 aminoácidos de peptídeo sinal (SIMPSON et al., 1997) (FIGURA 12). O polimorfismo rs2069845 foi incluído neste estudo como um *tag SNP* localizado na região intrônica (c.471+870G>A). O alelo G foi associado com o risco de obesidade em crianças e adolescentes (TODENDI et al., 2015). No entanto, em um estudo posterior do mesmo autor, este não foi associado aos níveis de IL-6 (TODENDI et al., 2016). Por se tratar de um *tag SNP*, é possível que o SNP rs1800795 (D'=1,00) seja a variante causal. O *SNP* rs1800795 (-174 G>C) localiza-se na região promotora e seu alelo G foi associado com diabetes tipo 2 (ILLIG et al., 2004); o genótipo GG apresentou-se como um fator de risco para o desenvolvimento de obesidade (GOYENECHEA; PARRA; MARTÍNEZ, 2007).

Possivelmente, o alelo G seja responsável pela maior expressão de IL-6, aumentando os níveis de IL-6 e resultando em um aumento no perfil inflamatório em pacientes com uma comorbidade ou alteração metabólica.

FIGURA 12 – DESENHO ESQUEMÁTICO DO GENE *IL6*



FONTE: SHI et al. (2015).

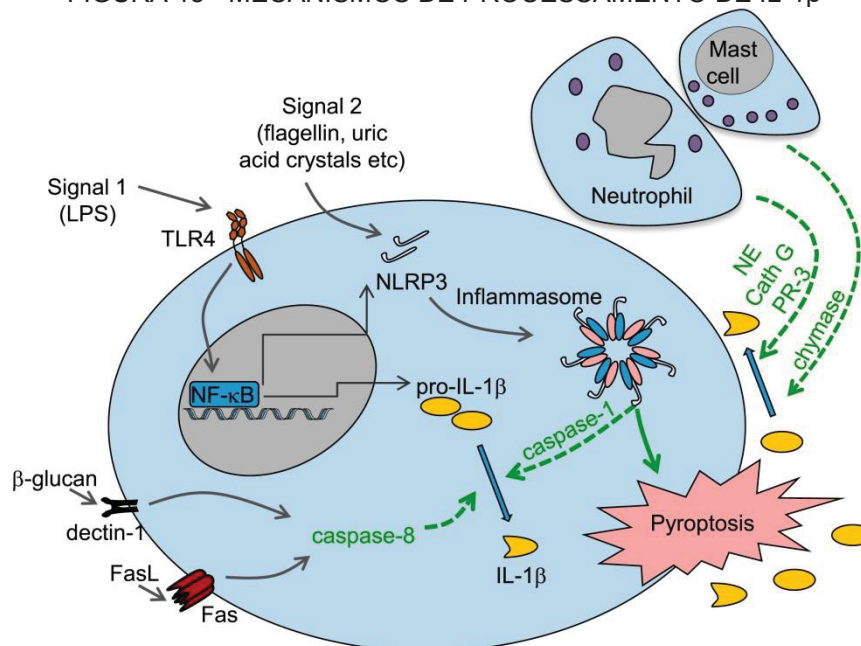
3.4.2.3 Interleucina 1beta (IL- β)

Faz parte da família 1 das citocinas juntamente com IL-1 α e IL-1Ra (IL-1R receptor antagonista) e é expressa por células do sistema imune como monócitos, macrófagos e neutrófilos. É uma citocina pró-inflamatória, produzida em uma forma inativa a pró-IL- β , que é clivada em sua forma madura através da ativação da caspase-1 pelo inflamosomo. Caspase-1 é ativada pela entrada de ATP extracelular, se liga ao receptor P2X7 que abre o poro para o efluxo de potássio. Caspase-1 cliva IL-1 β nove aminoácidos antes do motivo consenso (leucina-arginina-asparagina) criando uma região N terminal. Após o processamento de IL-1 β , a secreção da forma madura pode acontecer via exocitose através dos lisossomos, microvesículas ou exossomos. No caso de infecção por microrganismos, caspase-1 induz a piroptose, uma forma de morte celular mediada por citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β (FIGURA 13).

A forma madura se liga ao receptor IL-1RI (*type I receptor*) e essa ligação é seguida pelo recrutamento da cadeia coreceptora (IL-1RAcP), formando um complexo. Este irá recrutar a molécula adaptadora MyD88 e TIR, ativando os sinais de NF-KB, AP-1 e JNK. IL-1 e TLRs compartilham via de resposta inflamatória. Liberação de IL-1 β tem sido relacionada com a patogênese de diabetes tipo 2. IL-1 β potencialmente diminui a secreção de insulina pelas células beta pancreáticas *in vitro*; possivelmente esse efeito

citotóxico se dê através da via do óxido nítrico sintase ou por prostaglandinas. Desencadeamento da resposta deve se dar através da ativação de NLRP3 através de glucose e AGLs, por exemplo (DINARELLO, 2018; DONATH; BÖNISCHNETZLER, 2010). Além disso, tem um papel na aterosclerose, pois aumento de IL-1 β através da liberação de quimionas ativa as células do sistema imune, contribuindo para formação das células espumosas (NETEA; DINARELLO, 2011). Ademais, outro estudo verificou em linhagem celular de macrófagos (THP-1) que a supressão de LPL diminuiu a expressão das citocinas, incluindo IL-1 β (QIU et al., 2006). Aumento na expressão de IL-1 β tem sido associado com a ocorrência de doenças como artrite reumatóide (DAYER; OLIVIERO; PUNZI, 2017), gota (SO; DUMUSC; NASI, 2018) e diabetes (ZHAO et al., 2014)

FIGURA 13 - MECANISMOS DE PROCESSAMENTO DE IL-1 β



Legenda: O processamento de IL-1 β pode ocorrer por mecanismos dependentes e independentes de caspase-1. O mecanismo dependente envolve a ativação de TLR4 (toll-like receptor 4), de NF- κ B, e o recrutamento de caspase-1 por meio da ativação de NLRP3, clivando IL-1 β em sua forma ativa, levando à morte celular por piroptose e facilitando a liberação de IL-1 β para o espaço extracelular. Outro mecanismo pode ser através da ativação de caspase-8 em resposta a dectina-1 que leva a clivagem de IL-1 β independente da ativação do inflamossomo. FONTE: AFONINA et al. (2015).

3.4.2.3.1 GENE *IL1B*

Localiza-se no cromossomo 2 (2q14.1), apresenta 7 éxons e codifica uma proteína com 269 aminoácidos (GENECARDS). O polimorfismo rs16944 (-1473G>C) foi associado com diversas características metabólicas. Delgado-Lista e colaboradores analisaram este SNP em relação ao nível lipídico pós-prandial. Verificaram que homens idosos portadores do genótipo CC apresentaram níveis de triglicerídeos e colesterol superiores quando comparados a portadores dos demais genótipos. Homens mais jovens portadores do alelo C apresentaram maiores níveis de triglicerídeos (DELGADO-LISTA et al., 2011). O alelo C também foi associado com isquemia miocárdia em pacientes com diabetes tipo 2. Este polimorfismo se encontra na região promotora e deve alterar os níveis de expressão de *IL1B*. O alelo C pode ser responsável pelo aumento na ligação de fatores de transcrição e por consequência aumentar a transcrição de *IL1B*. (VARGAS-ALARCÓN et al., 2015).

O SNP rs1143634 (+3953 C>T) é uma substituição sinônima (Phe105=) e o genótipo CC foi associado a maior circunferência abdominal em pacientes brasileiros (MANICA-CATTANI et al., 2010). Em outro estudo, o genótipo TT foi associado ao menor fluxo coronário (MUTLUER et al., 2018). Apesar de variantes sinônimas não afetarem a sequência de aminoácidos, elas podem alterar a expressão como já mencionado, possivelmente pela alteração na disponibilidade de RNA_t ou até mesmo por alterar a estrutura do RNA_m, mudando sua estabilidade e, por consequência, diminuindo a expressão gênica (GOTEA et al., 2015).

Outro polimorfismo incluído neste estudo (rs3917356) está localizado na região intrônica (c.99+780G>A) e é um tag SNP. Este SNP foi incluído em um estudo juntamente com rs1143634 e rs16944 e foi verificado que o haplótipo ACG (rs1143634 - rs3917356 - rs16944) foi associado com maiores níveis de glicose, maior índice de HOMA-IR (*homeostasis model assessment for insulin resistance*), ou seja, maior resistência insulínica (LUOTOLA et al., 2009).

Aumento nos níveis de IL-1 β tem sido relacionado a etiologia de diversas doenças e também ao desequilíbrio da homeostase lipídica e de glicose.

Polimorfismos que conferem uma maior expressão de IL-1 β podem estar associados à susceptibilidade a doenças metabólicas e inflamatórias.

3.6 MEDIADORES INFLAMATÓRIOS EM RESPOSTA AO EXERCÍCIO

Assim como tecido adiposo, tecido muscular esquelético é um órgão endócrino e libera moléculas que exercem efeito endócrino ou parácrino, chamadas de mioquinas. As mioquinas incluem várias citocinas liberadas pelo músculo como IL-6, IL-10 e outras proteínas como miostatina e BDNF (*brain derived neutropic factor*). Em resposta ao exercício, ou seja, durante a contração muscular muitas destas citocinas são liberadas e podem atuar em outros tecidos e órgãos, como fígado e tecido adiposo e contribuir para a manutenção da homeostase (PEDERSEN; FEBBRAIO, 2008). A prática de exercícios tem sido prescrita atualmente para o tratamento de doenças inflamatórias, como artrite reumatoide, devido à liberação destas moléculas com potencial efeito anti-inflamatório. Além disso, o exercício físico é um importante fator de proteção contra a inflamação crônica observada na obesidade, um fator de risco para comorbidades (BENATTI; PEDERSEN, 2015).

Neste contexto a citocina mais bem estudada é IL-6. É a primeira citocina detectada na circulação sanguínea durante o exercício físico, tem um papel no aumento da lipólise e no aumento nos níveis de cortisol. Seus níveis aumentam até cinco vezes após 30 minutos de exercício chegando até cem vezes após uma maratona. Seguida de IL-15, a qual estimula a lipólise da gordura visceral. IL-6 promove a produção de IL-1Ra e de IL-10, citocinas anti-inflamatórias. IL-1Ra se liga a IL-1R e impede os sinais de transdução de IL-1 β e; IL-10 inibe a transcrição de citocinas pró-inflamatórias como TNF (OSTROWSKI et al., 1998, 1999; PEDERSEN, 2017).

Durante o exercício os níveis de TNF não são alterados, a não ser em exercícios extenuantes, como no caso de maratonas, que podem resultar em um pequeno aumento nos seus níveis (PEDERSEN; FEBBRAIO, 2008). Em um estudo experimental, foi demonstrado que o exercício físico foi suficiente para diminuir os níveis de TNF ocasionado por exposição a doses baixas de

LPS de *Escherichia coli*. Além disso, foi demonstrado que o efeito do exercício pode ser mimetizado pela administração de IL-6, que suprimiu a liberação de TNF estimulado por LPS (STARKIE et al., 2003).

4 JUSTIFICATIVA

Com o novo estilo de vida adotado nos dias de hoje, caracterizado pela ingestão de alimentos altamente processados e inatividade física, tem crescido muito a incidência de doenças metabólicas, incluindo obesidade, diabetes tipo 2, aterosclerose e doenças de ordem inflamatória, como artrite reumatoide, gota e síndrome do intestino irritável (STATOVCI et al., 2017). Também tem aumentado os estudos no campo do metabolismo e a descoberta de evidências relacionadas à inflamação e a ocorrência destes distúrbios. Componentes da dieta, especialmente alta ingestão de gorduras saturadas e açúcar, e o desequilíbrio metabólico que esta alimentação causa nos parâmetros bioquímicos podem ser potenciais ativadores do sistema imune, levando a alterações no metabolismo lipídico, de glicose e impactando nos parâmetros antropométricos.

No entanto, estas características são complexas, pois, além dos fatores ambientais citados, há também participação de variantes genéticas, que podem predispor a essas alterações. Além disso, o componente genético também pode ser responsável por diferentes respostas em processos terapêuticos ou de intervenção física. Polimorfismos codificantes de componentes da resposta inflamatória têm sido associados a diversos distúrbios metabólicos, no entanto, ainda são poucos os estudos que verificaram uma relação destes polimorfismos com variáveis bioquímicas e antropométricas, estreitamente ligadas ao metabolismo. Estes estudos são de extrema importância no entendimento dos mecanismos de desenvolvimento destas alterações e na busca de potenciais alvos terapêuticos.

Para auxiliar no entendimento destes mecanismos este estudo pretende verificar o efeito de polimorfismos nos genes *TLR2*, *TLR4*, *NFKB1*, *NFKBIA*, *NLRC4*, *CARD8*, *NEK7*, *TNF*, *IL6* e *IL1B* sobre variáveis antropométricas e bioquímicas frequentemente relacionadas com o acometimento de distúrbios metabólicos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta tese foi escrita em modelo misto e apresentada em forma de capítulos:

Capítulo I – artigo publicado na revista *Gene*. Constan as análises dos *SNPs* relacionados à via de TLR (*TLR2* e *TLR4*) e NLR (*NLRC4*, *CARD8* e *NEK7*) e as variáveis bioquímicas (metabolismo de lipídeos e de glicose) em duas amostras independentes, adultos e crianças e adolescentes.

Capítulo II – artigo preparado para submissão à revista *Sports Medicine*. Foi analisado o conjunto completo de *SNPs* com a diferença de dados antropométricos e bioquímicos entre o antes e o depois de intervenção física realizada com a amostra de adolescentes e crianças.

Capítulo III – artigo preparado para submissão à revista *Inflammation Research*. Constan as análises dos genes das vias das citocinas (*TNF*, *IL6* e *ILB*) e NFκB (*NFKB1* e *NFKBIA*) e dos dados antropométricos e bioquímicos das duas amostras independentes.

CAPÍTULO I

Artigo publicado na revista Gene.

"Association between Toll-like receptors (*TLR*) and NOD-like receptor (*NLR*) polymorphisms and lipid and glucose metabolism"



Contents lists available at ScienceDirect

Gene

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

Research paper

Association between Toll-like receptors (TLR) and NOD-like receptor (NLR) polymorphisms and lipid and glucose metabolism



Ana Cláudia M.B. Gomes Torres^{a,*}, Neiva Leite^b, Luciane Viater Tureck^a,
Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza^a, Ana Cláudia Kapp Titski^b, Gerusa Eisfeld Milano-Gai^b,
Leilane Lazarotto^b, Larissa Rosa da Silva^b, Lupe Furtado-Alle^a

^a Department of Genetics, Federal University of Paraná, Francisco H. dos Santos, 210 Jardim das Américas, 81531-970 Curitiba, Paraná, Brazil

^b Department of Physical Education, Federal University of Paraná, Coração de Maria, 92 Jardim Botânico, 80215-370 Curitiba, Paraná, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Innate immune system
Metabolism
Polymorphisms
TLR
NLR

ABSTRACT

Recent evidences had shown activation of TLR (toll-like receptors) and NLR (nod-like receptors) in response to imbalance in nutrients intake, such as lipid and glucose. The main aim of this study was to investigate possible associations between 11 SNPs in *TLR2*, *TLR4*, *NLRCA*, *CARD8* and *NEK7* genes and lipid and glucose metabolism. Sample was composed by healthy children and adolescents ($n = 158$) and adults ($n = 115$). DNA extraction was obtained by salting-out and sample genotyping by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry based system. LDL-cholesterol, HDL-cholesterol, triglycerides, total cholesterol, glucose and insulin were measured by standard automated methods. Means were compared by *t*-test or Mann-Whitney test. Univariate and multivariate logistic regression were used to verify association between polymorphisms and lipid and glucose markers. Seven polymorphisms in 5 genes were associated with lipid and glucose parameters. For lipid parameters, the following associations were found: higher LDL-C levels and C allele of rs1554973 (*TLR4*) and G allele of rs6671879 (*NEK7*); higher HDL-cholesterol levels and A allele of rs13105517 (*TLR2*); higher total cholesterol and TT genotype of rs3804099 (*TLR2*) and G allele of rs6671879 (*NEK7*); higher triglycerides levels and G allele of rs455060 (*NLRCA*). For glucose parameters associations were found between C allele of rs7258674 (*CARD8*) and higher glucose levels, and between C allele of rs212704 (*NLRCA*) and G allele of rs455060 (*NLRCA*) and insulin levels. These findings indicate a relationship between polymorphisms of TLRs and NLRs genes and markers of lipid and glucose metabolism.

1. Introduction

Innate immune system represents a first line of defense against pathogens, tissue damage and changes in environment that disrupt organism homeostasis (Fukata et al., 2009). Besides the classical fighting infections function, innate immune system can react to environmental changes, such as diet components. In this way, innate immune system had been implicated in regulation of metabolic homeostasis by activating immune response to excess of nutrients intake, including saturated fatty acid and glucose. Inflammatory cascade could

lead to metabolic disorders, such as cardiovascular diseases and insulin resistance (Lackey and Olefsky, 2015; Rankin and Artis, 2018; Zmora et al., 2017). Moreover, metabolic deregulation is responsible for changes in gut flora profile, leading to the release of lipopolysaccharides (LPS), components of cell wall of gram negative bacteria, culminating in activation of immune response (Castoldi et al., 2016).

Activating of immune response is characterized by two main receptors: TLR (toll-like receptors) and NLR (nod-like receptors) also called of inflammasome. Initiating of immune response is triggered by TLR and NLR recognition of pathogen associated molecular patterns

Abbreviations: AC, abdominal circumference; BMI, body mass index; CARD8, caspase recruitment domain-containing protein 8; DAMPs, damage associated molecular patterns; HC, hip circumference; HDL-C, high density lipoprotein cholesterol; HOMAIR, homeostatic model assessment for insulin resistance; LD, linkage disequilibrium; LDL-C, low density lipoprotein cholesterol; LPS, lipopolysaccharides; NLR, nod-like receptors; NLRCA, NLR family CARD domain-containing protein 4; NLRP3, NLR family Pyrin domain-containing 3; PAMPs, pathogen associated molecular patterns; QUICKI, Quantitative Insulin Sensitivity Check Index; SNP, single nucleotide polymorphism; TC, total cholesterol; TG, triglycerides; TLR, toll-like receptors; UTR, untranslated region; WC, waist circumference

* Corresponding author at: Francisco Heráclito dos Santos, 210, Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Genética, sala 36, CEP: 81531-970, Curitiba, Paraná, Brazil.

E-mail address: ana.torres@ufpr.br (A.C.M.B. Gomes Torres).

<https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.11.065>

Received 20 August 2018; Received in revised form 31 October 2018; Accepted 19 November 2018

Available online 24 November 2018

0378-1119/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

(PAMPs) and damage associated molecular patterns (DAMPs). It culminates in activation of an inflammatory cascade and leads to proinflammatory cytokines releasing (Spiegelman and Hotamisligil, 1993).

Most TLRs are transmembrane receptors and two metabolically relevant TLRs are known: TLR2 and TLR4. TLR4 is activated by LPS and modified LDL. High expression of TLR2 and TLR4 are found in obese patients, possibly contributing to low grade inflammation observed in obesity (Ahmad et al., 2012). Polymorphisms in *TLR2* and *TLR4* genes were associated with metabolic diseases, including diabetes (Buraczynska et al., 2016), atherosclerosis (Kutikhin et al., 2016) and non-alcoholic fatty liver disease (Jermendy et al., 2010; Kapil et al., 2016). Variants in regulatory sequence, such as 5' UTR (untranslated region) and 3'UTR could affect stability of mRNA and alter protein expression and variants in coding sequence could impair protein function. The rs3804099 (*TLR2*) is a synonymous variant (Asn199=) which was associated to bacterial infection (Zhang et al., 2017), psoriasis (Zhang et al., 2009) and hepatocellular carcinoma (Junjie et al., 2012). It was associated with Crohn's disease (Bank et al., 2014) and chorionic plate inflammation (Simhan et al., 2008). Although synonymous variants do not alter amino acid sequence, they could lead to changes in patterns of codon usage, affecting availability of codons and interfere in protein translation (McCarthy et al., 2017).

Recently, a role of inflammasomes in inflammatory and metabolic diseases was discovered. Several metabolic and inflammatory diseases had been associated with activation of inflammasomes including gout, atherosclerosis, obesity, Alzheimer's disease and inflammatory bowel disease (Guo et al., 2015). NLR inflammasomes are cytosolic receptors and NLR family can be subdivided in NLRP or NLRC, according to N terminal content: PYD (pyrin) or CARD (N-terminal caspase recruitment domain) respectively (Sharma and Kanneganti, 2016). NLRP3 (NLR family Pyrin domain-containing 3) and NLRC4 (NLR family CARD domain-containing protein 4) inflammasomes are the two most studied in the context of metabolic and inflammatory disorders (Guo et al., 2015).

The inflammasome NLRC4 activates procaspase-1 to induce cell death in response of *Salmonella* infection. Polymorphism in *NLRC4* gene had been associated with auto inflammation, enterocolitis and cancer (Kolb et al., 2016; Sharma and Kanneganti, 2016) and NLRC4 activation was observed during breast cancer progression in obese patients (Kolb et al., 2016). Furthermore, rs385076 T allele was associated with protective effect against cardiovascular mortality (Zeller et al., 2015). Recent studies identified CARD8 (caspase recruitment domain-containing protein 8) as a negative regulator of NLRP3 inflammasome. CARD8 binds to NLRP3 during inflammasome activation and prevents the assembly of NLRP3 complex, which inhibits proinflammatory cytokines releasing. Polymorphisms in NLRP3 and CARD8 had been associated with cardiovascular diseases, rheumatoid arthritis, celiac disease and Chron's disease (Paramel et al., 2015). NEK7 (Never in Mitosis Gene A)-Related Kinase 7 is a serine/threonine kinase that plays a role in mitotic spindle formation and cytokinesis. NEK7 was recently identified as a mediator of NLRP3 inflammasome assembly and activation (He et al., 2016b; Sharma and Kanneganti, 2016). Thus, it is believed that, as in *NLRP3*, polymorphisms in *NEK7* gene may also be associated with metabolic and inflammatory disorders.

The aim of this study was to investigate the relationship between parameters of lipid and glucose metabolism, potential components of metabolic deregulation, and variants in genes coding components of innate immune response: *TLR2*, *TLR4*, *NLRC4*, *NEK7* and *CARD8* in two independent samples.

2. Materials and methods

2.1. Sample

By difference of metabolism between age group, the sample was separated in two independent samples totaling 273 individuals. Of which 158 are children and adolescents and 115 are adults. Both groups

Table 1

Descriptive statistics of anthropometric and biochemical variables in children and adolescents and adult sample.

Children and adolescents			Adults	
Characteristics	n	Mean $\pm$ SD	n	Mean $\pm$ SD
Female	47	–	80	–
Male	111	–	35	–
Age (years)	157	13.34 $\pm$ 1.99	101	45.43 $\pm$ 10.76
BMI (kg/m ²)	158	24.10 $\pm$ 5.93	115	27.44 $\pm$ 5.73
BMI Z score (kg/m ²)	157	1.25 $\pm$ 1.58	–	–
AC (cm)	105	77.15 $\pm$ 15.27	–	–
WC (cm)	52	84.36 $\pm$ 16.62	114	89.17 $\pm$ 14.04
HC (cm)	–	–	114	103.7 $\pm$ 9.3
TC (mg/dL)	87	168.20 $\pm$ 33.76	115	205.07 $\pm$ 37.32
HDL-C (mg/dL)	158	45.30 $\pm$ 11.81	115	50.68 $\pm$ 13.57
LDL-C (mg/dL)	87	99.07 $\pm$ 28.25	115	129.13 $\pm$ 33.84
TG (mg/dL)	157	90.35 $\pm$ 50.97	115	130.40 $\pm$ 66.17
Glucose (mg/dL)	148	89.73 $\pm$ 12.48	115	83.17 $\pm$ 13.14
Insulin (μ U/mL)	155	10.27 $\pm$ 10.91	114	9.95 $\pm$ 8.48
HOMA-IR	150	1.81 $\pm$ 1.75	–	–
QUICKI	148	0.37 $\pm$ 0.07	–	–

BMI: body mass index; AC: abdominal circumference; WC: waist circumference; HC: hip circumference; TC: total cholesterol; HDL-C: HDL cholesterol; LDL-C: LDL-cholesterol; TG: triglycerides; HOMA-IR: Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance; QUICKI: quantitative insulin sensitivity check index. SD: standard deviation.

are from Curitiba, Southern Brazil where population has predominantly European ancestry. This study was approved by the ethics committee of Federal University and informed written consent was obtained from all participants. Table 1 presents the means and standard error of variables included in this study.

2.1.1. Data collection

Children and adolescents were recruited in public schools to participate of this study. The exclusion criterion was use of medication for weight control and lipid levels. Anthropometric measures were collected as follows: weight and height to calculate BMI (body mass index) Z score, abdominal circumference (AC) or waist circumference (WC). WC was measured at middle point between the lowest rib and the iliac crest at moment of expiration, and AC was measured from high point of iliac crest at time of minimal respiration (Lohman et al., 1988).

Adult sample is constituted of workers of Federal University of Paraná (UFPR), no exclusion or inclusion criteria were used. Anthropometric measures were collected as follows: weight and height to calculate BMI, waist circumference (WC) and hip circumference (HC).

Blood samples were collected from all individuals and high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and triglycerides (TG) were measured by colorimetric method; total cholesterol (TC) and glucose levels were measured by enzymatic methods; insulin levels were measured by chemiluminescence method. LDL-cholesterol (LDL-C) was determined by Friedewald equation (Friedewald et al., 1972).

Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance (HOMA-IR) was calculate using (glucose (nmol/L) $\times$ insulin (μ U/mL)/22.5) (Matthews et al., 1985) and Quantitative Insulin Sensitivity Check Index (QUICKI) was calculated using $1/(\log \text{fasting glucose (mmol/L)} + \log \text{fasting insulin (}\mu\text{U/mL)})$ (Katz et al., 2000) in children and adolescents sample.

2.2. Genotyping

For both samples, DNA was extracted from peripheral blood by a salting out method (Lahiri and Nurnberger, 1991). DNA was then diluted in 50 μ l of water to 20 ng/ μ l final concentration. Genotyping was performed by using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-

Table 2
Characteristics of polymorphisms included in this study.

Gene	SNP	Nucleotide substitution	Location	MAF*	Type
<i>TLR2</i>	rs13105517	c.-1110G > A	Intron variant	0.28 (A)	Tag SNP
<i>TLR2</i>	rs3804099	c.597T > C	Coding sequence (p.Asn199=)	0.46 (C)	Functional
<i>TLR4</i>	rs1927911	c.-147-423A > G	Intron variant	0.28 (A)	Tag SNP
<i>TLR4</i>	rs1554973	c.260 + 9805T > C	3'UTR	0.23 (C)	Functional
<i>NLR4</i>	rs212704	c.2783-514C > T	Intron variant	0.39 (C)	Tag SNP
<i>NLR4</i>	rs455060	c.1824G > A	Coding sequence (p.Ala608=)	0.32 (G)	Tag SNP
<i>NLR4</i>	rs385076	c.-119 + 805T > C	Intron variant	0.32 (T)	Functional
<i>CARD8</i>	rs1968440	c.129-2125A > G	3'UTR	0.11 (A)	Tag SNP
<i>CARD8</i>	rs6509366	c.59 + 642G > A	Intron variant	0.29 (A)	Tag SNP
<i>CARD8</i>	rs7258674	c.-252 + 21A > G	5'UTR	0.40 (A)	Tag SNP
<i>NEK7</i>	rs6671879	c.-29 + 14532A > G	Intron variant	0.39 (G)	Tag SNP

* MAF: minor allele frequency – Frequency based in CEU (Northern Europeans of Utah – USA) population.

flight mass spectrometry based system (Sequenom, San Diego, CA, USA) at University of Auckland, New Zealand (Gabriel et al., 2002).

2.2.1. Selection of polymorphisms

SNPs (single nucleotide polymorphism) included in this study are summarized in Table 2. Candidate genes were searched for with focus in inflammation pathway, mainly in TLR and NLR pathway. Polymorphisms were selected based on linkage disequilibrium (LD) and frequency. LD was analyzed in Haploview software with data from 1000 genomes (<http://browser.1000genomes.org/>). Several SNPs are grouped in blocks with strong LD. For each studied gene at least one SNP, representative of each block (tag SNPs), was chosen (Fig. 1). Selected tag SNPs and respective genes are the following: *TLR2* (rs13105517), *TLR4* (rs1927911), *NLR4* (rs212704 and rs455060), *NEK7* (rs6671879) and *CARD8* (rs1968440, rs6509366 and rs7258674). Three functional SNPs (founded previously in association studies), already associated with metabolic or inflammatory disorders, were also included: *TLR2* (rs3804099), *TLR4* (rs1554973) and *NLR4* (rs385076). All SNPs chosen had minor allele frequency (MAF) of at least 10%.

2.3. Statistical analysis

Allele and genotype frequencies were obtained by direct counting and compared by chi-square test. Normality of variables was tested by Komogorov-Smirnov test with Lilliefors correction. Genotypes were tested through three interaction models (dominant, recessive and co-dominant). In dominant model, homozygotes for the common allele were compared to carriers of the minor allele (heterozygotes and homozygotes for the minor allele). In recessive model, homozygotes for the minor allele were compared to carriers of the common allele (heterozygous and homozygous for common allele). In codominant model homozygous for the common allele were compared to heterozygous versus homozygous for the minor allele.

Means were compared by *t*-test for parametric variables and by Mann Whitney test for no parametric variables. Multiple regression analyses were performed to investigate possible genetic effects over anthropometrical and biochemical variables. Biochemical parameters (HDL-C, LDL-C, TC, TG, glucose, insulin, HOMA-IR and QUICKI) were modeled as dependent variables. Age, sex, BMI and genotypes were modeled as independent variables.

To perform the logistic regression, samples were stratified above or below the median of studied variables. At first, dependent variables and genotypes with significant results in means comparisons were used to construct univariate logistic regression models. Subsequently, multivariate logistic regression models were constructed including age, sex and BMI as independent variables. In order to test if interaction remained significant when all genotypes were analyzed together, a model

including all studied SNPs was constructed. Statistical significance adopted for the tests was 0.05 (5%). Analyses were performed in R program v.3.4.3 (package genetics).

3. Results

Allele and genotype frequencies for studied SNPs are shown in Table 3.

3.1. Children and adolescents

Regarding lipid profile variables, carriers of A allele (minor allele) of rs13105517 (*TLR2*) presented higher HDL-C levels than carriers of G allele ($p = 0.021$). In univariate and multivariate logistic regression rs13105517 was also associated with HDL-C levels ($p = 0.008$ and $p = 0.004$, respectively) (Tables 4 and 5). Individuals with CT and CC genotypes of rs1554973 (*TLR4*) had significantly higher means of LDL-C and TG when compared to those with TT genotype ($p = 0.044$; $p = 0.048$ respectively). However, in logistic regression analysis, only a borderline association with LDL-C was found ($p = 0.053$) (Tables 4 and 5).

Individuals with AA genotype of rs455060 (*NLR4*) presented lower levels of TG than G allele carriers ($p = 0.016$). Association remained significant in a multivariate logistic regression adjusted for sex, age and BMI ($p = 0.047$) (Tables 4 and 5).

Carriers of GA genotype of rs7258674 (*CARD8*) exhibited higher glucose levels ($p = 0.039$) when compared to AA genotype individuals and to G allele carriers ($p = 0.032$). Although individuals with G allele of rs455060 showed higher mean levels of insulin, this association did not remained significant in logistic regression analysis. In multivariate logistic regression C allele carriers of rs212704 were associated with increased insulin ($p = 0.018$). Additionally, C allele carriers also presented lower QUICKI index ($p = 0.014$) (Tables 4 and 5).

3.2. Adults

Regarding lipid profile variables, rs1968440 (*CARD8*), rs212704 (*NLR4*), rs455060 (*NLR4*) and rs6671879 (*NEK7*) were associated with TG levels, however, in univariate logistic regression, association was not statistically significant (Table 6). In multivariate regression analysis, G allele of variant rs6671879 (*NEK7*) was associated with higher LDL-C ($p = 0.025$) and TC ($p = 0.007$) levels. T Allele of rs3804099 was associated with higher TC levels ($p = 0.029$) (Table 7).

Means of glucose were significant for variants rs7258674 (*CARD8*) ($p = 0.035$) and rs212704 (*NLR4*) ($p = 0.046$). In logistic regression analysis, variant rs7258674 remained significantly associated to glucose levels when adjusted for BMI. A Allele of rs7258674 and C allele of rs212704 were associated with lower glucose levels. C allele of

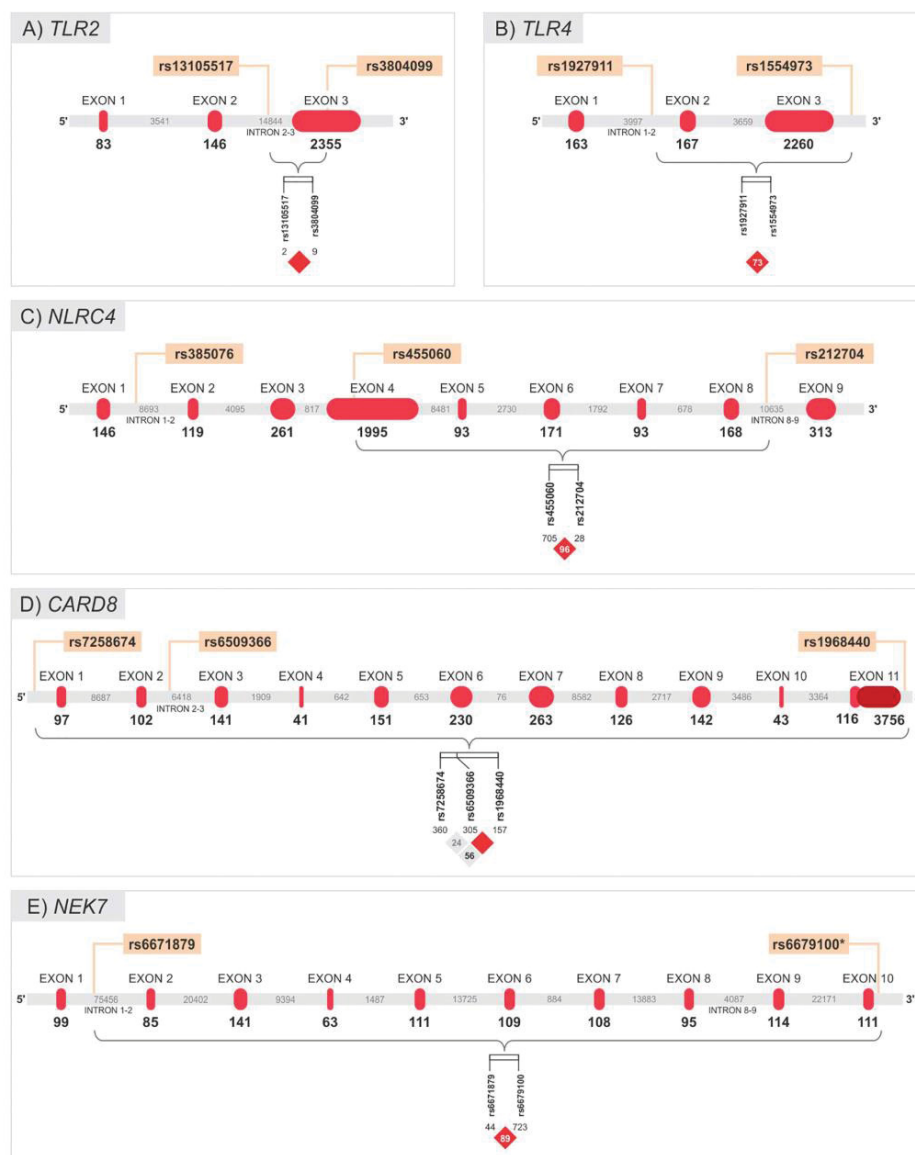


Fig. 1. Schematic figure of genes and LD between SNPs include in this study. Locations and sizes are not scale. Diamonds in shades of pink are representing LD between SNPs, data from Haploview software. A) *TLR2* gene; B) *TLR4* gene data of LD was collected in Ensembl database; C) *NLR4* gene; D) *CARD8* gene and E) *NEK7* gene: *SNP rs6679100 was not include in this study, it is used for demonstrated LD between other region of the gene. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 3

Allele and genotype frequencies of analyzed variant sites from children and adolescents and adult sample.

Gene	SNPs	CA n (%)	Adult n (%)	Gene	SNPs	CA n (%)	Adult n (%)
<i>TLR2</i>	rs13105517			<i>NLR4</i>	rs385076		
	G	195 (62)	154 (67)		C	204 (65)	151 (66)
	A	119 (38)	76 (33)		T	110 (35)	79 (34)
	GG	60 (38)	51 (44)		CC	64 (41)	50 (43)
	GA	75 (48)	52 (45)		CT	76 (48)	51 (44)
<i>TLR2</i>	rs3804099			<i>NLR4</i>	rs455060		
	AA	22 (14)	12 (10)		TT	17 (11)	14 (12)
	T	171 (54)	130 (57)		A	192 (61)	146 (63)
	C	143 (46)	100 (43)		G	122 (39)	84 (37)
	TT	46 (29)	37 (32)		AA	57 (36)	49 (43)
<i>TLR4</i>	rs1554973			<i>CARD8</i>	rs1968440		
	TC	79 (50)	56 (49)		GG	22 (14)	18 (16)
	CC	32 (20)	22 (19)		G	232 (83)	157 (76)
	T	239 (76)	173 (75)		A	46 (17)	49 (24)
	C	75 (24)	57 (25)		GG	107 (77)	72 (70)
<i>TLR4</i>	rs1927911			<i>CARD8</i>	rs7258674		
	TT	90 (57)	63 (55)		GA	18 (13)	13 (13)
	TC	59 (38)	47 (41)		AA	14 (10)	18 (17)
	CC	8 (5)	5 (4)		G	208 (66)	151 (66)
	G	221 (71)	159 (69)		A	108 (34)	79 (34)
<i>NLR4</i>	rs212704			<i>CARD8</i>	rs6509366		
	A	89 (29)	71 (31)		G	210 (67)	156 (68)
	GG	74 (48)	51 (44)		A	104 (33)	74 (32)
	GA	73 (47)	57 (50)		GG	71 (45)	54 (47)
	AA	8 (5)	7 (6)		GA	68 (43)	48 (42)
<i>NLR4</i>	rs212704			<i>NEK7</i>	rs6671879		
	T	170 (54)	130 (57)		A	157 (50)	120 (52)
	C	144 (46)	100 (43)		G	159 (50)	110 (48)
	TT	46 (29)	37 (32)		AA	42 (27)	33 (29)
	CT	78 (50)	56 (49)		AG	73 (46)	54 (47)
<i>NLR4</i>	rs212704				GG	43 (27)	28 (24)
	CC	33 (21)	22 (19)				

CA: children and adolescents sample.

rs212704 and G allele of rs455060 presented significantly lower insulin levels (Table 6). However, rs212704 association with insulin lost statistical significance when adjusted for BMI (Table 7).

Results of association in both samples were summarized in Table 8 (lipid metabolism) and Table 9 (glucose metabolism).

4. Discussion

It is known that disequilibrium of lipid and glucose metabolisms are able to activate innate immune response.

Our study is composed by a population sample, including individuals with diverse lipid and glucose profile. Thus, it is not a case-control study and for that reason it does not include only dyslipidemic patients and respective controls. Moreover, we focused on genes related to inflammation because of the relation between metabolism and immune response observed in metabolic diseases.

Considering the role of inflammasome and TLR in lipid and glucose metabolic deregulation, the discussion was elaborated by grouping our findings in lipid and glucose metabolism.

4.1. Lipid metabolism

HDL is a lipoprotein responsible for reverse cholesterol transport and thus higher HDL level is considered a protector factor against cardiovascular diseases (Rosenson et al., 2016). Polymorphism rs13105517 in *TLR2* gene showed significant association with higher HDL-C levels in carriers of AA genotype when compared to GG genotype individuals in children and adolescents sample. Considering that this variant is a tag SNP, the observed effect may be due to another

variant in linkage disequilibrium (LD), such as rs5743708 ($D' = 0.99$; ENSEMBL database). The rs5743708 is a missense variant (c.2258G > A; p.Arg753Gln) previously associated with risk of developing infectious diseases (Ogus et al., 2004), as well inflammatory diseases (Han et al., 2015) and metabolic disease, such as morbid obesity (Soydas et al., 2016). Moreover, the rs5743708 was associated with lower levels of HDL-C in type 2 diabetes patients (Maldonado-Bernal et al., 2011). Bearing in mind that the above information is in accordance with our findings, it is possible that variants in *TLR2* are associated with HDL-C levels.

Another variant in LD with rs13105517 is rs3804099 ($D' = 0.82$), a variant also included in this study. The rs3804099 is a synonymous variant associated with atherosclerosis (Kutikhin et al., 2016) and susceptibility to bacterial infection (Santana et al., 2017; Zhang et al., 2017). Although synonymous variants do not alter amino acid sequence, differences of mRNA expression considering genotypes were observed, homozygous CC had lower expression than homozygous TT according to Gtex Portal. Furthermore, synonymous variants could be in LD with other unknown causal variants.

Kutikhin and colleagues found, in a Russian population sample, higher severity of coronary atherosclerosis in CC genotype individuals (Kutikhin et al., 2016). In the adult sample of the present study an association was found between rs3804099 and TC. TT genotype individuals presented 2.86% more TC levels than carriers of C allele. Although different associations were found, both studies suggest a relation between polymorphisms in *TLR2* and metabolic parameters. Expression analysis in carriers of different genotypes and animal models could be useful to verify the close relationship between polymorphisms in innate immunity genes and lipid and glucose profile.

Table 4

Comparisons of means with significant results stratified by genotype and univariate logistic regression results in children and adolescents sample.

Biochemical parameters	Gene/SNP			p ¹	p ²
<i>TLR2</i> rs13105517					
HDL-C (mg/dL)	AA (n = 22) 48.55 ± 9.06	GG (n = 60) 43.62 ± 9.18	GG + GA (n = 135) 44.69 ± 12.15	AAGG + GA 0.021	0.008
<i>TLR4</i> rs1554973					
LDL-C (mg/dL)	TT (n = 47) 93.86 ± 30.54	CT (n = 34) 106.95 ± 25.30	CC (n = 6) 95.16 ± 14.89	CTxTT 0.044	0.202
TG (mg/dL)	TT (n = 89) 87.47 ± 54.96	CT (n = 59) 92.65 ± 45.87	CC (n = 8) 110.48 ± 40.56	CCxTT 0.048	0.060
<i>TLR4</i> rs1927911					
TC (mg/dL)	GG (n = 37) 164.11 ± 36.62	GA (n = 42) 175.84 ± 30.90	AA (n = 7) 145.34 ± 25.07	GAXAA 0.017	0.904
<i>CARD8</i> rs1968440					
Glucose (mg/dL)	GG (n = 99) 90.89 ± 12.60	GA (n = 17) 84.89 ± 12.58	AA (n = 14) 86.07 ± 11.68	GGxAA + GA 0.035	0.073
Insulin (μU/mL)	GG (n = 104) 8.51 ± 7.48	GA (n = 18) 18.56 ± 17.58	AA (n = 14) 10.84 ± 12.02	GGxAA + GA 0.009	0.226
HOMA-IR	GG (n = 101) 1.55 ± 1.37	GA (n = 17) 2.70 ± 1.88	AA (n = 14) 2.27 ± 2.99	GGxAA + GA 0.011	0.178
QUICKI	GG (n = 98) 0.38 ± 0.07	GA (n = 18) 0.35 ± 0.08	AA (n = 14) 0.36 ± 0.05	GGxAA + GA 0.028	0.340
<i>CARD8</i> rs7258674					
TC (mg/dL)	GG (n = 41) 170.46 ± 33.77	GA (n = 33) 159.31 ± 27.83	AA (n = 13) 183.72 ± 42.47	GAXAA 0.026	0.584
LDL-C (mg/dL)	GG (n = 41) 100.36 ± 26.63	GA (n = 33) 92.44 ± 27.28	AA (n = 13) 111.80 ± 32.67	GAXAA 0.046	0.520
Glucose (mg/dL)	GG (n = 67) 89.89 ± 12.94	GA (n = 61) 91.18 ± 11.79	AA (n = 20) 84.75 ± 12.26	GAXAA 0.039	0.556
<i>NLR4</i> rs385076					
TG (mg/dL)	CC (n = 64) 77.39 ± 38.44	CT (n = 75) 100.13 ± 56.97	TT (n = 17) 97.31 ± 59.66	CCxCT 0.008	0.098
<i>NLR4</i> rs455060					
TG (mg/dL)	AA (n = 56) 76.90 ± 37.13	AG (n = 78) 100.81 ± 60.50	GG (n = 22) 88.53 ± 36.72	AAXAG 0.018	0.087
Insulin (μU/mL)	AA (n = 56) 8.01 ± 7.70	AG (n = 78) 12.28 ± 13.26	GG (n = 20) 9.05 ± 6.77	AAXAG 0.023	0.225

p value in **bold** are significant.¹ p value of t-test for parametrics data and Man-Whitney non-parametrics data.² p value of univariate logistic regression.

Carriers of C allele of rs1554973 (*TLR4*) presented higher mean levels of LDL-C than TT genotype carriers in children and adolescents. Although there was a trend toward significance ($p = 0.053$), association did not remained significant in multivariate logistic regression. Possibly, the lack of significant association is due to small sample size and the consequent decrease in statistic power.

The rs1554973, it is located in 3'UTR region and polymorphism in this region could affect stability of mRNA resulting in altered *TLR4* expression. Furthermore, this region could be a microRNA target leading to degradation of mRNA and to a decreased gene expression. According to GTEx Portal, heterozygous CT and homozygous CC had higher levels of *TLR4* expression in esophagus (GTEx (Genotype-Tissue Expression), 2017). Higher levels of LDL-C and *TLR4* expression are risk factors for cardiovascular diseases. In our study, heterozygous CT presented higher LDL levels and homozygous TT lower LDL-C levels. At moment, this polymorphism was associated with susceptibility to infections (Simhan et al., 2008) and autoimmune diseases (Bank et al., 2014).

Recent evidence had shown a *TLR4* function in macrophages infiltration in adipose tissue and also that activation of *TLR4* is mediated by lipid metabolic pathway (Lancaster et al., 2018). Moreover, *TLR4* is expressed in coronary plaques and *TLR4* macrophage expression is upregulated by LDL. Expression of *TLR4* in monocytes, in conjunction with oxidized LDL, leads to formation of foam cells which are responsible for the atherosclerotic process (Xu et al., 2001). Mice deficient in LDL and *TLR2* (*LDL*^{-/-} *TLR2*^{-/-}) expression exhibited

reduction of atherosclerosis (Mullick et al., 2005).

TLRs had been proposed to act as sensors of nutrients and it is possible that deregulation of lipid ingestion leads to increase of circulating LDL-C and activation of *TLRs* such as *TLR2* and *TLR4* (Huang et al., 2012).

These findings are in agreement with the association found between *TLR4* polymorphism and LDL-C. It is possible that gene variants, together with higher LDL-C levels, could activate immune response predisposing to metabolic diseases.

The *NLR4* (inflammasome) SNP rs455060 was associated with TG; carriers of AG genotype presented higher TG levels when compared to individuals with AA and GG genotypes. This variant is also a tag SNP and was previously associated with cystic fibrosis patients predisposition to *Aspergillus* colonization (Iannitti et al., 2016). Expression of *NLR4* inflammasome had been studied in some human diseases such as: atherosclerosis, breast cancer and susceptibility to bacterial infection (Gong and Shao, 2012; Johansson et al., 2015; Kolb et al., 2016). *NLR4* activating leads to IL-18 releasing, which contributes to atherosclerotic plaques formation (Johansson et al., 2015). Moreover, *NLR4* activation was also related to breast cancer progression in obese patients, due to IL-1β releasing. Analysis of SNP rs455060 expression on GTEx Portal, showed that heterozygous AG and homozygous AA presented higher levels of *NLR4* expression in adipose tissue than GG genotype.

Considering that the rs455060 is a synonymous variant, the observed association could be due to a variant in LD with it, such as the

Table 5

Multivariate logistic regression results of children and adolescents sample adjusted for age, sex and BMI.

Biochemical parameters	rs13105517 <i>TLR2</i>	rs1554973 <i>TLR4</i>	rs212704 <i>NLR4</i>	rs455060 <i>NLR4</i>	rs1968440 <i>CARD8</i>	rs7258674 <i>CARD8</i>
Lipid metabolism						
HDL-C (mg/dL)	AA 48.55 ± 19.06 GG + GA 44.69 ± 12.15 0.004	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
p	n.s.	TT 93.86 ± 30.54 CC + CT 105.18 ± 24.25 0.053	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
LDL-C (mg/dL)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
p	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	AA 151.90 ± 30.10 GG + GA 171.87 ± 34.77 0.0491	n.s.
TC (mg/dL)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
p	n.s.	n.s.	n.s.	AA 76.90 ± 37.13 GG + AG 98.11 ± 56.21 0.047	n.s.	n.s.
TG (mg/dL)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
p	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	AA 84.75 ± 12.26 GG + GA 90.50 ± 12.37 0.032
Glucose metabolism						
Glucose (mg/dL)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
p	n.s.	n.s.	TT 9.34 ± 10.20 CT + CC 10.72 ± 11.26 0.018	AA 8.01 ± 7.70 GG + GA 11.62 ± 12.26 0.098	n.s.	n.s.
Insulin (μU/mL)	n.s.	n.s.	TT 0.39 ± 0.09 CT + CC 0.36 ± 0.06 0.014	n.s.	n.s.	n.s.
p	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
QUICKI	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
p	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Values are mean ± SD of each genotype.

p values in **bold** are significant.

n.s - non-significant results.

functional SNP rs385076 (a variant also included in our study; $D' = 0.90$). In a study that performed functional analyzes of *NLR4*, the T allele of rs385076 was associated with lower levels of circulating IL-18 and it was presented as a protective factor against cardiovascular mortality (Zeller et al., 2015).

In the present study, we found that individuals with CT genotype of rs385076 presented higher levels of TG than those with CC genotype ($p = 0.008$). Higher TG levels may influence the activation of the *NLR4* inflammasome in carriers of AG genotype of rs455060 as well CT genotype of rs385076. These genotypes may lead to higher *NLR4* expression and consequently to the activation of the respective inflammasome and to higher amounts of IL-18.

G allele of *NEK7* rs6671879 was associated with higher levels of LDL-C and TC in carriers of G allele in adult sample. A recent study was able to shed some light in the role of *NEK7* in regulation of oligomerization and activation of NLRP3 (He et al., 2016b). *NEK7* activates NLRP3 but not *NLR4* in a process dependent of K^+ efflux. Although the role of *NEK7* in NLRP3 activation and its relation with cell cycle is not fully understood, it is known that *NEK7* is essential to NLRP3 activation (He et al., 2016a). Considering NLRP3 inflammasome as a sensor of cellular homeostasis disturbance, it is likely that *NEK7* mediates the activation of NLRP3 in response to metabolic homeostasis breakdown. Variants in *NEK7*, in this case, the G allele of rs6671879, could lead to an increased K^+ efflux by binding with activators of immune system, such as components of lipid profile (LDL-C and TC).

Nevertheless, more studies are necessary to elucidate the real function of *NEK7* and its action in the presence of possible inflammasome activators.

In 2011, Osborne and colleagues demonstrated a link between lipid metabolism and inflammasome activation. They showed that macrophages of mice deficient in lipogenic transcriptional factor gene *SREBP-1a* (sterol regulatory element binding protein 1a) failed to activate lipogenesis in the presence of LPS. In addition, the same macrophages also failed to activate caspase-1 and in IL-1 β production, two components of inflammasome function. Moreover, they found that *SREBP-1* regulates expression of *Nlrp1* gene in macrophages (Im et al., 2011). In 2013, porcine model provided evidences of *SREBP-2* function in NLRP3 inflammasome activation in atherosclerosis (Li et al., 2013). These findings provide insights into the relationship between lipids and innate immune response in physiopathology of metabolic disorders.

Furthermore association that we found between lipid markers and polymorphisms in innate immune related genes corroborate with evidences about the relationship between innate immune system and lipid profile.

4.2. Glucose metabolism

As well as lipid levels deregulation, high glucose level also have a potential to act as a trigger of innate immune response. It is known that metabolic imbalance is related to insulin resistance, which impairs

Table 6

Comparisons of means with significant results stratified by genotype and univariate logistic regression in adult sample.

Biochemical parameters	GENE/SNP		p ¹	p ²
<i>CARD8</i> rs1968440				
TG (mg/dL)	GG (n = 72)	AA (n = 18)	AAXGG	0.090
	136.84 ± 66.55	102.22 ± 45.88	0.033	
Insulin (μU/mL)	GG (n = 71)	AA (n = 18)	AAXGA	0.742
	10.18 ± 8.78	10.43 ± 5.08	0.041	
<i>CARD8</i> rs7258674				
Glucose (mg/dL)	GG (n = 54)	AA + GA (n = 61)	GGxAA + GA	0.049
	85 ± 10.65	81.55 ± 14.90	0.035	
<i>NLR4</i> rs212704				
TG (mg/dL)	TT (n = 37)	CT + CC (n = 78)	TTxCT + CC	0.051
	147.02 ± 70.19	122.52 ± 63.12	0.040	
Insulin (μU/mL)	TT (n = 37)	CT + CC (n = 77)	TTxCT + CC	0.012
	12.56 ± 13.03	8.70 ± 4.65	0.033	
Glucose (mg/dL)	TT (n = 37)	CT + CC (n = 78)	TTxCT + CC	0.025
	86.05 ± 12.69	81.80 ± 13.21	0.046	
<i>NLR4</i> rs455060				
TG (mg/dL)	AA (n = 49)	GG + GA (n = 66)	AAXGG + GA	0.068
	142.69 ± 68	121.28 ± 63.77	0.034	
Insulin (μU/mL)	AA (n = 49)	GG + GA (n = 65)	AAXGG + GA	0.018
	11.72 ± 11.57	8.62 ± 4.73	0.049	
<i>NEK7</i> rs6671879				
TG (mg/dL)	GG (n = 28)	AG (n = 54)	GGxAG	0.696
	149.35 ± 72.05	118 ± 54.70	0.040	

p value in **bold** are significant.

¹ p value of t-test or Man-Whitney when appropriated.

² p value of univariate logistic regression.

Table 8

Sumarized results of association between polymorphism and lipid profile.

LIPID METABOLISM	
Children and adolescents	Adults
LDL-C	LDL-C
Gene: <i>TLR4</i> (rs1554973)	Gene: <i>NEK7</i> (rs6671879)
C (CC+CT) ▲	G (GG+AG) ▲
T (TT) ▼	A (AA) ▼
TG	TC
Gene: <i>NLR4</i> (rs455060)	Gene: <i>NEK7</i> (rs6671879)
G (GG+GA) ▲	G (GG+AG) ▲
A (AA) ▼	A (AA) ▼
HDL-C	TC
Gene: <i>TLR2</i> (rs13105517)	Gene: <i>TLR2</i> (rs3804099)
A (AA) ▲	T (TT) ▲
G (GG+GA) ▼	C (CC+CT) ▼

LDL-C: LDL-cholesterol; TG: triglycerides; HDL-C: HDL-cholesterol; TC: total cholesterol. Green arrows: higher levels and red arrows: lower levels.

glucose metabolism. Moreover, excess in nutrients intake, such as glucose, is likely to activate innate immune response by disturbance of metabolic homeostasis (Jin et al., 2013). We found association between polymorphisms in genes coding components of inflammasome (*CARD8* and *NLR4*) and glucose and insulin levels in both samples.

The rs7258674 (*CARD8*) G allele was associated to higher glucose

Table 7

Multivariate logistic regression analyses results in adult sample adjusted for sex, age and BMI.

Biochemical parameters	rs3804099	rs212704	rs455060	rs1968440	rs7258674	rs6671879
Lipid metabolism						
HDL (mg/dL)	n.s	n.s	GG 52.11 ± 11.69 AA + GA 50.42 ± 13.93 0.071	n.s	n.s	n.s
p						
LDL (mg/dL)	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	AA 123.13 ± 28.05 GG + AG 131.54 ± 35.77 0.025
p						
TC (mg/dL)	TT 209.02 ± 40.39 CC + TC 203.20 ± 35.89 0.029	n.s	n.s	n.s	n.s	AA 198 ± 28.91 GG + AG 207.92 ± 28.91 0.007
p						
TG (mg/dL)	n.s	n.s	n.s	AA 102.22 ± 45.88 GG 136.84 ± 66.55 0.077	n.s	n.s
p						
Glucose (mg/dL)	n.s	n.s	n.s	n.s	GG 85 ± 10.65 AA + GA 81.55 ± 14.90 0.049	n.s
p						
Insulin (μU/mL)	n.s	TT 12.56 ± 13.03 CT + CC 8.70 ± 4.65 0.15	AA 11.72 ± 11.57 GG + GA 8.62 ± 4.73 0.019	n.s	n.s	n.s
p						

p value in **bold** are significant.

Values are mean ± SD of each genotype.

n.s - non-significant results.

Table 9

Sumarized results of association between polymorphism and glucose markers.

GLUCOSE METABOLISM	
Children and adolescents	Adults
GLUCOSE Gene: <i>CARD8</i> (rs7258674) G (GG+AG) ▲ A (AA) ▼	GLUCOSE Gene: <i>CARD8</i> (rs7258674) G (GG) ▲ A (AA+AG) ▼
INSULIN Gene: <i>NLR4</i> (rs212704) C (CT+CC) ▲ T (TT) ▼	INSULIN Gene: <i>NLR4</i> (rs212704) T (TT) ▲ C (CT+CC) ▼
INSULIN Gene: <i>NLR4</i> (rs455060) G (GG+GA) ▲ A (AA) ▼	INSULIN Gene: <i>NLR4</i> (rs455060) A (AA) ▲ G (GG+GA) ▼
QUICKI Gene: <i>NLR4</i> (rs212704) T (TT) ▲ C (CT+CC) ▼	

Green arrows: higher levels; red arrows: lower levels.

levels in both samples. Expression data deposited in GTEx Portal, show that homozygotes GG had lower expression in most tissues including thyroid, skeletal muscle and whole blood. The rs7258674 is located in the intron of 5'UTR and it is possible that the G allele affects transcription, which is compatible with the lower expression levels displayed in GTEx data.

Considering that *CARD8* is a component of the inflammasome which negatively regulates caspases activation, lower expression could

be related with activation of NLRP3. In addition, higher glucose levels are potential disruptors of homeostasis and able to trigger innate immune response.

Furthermore, rs7258674 is a tag SNP and so it is likely that the association is due to another polymorphism in LD with it. A possible candidate is rs2043211 ($D' = 0.79$) which had been associated with cardiovascular diseases, rheumatoid arthritis, inflammatory bowel disease and other inflammatory disorders (Paramel et al., 2015). The rs2043211, together with rs35829419 of *NLRP3* gene, were associated with metabolic and inflammatory diseases (Paramel et al., 2015; Pontillo et al., 2010).

Bearing in mind that breaking of metabolic homeostasis is responsible for inflammasome activation, glucose level and other biochemical parameters, together with polymorphism in *CARD8*, may be factors that induce releasing of IL- β /IL-18, contributing to low grade inflammation. Moreover, pro inflammatory cytokines are related with insulin resistance and therefore glucose metabolism.

The rs212704 and rs455060 in *NLR4* gene were associated with insulin levels in both samples. Contrary to that found in adults, in children and adolescents sample, carriers of G allele of rs455060 presented higher insulin levels than AA genotype. The same was observed for rs212704: in children, C allele was associated with higher insulin levels, while in adults C allele was related with lower insulin levels. Considering that QUICKI is a good predictor of insulin resistance, children and adolescents carriers of C allele of rs212704 exhibited a decrease of QUICKI index compatible to insulin sensitivity.

These contrasting results of insulin levels in children and adults may be due to the differences in metabolism. Adults and children have differences in energy expenditure and consequently of circulating glucose and insulin levels. In children, the growth hormone is circulating and it antagonizes insulin action, influencing its circulating levels. Additionally, sex hormones may influence, besides other genetic factors underlying insulin releasing.

Despite the contrasting results, polymorphisms in *NLR4* gene were associated with markers of both metabolic pathways studied. These associations are suggestive that variants in the *NLR4* gene are related to glucose metabolism and that they possibly play a role in *NLR4*

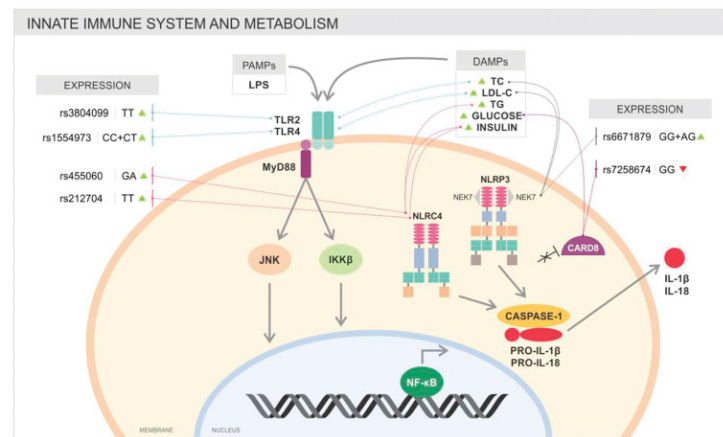


Fig. 2. Relationship between association of polymorphism in innate immune system and metabolism components and possible implication in inflammatory pathway.

Data expression was based on GTEx Portal. Green arrows: higher levels; red arrows: lower levels. Innate immune system could be activated by components of lipid and glucose metabolism. Polymorphism in TLRs could increase expression of TLR2 (rs3804099 TT) and TLR4 (rs1554973 C allele) and when submitted to potential DAMPs, such as TC and LDL-C and by PAMPs, as LPS, could activate the TLR pathway. It leads to translocation to NF- κ B and transcription of pro-inflammatory cytokines including IL-1 β and IL-18, culminating in inflammatory response. Potential DAMPs, including TC, LDL-C, TG, glucose and insulin, could be recognized by NLRs (inflammasomes) and triggers the activation of procaspase-1 in caspase-1 that cleaves the pro-IL-1 β and pro-IL-18 in their active forms IL-1 β and IL-18. Polymorphism rs455060 G allele and rs212704 TT genotype of *NLR4*, rs6671879 G allele of *NEK7*

(potential activator of inflammasome NLRP3) could increase the expression of NEK7 and rs7258674 GG genotype of *CARD8* (negative regulator of NLRP3) could decrease the expression of *CARD8*. When facing deregulation of lipid and glucose metabolism, carriers of these genotypes could have increased immune response. Legends: TLR: toll-like receptors; TLR2: toll-like receptor 2, TLR4: toll-like receptor 4; DAMPs: damage-associated molecular pattern; PAMPs: pathogen-associated molecular pattern; LPS: lipopolysaccharides; MyD88: myeloid differentiation primary response 88; JNK (jun N-terminal kinases); IKK β : inhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit beta; NF- κ B: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; IL-1 β : interleukin 1 β and IL-18: interleukin 18; NEK7: (never in mitosis gene A)-related kinase 7; NLRP3 NLR family pyrin domain containing 3; NLR4: NLR family CARD domain-containing protein 4; *CARD8* caspase recruitment domain-containing protein 8. TC: total cholesterol; LDL-C: LDL-cholesterol; TG: triglycerides. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

inflammasome activation. It is possible that, besides the function of fighting infections, the inflammasome NLR4 can be activated in response to metabolic homeostasis deregulation.

TLRs and NLRs have been implicated in recognition of dietary compounds and in triggering inflammatory response culminating in disruption of homeostasis. Several dietary factors, such as saturated fatty acid, oxidized LDL and high levels of glucose could be activators of TLR2, TLR4 and inflammasome, causing metabolic disruption and increased gut permeability, culminating in the release of LPS from gram-negative bacteria of the intestine, also potential activators of the innate immune system (Jin et al., 2013). Furthermore, expanding adipose tissue and releasing of free fatty acids in circulation could also activate innate immune system. In this way, activating of TLR pathway triggers signaling cascade leading to the activation of IKK β (inhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit beta) and JNK (Jun N-terminal kinases) and production of pro-inflammatory cytokines (Hotamisligil, 2017).

Moreover, activation of inflammasome leads to assembly of the protein responsible for caspase-1 activation, and consequently to maturation and secretion of IL-1 β and IL-18 (Lackey and Olefsky, 2015). The inflammatory scenario could increase the development of insulin resistance and impairment of glucose metabolism. Polymorphisms in genes of the innate immune system pathway could be responsible for the increase of expression of TLR/NLR components and possibly increase inflammatory response when facing the excessive intake of high fat and sugar foods (Fig. 2).

This study has some limitations, such as small sample size and thereby reduced statistical power. Furthermore, no inflammatory markers were analyzed to combine with genotypes. However, in this study we found cues that lipid and glucose markers may be influenced by polymorphisms in genes of innate immune response and their relation provides insights in the activation of immune response due to metabolic variation.

5. Conclusions

We found 7 polymorphisms (tag and functional SNPs) in 5 genes associated with HDL-C, LDL-C, TG, TC, glucose and insulin levels. Polymorphisms in *TLR2* and *TLR4* were associated with lipid markers (HDL-C, LDL-C and TC). Inflammasome genes, mainly *NLR4* (rs455060) with lipid and glucose parameters.

These associations are in agreement with findings regarding the interplay between metabolic and immune systems. In this context, polymorphisms in genes of innate immune system could play a role in the activation of immune response in fluctuations of lipid and glucose levels that may lead to disruption of metabolic homeostasis.

This study opens an important field for functional studies to clarify the mechanisms which connect metabolic and immune pathways. Furthermore, this study is one of the few that found association between biochemical markers and genes of TLR and inflammasome. Studies like this are important to provide insight into the gene actions in metabolic pathways, which may help to identify new targets for metabolic diseases treatment.

Conflict of interest

Authors declared no conflicts of interest.

Funding

This work was supported by Fundação Araucária, CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) (Grant number: CAPES PROAP 2017/2018).

Acknowledges

The authors would like thanks to Danielle Malheiros and Enilze Ribeiro for corrections and contributions to the improvement of the manuscript and Max Torres for the help in drawing the figures.

References

- Ahmad, R., Al-Mass, A., Atizado, V., Al-Hubail, A., Al-Ghimlas, F., Al-Arouj, M., Bennakhi, A., Dermime, S., Behbehani, K., 2012. Elevated expression of the toll like receptors 2 and 4 in obese individuals: its significance for obesity-induced inflammation. *J. Inflamm.* 9, 48. <https://doi.org/10.1186/1476-9255-9-48>.
- Bank, S., Skytt Andersen, P., Burisch, J., Pedersen, N., Roug, S., Galsgaard, J., Ydegaard Turino, S., Broder Brodersen, J., Rashid, S., Kaiser Rasmussen, B., Avlund, S., Bastholm Olesen, T., Jürgen Hoffmann, H., Kragh Thomsen, M., Thomsen, V., Frydenberg, M., Andersen Nexø, B., Sode, J., Vogel, U., Andersen, V., 2014. Polymorphisms in the inflammatory pathway genes TLR2, TLR4, TLR9, LY96, NFKB1A, NFKB1, TNFA, TNFRSF1A, IL6R, IL10, IL23R, PTPN22, and PPAR γ are associated with susceptibility of inflammatory bowel disease in a Danish cohort. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098815>.
- Buraczynska, M., Zukowski, P., Ksiazek, K., Wacinski, P., Dragan, M., 2016. The effect of Toll-like receptor 4 gene polymorphism on vascular complications in type 2 diabetes patients. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 116, 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2016.04.002>.
- Castoldi, A., De Souza, C.N., Saraiva Câmara, N.O., Moraes-Vieira, P.M., 2016. The macrophage switch in obesity development. *Front. Immunol.* 6, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00637>.
- Friedewald, W.T., Levy, R.I., Fredrickson, D.S., 1972. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.* 18, 499–502.
- Fukata, M., Vamadevan, A.S., Abreu, M.T., 2009. Toll-like receptors (TLRs) and Nod-like receptors (NLRs) in inflammatory disorders. *Semin. Immunol.* 21, 242–253. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2009.06.005>.
- Gabriel, S.B., Schaffner, S.F., Nguyen, H., Moore, J.M., Roy, J., Blumenstiel, B., Higgins, J., DeFelice, M., Lochner, A., Faggart, M., Liu-Cordero, S.N., Rotimi, C., Adeyemo, A., Cooper, R., Ward, R., Lander, E.S., Daly, M.J., Altshuler, D., 2002. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 296 (80-), (2225 LP-2229).
- Gong, Y.N., Shao, F., 2012. Sensing bacterial infections by NALP receptors in NLR4 inflammasome activation. *Protein Cell*. <https://doi.org/10.1007/s13238-012-2028-3>.
- GTEx (Genotype-Tissue Expression), 2017. WWW Document. <https://www.gtexportal.org>.
- Guo, H., Callaway, J.B., Ting, J.P., 2015. Inflammasomes: Mechanism of Action, Role in Disease, and Therapeutics. 21, pp. 677–687. <https://doi.org/10.1038/nm.3893>.
- Han, M., Ding, C., Kyung, H.-M., 2015. Genetic polymorphisms in pattern recognition receptors and risk of periodontitis: evidence based on 12,793 subjects. *Hum. Immunol.* 76, 496–504. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2015.06.006>.
- He, Y., Hara, H., Núñez, G., 2016a. Mechanism and regulation of NLRP3 inflammasome activation. *Trends Biochem. Sci.* 41, 1012–1021. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.09.002>.
- He, Y., Zeng, M.Y., Yang, D., Motro, B., Núñez, G., 2016b. NEK7 is an essential mediator of NLRP3 activation downstream of potassium efflux. *Nature* 530, 354–357. <https://doi.org/10.1038/nature16959>.
- Hotamisligil, G.S., 2017. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. *Nature* 542, 177–185. <https://doi.org/10.1038/nature21363>.
- Huang, S., Rutkowski, J.M., Snodgrass, R.G., Ono-Moore, K.D., Schneider, D.A., Newman, J.W., Adams, S.H., Hwang, D.H., 2012. Saturated fatty acids activate TLR-mediated proinflammatory signaling pathways. *J. Lipid Res.* 53, 2002–2013. <https://doi.org/10.1194/jlr.D029546>.
- Iannitti, R.G., Napolioni, V., Oikonomou, V., De Luca, A., Galosi, C., Pariano, M., Massi-Benedetti, C., Borghi, M., Puccetti, M., Lucidi, V., Colombo, C., Ficarelli, E., Lass-Flörl, C., Majo, F., Cariani, L., Russo, M., Porcaro, L., Ricciotti, G., Ellemunter, H., Ratcliff, L., De Benedictis, F.M., Tasesa, V.N., Dinarello, C.A., van de Veerdonk, F.L., Romani, L., 2016. IL-1 receptor antagonist ameliorates inflammasome-dependent inflammation in murine and human cystic fibrosis. *Nat. Commun.* 7, 10791. <https://doi.org/10.1038/ncomms10791>.
- Im, S.-S., Yousef, L., Blaschitz, C., Liu, J.Z., Edwards, R.A., Young, S.G., Raffatellu, M., Osborne, T.F., 2011. Linking lipid metabolism to the innate immune response in macrophages through sterol regulatory element binding protein-1a. *Cell Metab.* 13, 540–549. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.04.001>.
- Jernendy, A., Kormer, A., Kovacs, M., Kaszas, E., Balazs, J., Szocs, A., Madacsy, L., Cseh, K., 2010. Association between toll-like receptor polymorphisms and serum levels of tumor necrosis factor-alpha and its soluble receptors in obese children. *Med. Sci. Monit.* 16, CR180–185.
- Jin, C., Henao-Mejia, J., Flavell, R.A., 2013. Innate immune receptors: key regulators of metabolic disease progression. *Cell Metab.* <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.05.011>.
- Johansson, A., Eriksson, N., Becker, R.C., Storey, R.F., Himmelmann, A., Hagström, E., Varenhorst, C., Axelsson, T., Barratt, B.J., James, S.K., Katus, H.A., Steg, P.G., Syvänen, A.C., Wallentin, L., Siegbahn, A., 2015. NLR4 inflammasome is an important regulator of Interleukin-18 levels in patients with acute coronary syndromes: genome-wide association study in the PLATElet inhibition and patient outcomes trial (PLATO). *Circ. Cardiovasc. Genet.* 8, 498–506. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.114.006724>.

- Junjie, X., Songyao, J., Minmin, S., Yanyan, S., Baiyong, S., Xiaxing, D., Jiabin, J., Xi, Z., Hao, C., 2012. The association between Toll-like receptor 2 single-nucleotide polymorphisms and hepatocellular carcinoma susceptibility. *BMC Cancer* 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-57>.
- Kapil, S., Duseja, A., Sharma, B.K., Singla, B., Chakraborti, A., Das, A., Ray, P., Dhiman, R.K., Chawla, Y., 2016. Genetic polymorphism in CD14 gene, a co-receptor of TLR4 associated with non-alcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.* 22, 9346–9355. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i42.9346>.
- Katz, A., Nambi, S.S., Mather, K., Baron, A.D., Follmann, D.A., Sullivan, G., Quon, M.J., 2000. Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 2402–2410. <https://doi.org/10.1210/jcem.85.7.6661>.
- Kolb, R., Phan, L., Borchering, N., Liu, Y., Yuan, F., Janowski, A.M., Xie, Q., Markan, K.R., Li, W., Potthoff, M.J., Fuentes-Mattei, E., Ellies, L.G., Knudson, C.M., Lee, M.H., Yeung, S.C.J., Cassel, S.L., Sutterwala, F.S., Zhang, W., 2016. Obesity-associated NLR4 inflammasome activation drives breast cancer progression. *Nat. Commun.* 7, 1–12. <https://doi.org/10.1038/ncomms13067>.
- Kutikhin, A.G., Ponasenko, A.V., Khutomaya, M.V., Yuzhalin, A.E., Zhidkova, I.I., Salakhov, R.R., Golovkin, A.S., Barbarash, O.L., Barbarash, L.S., 2016. Association of TLR and TREM-1 gene polymorphisms with atherosclerosis severity in a Russian population. *Meta Gene* 9, 76–89. <https://doi.org/10.1016/j.mgene.2016.04.001>.
- Lackey, D.E., Olefsky, J.M., 2015. Regulation of metabolism by the innate immune system. *Nat. Rev. Endocrinol.* 12, 15–28. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2015.189>.
- Lahiri, D.K., Numberger, J.L., 1991. A rapid no-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP analysis. *Nucleic Acids Res.* 19, 5444. <https://doi.org/10.1093/nar.19.5444>.
- Lancaster, G.I., Langley, K.G., Berghund, N.A., Kammoun, H.L., Reibe, S., Estevez, E., Weir, J., Mellett, N.A., Pernes, G., Conway, J.R.W., Lee, M.K.S., Timpson, P., Murphy, A.J., Masters, S.L., Gerondakis, S., Bartonicek, N., Kaczorowski, D.C., Dinger, M.E., Metkile, P.J., Bond, P.J., Febrario, M.A., 2018. Evidence that TLR4 is not a receptor for saturated fatty acids but mediates lipid-induced inflammation by reprogramming macrophage metabolism. *Cell Metab.* <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.03.014>.
- Li, Y., Xu, S., Jiang, B., Cohen, R.A., Zang, M., 2013. Activation of sterol regulatory element binding protein and NLRP3 inflammasome in atherosclerotic lesion development in diabetic pigs. *PLoS One* 8, e67532. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067532>.
- Lohman, T.G., Roche, A.F., Martorell, R., 1988. Anthropometric standardization reference manual. Human Kinetics Books, Champaign, Illinois.
- Maldonado-Bernal, C., Trejo-de la, O.A., Sanchez-Contreras, M.E., Wachter-Rodarte, N., Torres, J., Cruz, M., 2011. Low frequency of Toll-like receptors 2 and 4 gene polymorphisms in Mexican patients and their association with type 2 diabetes. *Int. J. Immunogenet.* 38, 519–523. <https://doi.org/10.1111/j.1744-313X.2011.01035.x>.
- Matthews, D.R., Hosker, J.P., Rudenski, A.S., Naylor, B. a, Treacher, D.F., Turner, R.C., 1985. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28, 412–419. <https://doi.org/10.1007/BF00280883>.
- McCarthy, C., Carrea, A., Diambra, L., 2017. Bicodon bias can determine the role of synonymous SNPs in human diseases. *BMC Genomics* 18. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3609-6>.
- Mullick, A.E., Tobias, P.S., Curtiss, L.K., 2005. Modulation of atherosclerosis in mice by Toll-like receptor 2. *J. Clin. Invest.* 115, 3149–3156. <https://doi.org/10.1172/JCI25482>.
- Ogus, A.C., Yoldas, B., Ozdemir, T., Uguz, A., Olcen, S., Keser, I., Coskun, M., Cilli, A., Yegin, O., 2004. The Arg753Gln polymorphism of the human Toll-like receptor 2 gene in tuberculosis disease. *Eur. Respir. J.* 23, 219 LP–223.
- Paramel, G.V., Strisjö, A., Fransén, K., 2015. Role of genetic alterations in the NLRP3 and CARD8 genes in health and disease. *Mediat. Inflamm.* 2015, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2015/846782>.
- Pontillo, A., Brandao, L., Guimaraes, R., Segat, L., Araujo, J., Crovella, S., 2010. Two SNPs in NLRP3 gene are involved in the predisposition to type-1 diabetes and celiac disease in a pediatric population from Northeast Brazil. *Autoimmunity* 43, 583–589. <https://doi.org/10.3109/08916930903540432>.
- Rankin, L.C., Artis, D., 2018. Beyond host defense: emerging functions of the immune system in regulating complex tissue physiology. *Cell* 173, 554–567. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.013>.
- Rosenson, R.S., Brewer, H.B., Ansell, B.J., Barter, P., Chapman, M.J., Heinecke, J.W., Kontush, A., Tall, A.R., Webb, N.R., 2016. Dysfunctional HDL and atherosclerotic cardiovascular disease. *Nat. Rev. Cardiol.* <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2015.124>.
- Santana, N. de L., Régo, J.L., Oliveira, J.M., de Almeida, L.F., Braz, M., Machado, L.M.M., Machado, P.R.L., Castellucci, L.C., 2017. Polymorphisms in genes TLR1, 2 and 4 are associated with differential cytokine and chemokine serum production in patients with leprosy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 112, 260–268. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160366>.
- Sharma, D., Kanneganti, T.-D., 2016. The cell biology of inflammasomes: mechanisms of inflammasome activation and regulation. *J. Cell Biol.* 213, 617 LP–629.
- Simhan, H.N., MacPherson, T., Caritis, S.N., Krohn, M.A., 2008. Maternal and fetal Toll-like receptor 4 genotype and chorionic plate inflammatory lesions. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 199. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2008.07.043>.
- Soydas, T., Karaman, O., Arkan, H., Yemis, G., Ilhan, M.M., Tombulturk, K., Tasan, E., Kanigur Sultuybek, G., 2016. The correlation of increased CRP levels with NFKB1 and TLR2 polymorphisms in the case of morbid obesity. *Scand. J. Immunol.* 84, 278–283. <https://doi.org/10.1111/sji.12471>.
- Spiegelman, B.M., Hotamisligil, G.S., 1993. Through thick and thin: wasting, obesity, and TNF α . *Cell*. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90243.J](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90243.J).
- Xu, X.H., Shah, P.K., Faure, E., Equils, O., Thomas, L., Fishbein, M.C., Luthringer, D., Xu, X.P., Rajavashisth, T.B., Yano, J., Kaul, S., Arditi, M., 2001. Toll-like receptor-4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL. *Circulation* 104, 3103–3108. <https://doi.org/10.1161/01.circ001.100631>.
- Zeller, T., Haase, T., Muller, C., Riess, H., Lau, D., Zeller, S., Krause, J., Baumert, J., Pless, O., Dupuis, J., Wild, P.S., Eleftheriadis, M., Waldenberger, M., Zeilinger, S., Ziegler, A., Peters, A., Tiret, L., Proust, C., Marz, C., Munzel, T., Strauch, K., Prokisch, H., Lackner, K.J., Herder, C., Thorand, B., Benjamin, E.J., Blankenberg, S., Koenig, W., Schnabel, R.B., 2015. Molecular characterization of the NLR4 expression in relation to Interleukin-18 levels. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 8, 717–726. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.115.001079>.
- Zhang, X.J., Huang, W., Yang, S., Sun, L.D., Zhang, F.Y., Zhu, Q.X., Zhang, F.R., Zhang, C., Du, W.H., Pu, X.M., Li, H., Xiao, F.L., Wang, Z.X., Cui, Y., Hao, F., Zheng, J., Yang, X.Q., Cheng, H., Di He, C., Liu, X.M., Xu, L.M., Zheng, H.F., Zhang, S.M., Zhang, J.Z., Wang, H.Y., Cheng, Y.L., Ji, B.H., Fang, Q.Y., Li, Y.Z., Zhou, F.S., Han, J.W., Quan, C., Chen, B., Liu, J.L., Lin, D., Fan, L., Zhang, A.P., Liu, S.X., Yang, C.J., Wang, P.G., Zhou, W.M., Lin, G.S., Wu, W.D., Fan, X., Gao, M., Yang, B.Q., Lu, W.S., Zhang, Z., Zhu, K.J., Shen, S.K., Li, M., Zhang, X.Y., Cao, T.T., Ren, W., Zhang, X., He, J., Tang, X.F., Lu, S., Yang, J.Q., Zhang, L., Wang, D.N., Yuan, F., Yin, X.Y., Huang, H.J., Wang, H.F., Lin, X.Y., Liu, J.J., 2009. Psoriasis genome-wide association study identifies susceptibility variants within LCE gene cluster at 1q21. *Nat. Genet.* 41, 205–210. <https://doi.org/10.1038/ng.310>.
- Zhang, P., Zhang, N., Liu, L., Zheng, K., Zhu, L., Zhu, J., Cao, L., Jiang, Y., Liu, G., He, Q., 2017. Polymorphisms of toll-like receptors 2 and 9 and severity and prognosis of bacterial meningitis in Chinese children. *Sci. Rep.* 7, 42796. <https://doi.org/10.1038/srep42796>.
- Zmora, N., Bashirades, S., Levy, M., Elinav, E., 2017. The role of the immune system in metabolic health and disease. *Cell Metab.* 25, 506–521. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.02.006>.

CAPÍTULO II

Artigo preparado para submissão à revista Sports and Medicine.

“Anthropometrical and biochemical outcomes of physical exercise associated with inflammatory genes variants in children and adolescents”.

ABSTRACT

Deregulation of metabolic homeostasis caused by excess of nutrients activates immune system triggers and release of inflammatory cytokine leading to impairment of insulin signaling and lipid metabolism. The aim of this study was to investigate possible associations between 20 variants in *TLR2*, *TLR4*, *IL-1 β* , *IL6*, *NF κ B1*, *TNF*, *NF κ BIA*, *NLRC4*, *CARD8* and *NEK7* genes and anthropometrical and biochemical outcomes of physical exercise programs. Sample was composed by 58 children and adolescents that participated of physical exercise programs during 12 weeks. Anthropometrical and biochemical parameters were collected from each participant, as follows: body mass index (BMI), body fat percentage (fat), LDL cholesterol (LDL-C), HDL cholesterol (HDL-C), triglycerides (TG), total cholesterol (TC), insulin, glucose, HOMA-IR (Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance) and QUICKI (Quantitative Insulin Sensitivity Check Index). Univariate linear regression was performed to found possible associations and, subsequently, multivariate linear regression was modeled. We found associations between 15 variants in 9 genes with anthropometrical and biochemical outcomes as follows: BMI was influenced by rs13105517 (*TLR2*), rs1927911 (*TLR4*) and rs1554973 (*TLR4*), fat was influenced by rs3755867 (*NF κ B1*), rs3917356 (*IL-1 β*), rs385076 (*NLRC4*) and rs455060 (*NLRC4*), HOMA-IR was influenced by rs13105517 (*TLR2*) and rs1927911 (*TLR4*), QUICKI was influenced by rs13105517 (*TLR2*), glucose was influenced by rs313805 (*NF κ BIA*) and rs6671879 (*NEK7*), LDL-C was influenced by rs2069845 (*IL6*) and rs3755867 (*NF κ B1*), HDL-C was influenced by rs7258674 (*CARD8*), TC was influenced by rs2069845 (*IL-6*) and TG was influenced by rs3804099 (*TLR4*), rs6509366 (*CARD8*) and rs6671879 (*NEK7*). Genotypes related with possible anti-inflammatory profile provide improvement of biochemical and anthropometrical outcomes of physical intervention program.

Key-words: Polymorphisms, Homeostasis, Inflammatory, Cytokines, Physical Exercise.

1 INTRODUCTION

Evolution of human metabolism and immune system was geared towards acquiring advantages to ensure survivor as energy management, defense against pathogens, combating starvation and maintenance of homeostasis. However, the world changed and conditions that were previously advantageous, today are contributing to metabolic diseases, such as obesity, diabetes, dyslipidemia, atherosclerosis and cancer. In the past, combat of excessive nutrients consumption was not favored by natural selection [1–3] and nowadays, excessive nutrient consumption, along with physical inactivity, may be responsible for damaging metabolic homeostasis.

First evidences linking obesity and metabolism came from findings that macrophages secrete TNF (tumor necrosis factor) and induce insulin resistance [3,4]. In the early 1990s some studies showed that adipose tissue of obese presented increased inflammatory markers and TNF expression and impairment of glucose metabolism [5,6]. TNF is pro-inflammatory cytokine produced by macrophages in acute inflammation. It is responsible for several cellular functions leading to necrosis and apoptosis [7]. Polymorphisms in promoter region of *TNF* gene, such as A allele of rs180069, were previously associated with a constellation of diseases including type 2 diabetes[8], heart disease [9], asthma [10] and Crohn's disease [11]. This polymorphism is predicted to increase transcription of TNF mRNA and consequently to a higher TNF expression [12].

Not only TNF, but a plethora of cytokines are released by adipose tissue in expansion, including IL-1 β (interleukin 1 β) and IL-6 (Interleukin 6). IL-6 is a pleiotropic cytokine with anti and pro-inflammatory functions. The role of IL-6 in metabolism deregulation associated with obesity and insulin resistance is already known. Obese had higher levels of circulating IL-6 released by adipose tissue [13]. Polymorphism in IL-6 were associated with type 2 diabetes (rs1800795) [14], obesity (rs2069845 and rs1554606) [15,16] and several inflammatory diseases. In physical exercise context, variants in *TNF* and *IL6* genes have been investigated in elder population, and it was found that carriers of genotypes associated with anti-inflammatory profile exhibited better

improvement in physical performance after participating in a physical exercise program [17,18]. Currently, it has been discovered, mainly in exercise context, a lipolytic effect of IL-6 [19]. IL-6 was shown to increase AMP-activated protein kinase (AMPK) in skeletal muscle and adipose tissue. AMPK, once activated, induces fatty acid oxidation and glucose uptake. [20]. IL-6 is also involved in macrophages polarization; Mauer and coworkers identified IL-6 as inductor macrophages M2 profile (anti-inflammatory) preventing insulin resistance associated with obesity [21]. Thus, there is growing evidence that IL-6 is a key molecule on modulation of glucose and lipid metabolism. However, the exact role of IL-6 in metabolic deregulation is yet to be understood.

Other key molecule on inflammation cascade is NF- κ B (nuclear factor kappa B), a central transcriptional factor of inflammatory components. Recently, the role of NF- κ B in nutrients sensing, metabolic impairment and homeostasis disruption have been discovered. NF- κ B is activated through recognition of cytokines or PAMPs (pathogen associated molecular pattern) by cellular receptors called PRRs (Pattern Recognition Receptors) including TLRs (toll-like receptors) and NLRs (nod-like receptors) that trigger cascade signaling leading to NF- κ B activation and culming in the transcription of target genes. NF- κ B function is regulated by I κ B that sequester it in the cytosol and prevents transcription activity [22,23]. The main form of NF- κ B is a heterodimer constituted by subunits p50/p65. The homodimer p50/p50 has anti-inflammatory properties, while the heterodimer has pro-inflammatory properties. *NF κ B1* (nuclear factor kappa B subunit 1) encodes subunits p50 and p105 of NF- κ B, p65 subunit is encoded by another gene called *RELA* and *NF κ BIA* (NFKB inhibitor alpha) encodes I κ B α (regulator of NF- κ B activity) [24]. Polymorphism rs28362491 of *NF κ B1* and rs696 of *NF κ BIA* were associated with atherosclerosis [25], with risk of ulcerative colitis [26] respectively. In addition, NF- κ B expression in skeletal muscle increases during exercise activities for muscle recuperation [27]. Furthermore, evidences showed a NF- κ B function lipolysis induction through TNF [28]. Together these findings may provide insights of the NF- κ B regulatory role in the improvement of metabolic setting in exercise activity.

High saturated fatty acid and glucose intake, endogenous cholesterol crystal (DAMPs) and lipopolysaccharides (LPS) released by imbalance of gut flora are responsible to activation of innate immune system receptors, TLRs and NLRs [29]. TLR2 and TLR4 are transmembrane receptors expressed in bone marrow, immune cells and also adipose tissue [30]. TLR2 and mainly TLR4 were associated with obesity, cardiovascular diseases and diabetes [31]. Polymorphism rs380099 and rs5743708 of *TLR2* were associated with atherosclerosis [32,33], rs1927911 of *TLR4* with atherosclerosis cerebral infarction [34] and myocardial infarction. Deregulation in lipid metabolism with expression of TLR4 leading to foam cell formation implicates in atherosclerosis pathogenesis [35].

NLRs, also called inflammasome, are cytosolic receptors; in metabolic context the best known inflammasome is NLRP3 (NLR family pyrin domain-containing 3). Activation of NLRP3 was associated with several metabolic disorders including obesity, atherosclerosis and type 2 diabetes [36]. Recently, it was discovered that NLRP3 activation and assembly require a serine/threonine kinase NEK7 (Never in Mitosis Gene A)-Related Kinase 7 [37]. CARD8 (caspase recruitment domain-containing Protein 8) is also an important molecule on NLRP3 activation, probably acting as a negative regulator of NLRP3 [38]. Polymorphism in *CARD8* (rs2043211, for example) were associated with inflammatory diseases including Chron's disease ischemic stroke and others [39]. NLRC4 (NLR family CARD domain-containing protein 4) inflammasome was primarily studied in cellular death induced by pathogen infection, such as *Salmonella* [40]. In recent investigations its role in metabolic diseases, such as cancer [41] and cardiovascular diseases has been discovered [42,43]. Both NLRP3 and NLRC4 have implications in disruption of metabolic homeostasis. NLR activation triggers oligomerization and assembly of inflammasome structure culming in cleavage of IL-1 β and IL-18. These cytokines releasing may cause cellular death by pyroptosis [44]. IL-1 β is a pro-inflammatory cytokine and higher circulating levels are involved in the same diseases related with inflammasome activation, such as type 2 diabetes and inflammatory disorders [45]. Mice IL-1 β knockout showed larger fat deposit in liver than wild type model, and curiously higher insulin sensitivity [46],

suggesting an important relation between IL-1 β and lipid accumulation. Polymorphisms in the promoter region of IL-1 β were associated with obesity (rs1143634) [47] and with myocardial ischemia in diabetic patients (rs16944) [48].

Break of metabolic homeostasis caused by excess of nutrients intake increase activation of immune response releasing inflammatory markers and leading to metabolic disorders. Regular exercise activity improves metabolic parameters (lipid, glucose levels and anthropometrical parameters) and contributes to reducing low grade inflammation observed in metabolic diseases.

Our aim was to investigate the interaction of physical exercise anthropometrical and biochemical outcomes and genetic variants in genes coding for immune response components (*TLR2*, *TLR4*, *IL1B*, *IL6*, *TNF*, *NFKB1*, *NFKBIA*, *NLRC4*, *CARD8* and *NEK7*) in a children and adolescents sample.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Sample:

This study was composed by 58 children and adolescents (33 boys and 25 girls) of which 47 were obese and 11 were overweight, the mean of age was 12.04 ± 1.64 years old. Children and adolescents were recruited in public schools of Curitiba, Paraná, Brazil. Inclusion criteria were medical liberation for exercise practice and not use weight and/or lipid levels control drugs. Children and adolescents participate of physical exercise intervention program consisting in three sessions per week of physical activity practice during 12 weeks. Details of exercise program are described below. This study was approved by the ethics committee of Federal University and informed consent term was obtained from all participants included in this study.

2.2 Physical Exercise Program

Children and adolescents participate of 3 different exercise programs: HIIT (High Intensity Interval Training), land-based aerobic exercise and water walking.

HIIT: each session constituted of 45 minutes duration with two sets of activities. Each set consisted of warm-up exercises, running for 30 seconds at 100% speed peak effort and walking for 60 seconds at 50% peak velocity (active recovery period). There was a rest period of 4 minutes between sets. The training was weekly progressing, by adding time to the running exercises and decreasing rest time. In week 1 the set was composed by 4 x 30s/60s; in week 2 by 5 x 30s/60s; in week 3 by 6 x 30s/60s; in week 4 and 5 by 7 x 30s/60s; week 6 to 9 by 8 x 30s/45s (recovery period was decreased) and week 10 to 12 by 8 x 30s/30s [49–51].

Land-based aerobic exercise: each session was composed by 45 minutes of walking, 45 minutes by indoor cycling and 20 minutes of stretching. Indoor cycling and walking started in 35% and 55% of rate heart reserve (RHR), increasing to 45% and 65% in 5th to 8th week and reaching 55% and 75% in the 9th to 12th week [50–52].

Water walking: in this training program participants were submitted to simulation of walking on land using a float vest attached to the waist. Each session was composed by 5 minutes of warm-up exercises; 45 minutes of walking and 10 minutes of recover. The exercise intensity increased weekly, ranging between 40% to 60% of RHR [50,51,53].

2.2 Data Collection:

From each participant anthropometrical data was collected as follows: body mass index (BMI), abdominal circumference or waist circumference and body fat percentage (fat). Peripheral blood samples were collected from all individuals to proceed DNA extraction and measurement of the following biochemical variables: HDL-cholesterol (HDL-C), LDL-cholesterol (LDL-C), triglycerides (TG), total cholesterol (TC), insulin and glucose levels. Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance (HOMA-IR) was calculate by the formula $(\text{glucose (nmol/L)} \times \text{insulin (}\mu\text{U/mL)})/22.5$ [54] and Quantitative Insulin Sensitivity Check Index (QUICKI) was calculate using $1/(\log \text{fasting glucose (mmol/L)} + \log \text{fasting insulin (}\mu\text{U/mL)})$ [55]. After concluding physical program all those variables were collected again, characterizing the “before” and “after” data for each anthropometrical and biochemical variable.

2.3 Polymorphism selection and genotyping

Candidate genes were selected based on coding for components of the inflammatory pathway. Polymorphism were selected based in high LD (linkage disequilibrium) ($D' > 0.8$) representing a block of SNPs (tag SNPs) and in previous association studies with metabolic or inflammatory disorders. Tag SNPs selected and corresponding genes are described as follows: *TLR2* (rs13105517); *TLR4* (rs1927911); *NFKB1* (rs3774932 and rs3755867); *NFKBIA* (rs3138053); *IL1B* (rs1143634 and rs3917356); *IL6* (rs2069845); *TNF* (rs1800629); *NLRC4* (rs212704 and rs455060); *CARD8* (rs65096366 and rs7258674); *NEK7* (rs6671879). SNPs previously associated also included: *TLR2* (rs3804099); *TLR4* (rs1554973); *NFkBIA* (rs696); *IL1B* (rs16944); *IL6*

(rs1554606); *TNF* (rs915654); *NLRC4* (rs385076). All SNPs selected had minor allele at frequency (MAF) at least 10%.

Genomic DNA was extracted from peripheral blood by salting out method adapted from Lahiri and Nurnberger [56]. DNA samples were diluted to a final concentration of 20ng/ul. Genotyping were performed by Sequenom MassARRAY iPLEX platform [57].

2.4 Statistical analysis

Allelic and genotype frequencies were obtained by direct counting. Hardy-Weinberg equilibrium was calculated by chi-square test. The studied variables were tested for normality by Kolmogorov-Smirnov with Lilliefors correction. Genotypes were tested for two interaction models, recessive and dominant. In the recessive model, common allele homozygotes were compared with minor allele carriers (heterozygotes and homozygotes for minor allele). For dominant model minor allele homozygotes were compared with common allele carriers (heterozygotes and homozygotes for common allele).

For each of the anthropometric and biochemical variables, “before” (initial) and after” (final) means were compared by t test paired for parametric variables and by Wilcoxon test for non-parametric variables. Independent t test for parametric variables and Mann-Whitney for non-parametric variables were applied in order to evaluate the difference between initial and final means (variation) for each of the genotypes.

Linear regression analyses were modeled to analyze possible associations between genotypes and biochemical and anthropometrical variables. Variation of biochemical and anthropometrical parameters (BMI, body fat percentage, LDL-C, HDL-C, TC, triglycerides, insulin and glucose) were modeled as dependent variables. Sex, age, type of exercise and genotype were modeled as independent variables.

First, univariate linear regressions were used to refine possible associations. Subsequently, by using the significant results of these univariate

linear regressions, multivariable linear regression models were performed adjusting for age, sex and type of exercise. In addition, polygenic index was calculated through *dplyr package* (R program) considering means of differences between “before” and “after”. These index was calculated when two or more polymorphisms were associated with the same variable. Thus, it was used to analyze if these polymorphisms together contributed to the trait of interest. Polygenic index was based in the classification of genotypes and in p value of univariate linear regression. Genotypes of individuals were classified in “0” and “1”, according to each variable mean. Statistical significant adopted for all tests was 0.05 (5%).

3 RESULTS

All SNPs were in Hardy-Weinberg equilibrium. Significant mean differences between before and after data were found for BMI, body fat percentage, TC, HDL-C, insulin, HOMA-IR and QUICKI. Results are shown in Table 1.

We found association with anthropometrical (Table 2) and biochemical variables (table 3) for 14 SNPs (supplementary Table 1). The results are shown separately for anthropometrical and biochemical variables. Results of multivariate logistic regression are listed in Table 4.

3.1 Anthropometrical markers

We found association between BMI, *TLR2*, and *TLR4*. Carriers of G allele of rs13105514 (*TLR2*), CC genotype of rs1554973 (*TLR4*), AA genotype of rs1927911 (*TLR4*) had lower loss of BMI when compared with carriers of AA genotype ($p=0.0116$), T allele ($p=0.0014$) and G genotype ($p=0.0169$) respectively. To proceed analysis of polygenic index we included the polymorphism rs455060 (*NLRC4*) ($p=0.0480$) and rs1800629 (*TNF*) ($p=0.0215$) because significant association was found in univariate linear regression (Figure 1).

We found lower fat loss in carriers of TT genotype of rs3917356 (*IL1B*) ($p=0.0471$), A allele of rs3755867 (*NFKB1*) ($p=0.0112$). Carriers of TT genotype of rs385076 (*NLRC4*) ($p=0.0136$) and GG genotype of rs455060 (*NLRC4*) ($p=0.0104$) exhibited increased fat. For SNP rs212704 (*NLRC4*) results were significant in univariate linear regression ($p=0.0212$), but results did not remain significant in multivariate linear regression ($p=0.0833$). All five SNPs were used to calculate polygenic index as showed in Figure 2.

Table 1 – Comparisons between before and after means of anthropometric and biochemical variables.

Variables	n	Before mean±SD	After mean±SD	p
BMI	58	29.04±4.82	28.76±4.84	0.0057
Fat	43	40.07±8.55	36.24±9.02	0.000008
TC	52	165.82±41.17	158±35.97	0.01551
LDL-C	52	98.83±30.22	91.48±29.31	0.01176
HDL-C	51	48.87±15.86	47.79±16.53	0.3172
TG	52	106.88±59.32	107.78±61.63	0.4524
Insulin	50	17.28±14.71	13.49±7.71	0.003499
Glucose	49	82.35±9.33	81.77±5.85	0.6499
HOMA-IR	49	3.29±2.60	2.55±1.56	0.008583
QUICKI	49	0.33±0.03	0.34±0.03	0.01388

p value in bold are significant. Legend: BMI: body mass index; Fat: body fat percentage; TC: total cholesterol; LDL-C: LDL-cholesterol; HDL-C: HDL-cholesterol TG: triglycerides; HOMA-IR: Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance; QUICKI: Quantitative Insulin Sensitivity Check Index;

Table 2 - Results of multivariate linear regression considering anthropometric outcomes and genotypes.

Gene	SNP	Variable	Genotype	Mean difference±SD	p
<i>TLR2</i>	rs13105517	BMI	AA	1.14±0.70	0.0116
			GG+GA	0.19±0.77	
<i>TLR4</i>	rs1554973	BMI	CC	-1.16±1.29	0.0014
			TT+CT	0.35±0.70	
	rs1927911	BMI	AA	-0.65±1.46	0.0169
			GG+GA	0.35±1.46	
<i>TNF</i>	rs1800629	BMI	AA	0.24±0.77	0.0174
			GG+GA	2.1±0.00	
<i>NFKB1</i>	rs3755867	Fat	GG	10.05±3.60	0.0112
			GA+AA	3.19±4.66	
<i>IL1B</i>	rs3917356	Fat	TT	0.70±4.5	0.0471
			CC+CT	4.54±4.84	
<i>NLRC4</i>	rs212704	Fat	CC	0.23±5.14	0.0883
			TT+CT	4.65±4.61	
	rs385076	Fat	TT	-1.72±5.48	0.0136
			CC+CT	4.56±4.47	
	rs455060	Fat	GG	-1.00±4.49	0.0104
			AA+GA	4.46±4.55	
		BMI	AA	0.56±0.74	0.0580
			GG+GA	0.12±0.80	

p values in **bold** are significant. Legend: BMI: body mass index; Fat: body fat percentage.

3.2 Biochemical markers

3.2.1 Lipid profile

We found association between genotypes and components of lipid profile (TG, TC, LDL-C and HDL-C).

In TG variation we found association with T allele of rs3804099 (*TLR2*) ($p=0.0161$), G allele of rs6509366 (*CARD8*) ($p=0.0238$) and G allele of rs6671879 (*NEK7*) ($p=0.009$) these individuals present reduction of TG levels, conversely carriers of CC, AA and AA genotype had increase of TG levels.

For TC, two SNPs presented significant association in univariate linear regression: rs2069845 (*IL6*) ($p=0.03842$) and rs7258674 (*CARD8*) ($p=0.0172$). However, in multivariate linear regression only rs206984 remained significant: AA genotype individuals presented lower reduction of TC levels compared with C allele carriers ($p=0.0384$). For HDL-C, the same SNPs showed significant results in univariate linear regression, rs2069845 ($p=0.0413$) and rs7258674 ($p=0.0028$), but in multivariate linear regression only rs7258674 remained significant: G allele carriers exhibited increased HDL-C levels when compared with AA genotype individuals.

For LDL-C variation levels, carriers of AA genotype of rs2069845 (*IL-6*) had lower reduction in LDL-C levels ($p=0.0146$) and carriers of GG genotype of rs3755867 (*NFKB1*) had increased levels ($p=0.0398$).

3.2.2 Glucose profile

For components of glucose profile we found association between genotypes and glucose variation levels and predictors of insulin sensitivity: HOMA-IR and QUICKI. Carriers of AA of rs13105517 (*TLR2*) genotype and carriers of AA genotype of rs1927911 (*TLR4*) had improvement in insulin sensitivity according to HOMA-IR index decreasing. In addition, AA (rs13105517) genotype individuals also showed increase in QUICKI values. Carriers of C allele of rs3138053 (*NFKBIA*) and GG genotype of rs6671879 (*NEK7*) had higher reduction in glucose levels.

Table 3 - Results of multivariate linear regression considering biochemical outcomes and genotypes.

GENE	SNP	VARIABLE	GENOTYPE	MEAN DIFFERENCE $\pm$ SD	P
TLR2	rs13105517	QUICKI	AA	-0.02 $\pm$ 0.01	0.0243
			GG+GA	-0.004 $\pm$ 0.02	
		HOMA-IR	AA	2.42 $\pm$ 3.63	0.0112
			GG+GA	0.43 $\pm$ 1.24	
	rs3804099	TG	CC	-29.16 $\pm$ 88.20	0.0161
			TT+CT	7.58 $\pm$ 40.13	
TLR4	rs1927911	HOMA-IR	AA	2.25 $\pm$ 4.47	0.0471
			GG+GA	0.49 $\pm$ 1.22	
IL6	rs2069845	TC	AA	1.87 $\pm$ 22.77	0.0384
			AG+GG	14.76 $\pm$ 20.57	
		LDL-C	AA	1.48 $\pm$ 21.71	0.0146
			AG+GG	14.19 $\pm$ 16.38	
		HDL-C	AA	-1.60 $\pm$ 10.30	0.0640
			AG+GG	4.09 $\pm$ 8.97	
NFKBIA	rs3138053	Glucose	TT	-1.76 $\pm$ 8.93	0.0442
			CC+CT	3.70 $\pm$ 7.88	
NFKB1	rs3755867	LDL-C	GG	-2.10 $\pm$ 28.34	0.0398
			GA+AA	8.58 $\pm$ 19.07	
CARD8	rs6509366	TG	AA	-54.8 $\pm$ 97.68	0.0238
			GG+AG	4.83 $\pm$ 48.14	
	rs7258674	HDL-C	AA	11.28 $\pm$ 8.97	0.0098
			GG+AG	-0.54 $\pm$ 9.27	
		TC	AA	26.42 $\pm$ 23.07	0.1097
			GG+AG	4.93 $\pm$ 21.26	
NEK7	rs6671879	Glucose	GG	7.6 $\pm$ 7.21	0.0137
			AA+AG	-1.22 $\pm$ 8.38	
		TG	AA	-28.14 $\pm$ 88.15	0.009
			GG+AG	11.20 $\pm$ 27.85	

Mean difference: difference between before and after data of the physical intervention program.

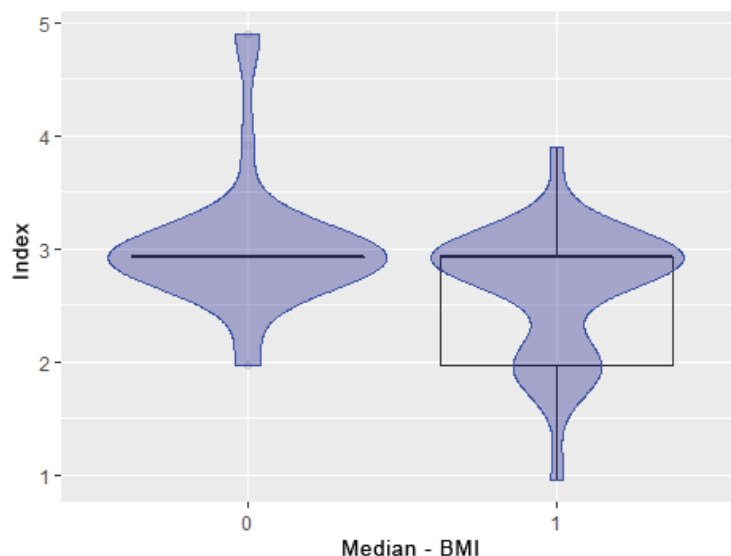
Legend: TG: triglycerides; TC: total cholesterol; LDL-C: LDL-cholesterol; HDL-C: HDL-cholesterol; QUICKI: Quantitative Insulin Sensitivity Check Index; HOMA-IR: Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance

Table 4 Summary results of multivariable linear regression of anthropometric and biochemical parameters.

GENE	SNP	Anthropometric		Biochemical						
		BMI	FAT	HOMA.IR	QUICKI	GLUCOSE	LDL.C	HDL.C	TC	TG
TLR2	rs13105517	AA▼+ GG+GA▼		AA▼+ GG+GA▼	AA▲+ GG+GA▲	-	-	-	-	-
	rs3804099	-	-	-	-	-	-	-	-	CC▲ TT+CT▼
TLR4	rs1927911	AA▲ GG+GA▼	-	AA▼+ GG+GA▼	-	-	-	-	-	-
	rs1554973	CC▲ TT+CT▼	-	-	-	-	-	-	-	-
IL6	rs2069845	-	-	-	-	-	AA▼ AG+GG▼+	-	AA▼ AG+GG▼+	-
NFKB1	rs3755867	-	GG▼+ GA+AA▼	-	-	-	GG▲ GA+AA▼	-	-	-
NFKBIA	rs3138053	-	-	-	-	TT▲ CC+CT▼	-	-	-	-
TNFα	rs1800629	AA▼ GG+GA▼+	-	-	-	-	-	-	-	-
IL1B	rs3917356	-	TT▼ CC+CT▼+	-	-	-	-	-	-	-
	rs212704	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NLRC4	rs385076	-	TT▲ CC+CT▼	-	-	-	-	-	-	-
	rs455060	-	GG▲ AA+GA▼	-	-	-	-	-	-	-
CARD8	rs6509366	-	-	-	-	-	-	-	-	AA▲ GG+AG▼
	rs7258674	-	-	-	-	-	AA▼ GG+AG▲	-	-	-
NEK7	rs6671879	-	-	-	-	GG▼ AA+AG▲	-	-	-	AA▲ GG+AG▼

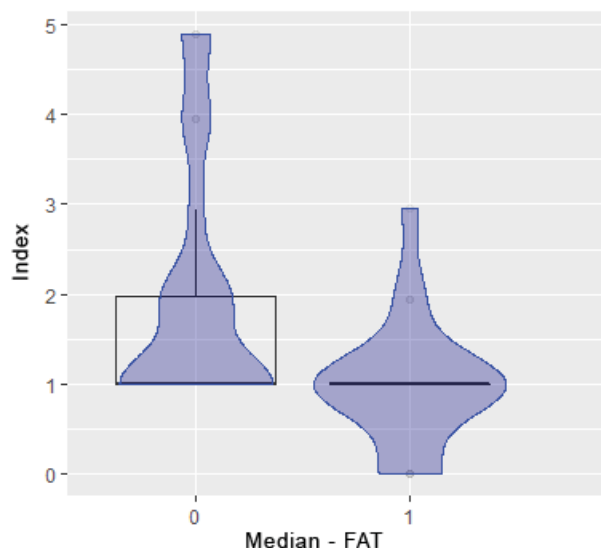
Green arrows: decrease or improvement in the parameters. Green arrows with plus: higher decrease of parameters compared with other genotype. Red arrows: increase or worsen in the parameters.

Figure 1 – Polygenic index and BMI change.



Polygenic index was performed including genotypes of five variants associated with lower BMI loss: G allele (GG+GA genotypes) of rs13105517 (*TLR2*), CC genotype of rs1554973, AA genotype of rs192711 (*TLR4*), G allele (GG+GA genotypes) of rs455060 (*NLRC4*) and G allele (GG+GA genotypes) of rs1800629 (*TNF*). Carriers of 3 or more risk genotypes had BMI loss below median.

Figure 2 – Polygenic index and body fat percentage change.



Polygenic index was performed including genotypes of five variants associated with lower fat loss: TT genotype of rs3917356 (*IL1B*), A allele (GA+AA genotypes) of rs3755867 (*NFkB1*); CC genotype of rs212704 (*NLRC4*); TT genotype of rs385076 and GG genotype of rs455060 (*NLRC4*). Fat loss below median was associated with 2 or more risk genotypes.

4 DISCUSSION

Physical exercises are known as important factors for health improvement, decreasing BMI, fat composition and helping to maintain normal lipid and glucose levels and decrease inflammatory markers. In our study we investigated the effects of polymorphisms of inflammatory components coding genes (*TLR2*, *TLR4*, *IL1B*, *IL6*, *NFkBIA*, *NFkB1*, *NLRC4*, *CARD8* and *NEK7*) in anthropometric and biochemical outcomes of physical exercises in children and adolescents. This is the first study that evaluated this set of SNPs with a training program and biochemical and anthropometrical parameters. Previous studies analyzed the same polymorphism in *TNF* (rs1800629) and others in *IL-6* in an elder sample [17,18]. The main results were summarized in anthropometrical and biochemical findings; therefore, discussion is also presented separately in anthropometrical and biochemical outcomes.

4.1 Anthropometrical outcomes

Genetic variants in *TLR2* and *TLR4* influenced significantly BMI loss after the physical exercise intervention. Both genotypes associated with increase in BMI (CC genotype of rs1554973 and AA genotype of rs1927911) present higher expression of *TLR2* and *TLR4* (esophagus and aorta tissue) according to GTEx Portal. G allele of rs13105517, which presented lower BMI loss compared with AA genotype, presented higher expression of *TLR2*. Higher levels of *TLR2/TLR4* and *TNF* were previously associated with obesity and insulin resistance [31,58]. In addition, the polygenic index, which also included rs455060 (*NLRC4*) and rs1800629 (*TNF*) showed that individuals carrying 3 or more risk genotypes had lower BMI loss after physical exercise intervention.

Inflammatory levels are higher in obese individuals. Infiltration of macrophages in adipose tissue release pro-inflammatory cytokines leading to systemic low grade inflammation. In addition, the hormone leptin, which in obese individuals is found in higher circulating levels, has pro-inflammatory properties and upregulates the secretion of cytokines, such as IL-1, IL-6 and *TNF-α* [59,60]. Leptin levels are directly proportional to BMI [61], and have an important role in appetite control and body weight. Together with leptin expression, deregulation of gut flora release LPS, which induces inflammatory

response by activation of TLRs [62]. Although the practice of physical exercises is predicted to improve inflammation profile, carriers of risk genotypes (higher expression of inflammatory markers) could have a higher release of inflammatory cytokines, including leptin, than non-carriers (cytokine-leptin hypothesis) [63]. In addition, BMI is related with higher levels of leptin. These scenarios can promote resistance to exercise effects on metabolic amelioration.

Exercise was also effective for decreasing body fat percentage and we identify potential genetic variants in *NFKB1*, *IL1B* and *NLRC4* associated with body fat percentage variation after the physical exercise intervention. NF- κ B is a known transcriptional factor involving in immunity, inflammation and oncogenesis. Besides, Laurencikiene and colleagues investigated the modulatory role of NF- κ B in the lipolytic activity of TNF in adipose tissue cell culture [28]. It is possible that NF- κ B could induce higher lipolysis in response to exercise.

Possibly, the G allele provides higher p50 subunit expression which has anti-inflammatory properties due to IL-10 (anti-inflammatory cytokine) transcription, and thus decreasing inflammatory profile and leading to ameliorated physical exercise outcomes. The rs3755867 is a tag SNP in LD with rs28362491 ($D' = 0.96$). It is a four base insertion/deletion variant (-94ins/del ATTG) and carriers of deletion allele were found predisposed to atherosclerosis [25] and heart disease [64]. Insertion of ATTG in the promoter region could be related with higher expression of homodimer p50/p50 and its consequent anti-inflammatory profile.

In the same way, TT genotype of rs3917356 knowingly increases *IL1B* expression, unlike TT genotype of rs385076 and GG genotype of rs455060 that are associated with decreased expression of *NLRC4* (esophagus tissue). However, expression is tissue specific and these variants could lead to different expression levels in other tissue. Besides that, other variants in genes that code for *NLRC4* regulatory elements may help in their activation. Activation of *NLRC4* had been associated with atherosclerosis [42], high levels of TG [65] and cancer [41]. *NLRC4* activity releases pro-inflammatory cytokines including IL-1 β and IL-18. IL-1 β is a cytokine released by macrophages and was

previously associated with hepatic steatosis. Excess of nutrients promote adipose tissue expandability and higher release of IL- β , which in turn contributes to inflammation in this tissue. Findings showed that IL-1 β interfere in adipose tissue expandability leading to fat accumulation in ectopic tissues (liver) [66]. Thus, higher expression of IL-1 β could impair fat loss promoted by physical exercise due its role in adipose tissue inflammation and lipid storage. Combination of all genotypes associated with lower fat loss showed that carriers of 2 or more risk genotypes had lower fat loss after the physical exercise program.

4.2 Biochemical variables

As in BMI variation after the physical exercise intervention, improvement in insulin sensitivity through HOMA-IR and QUICKI indexes were also associated with polymorphisms in *TLR2* (AA genotype of rs13105517) and *TLR4* (AA genotype of rs1927911). Exercise promotes decrease of inflammatory markers and increase of adiponectin which is insulin-sensitizing [67,68]. Activation of TLR2, and mainly TLR4, triggers an inflammatory signaling cascade of insulin desensitizing [69]. Conversely, these genotypes were related with higher expression of *TLR2* and *TLR4* in aorta and esophagus tissue (GTEx). Moreover, protein expression could change between body tissues and could be higher in endocrine tissues, as adipose tissue, for example.

Furthermore, rs13105517 and rs1927911 are tag SNPs and are possibly in LD with causal variants. The rs13105517 is in LD with rs5743708 (*TLR2*) that was associated with type 2 diabetes and rs1927911 is in LD with rs11536889 (*TLR4*) associated with diabetes mellitus [70]. Additionally, inflammatory and insulin pathways are complex and polymorphisms in TLR2/TLR4 are only one of the factors involved in the mechanism of insulin resistance. These findings show the importance of the combination between exercise and genetic predisposition in insulin sensitivity improvement.

Intervention did not present a significant result in glucose levels changes; however, genetic variants presented association. Polymorphism in *NFKBIA* and *NEK7* genes showed significant association with greater glucose levels reduction after the exercise program. CC and CT genotypes of rs3138053 are

related with higher *NFKBIA* expression in skeletal muscle (GTEx). *NFKBIA* encodes an important inhibitor of NF- κ B: I κ B α . Higher expression of I κ B α is related to lower NF- κ B expression and decrease of inflammation [71]. Release of inflammatory cytokines is known for playing a key role in glycemic homeostasis impairment.

NEK7, in turn, is a recently discovered NLRP3 inflammasome regulator, and it is fundamental to effective NLRP3 activation [37]. GG genotype of rs6671879 was associated with higher reduction in glucose levels and G allele with reduced TG levels. In a previous work of our group, G allele was associated with higher TC and LDL-C levels [65]. We hypothesized that carriers of G allele had lower expression of NEK7 avoiding NLRP3 activation and implicating in lower inflammation level, consequently reinforcing physical exercise benefits and ultimately leading to decreased glucose and TG levels after the intervention. Besides that, in weight loss free fatty acids (FFA) circulating levels are lower, which leads to lower inflammatory response and reestablishment of normal glucose and lipid levels. Although evidences showed that complex NLRP3/NEK7 is associated with inflammatory diseases, Ma and coworkers found a protective role of complex NEK7-NLRP3 in patients with systemic lupus erythematosus [72]. Mechanism of NEK-NLRP3 activation remains to be understood.

Besides rs6671879, TG was associated with other 2 polymorphisms rs3804099 (*TLR2*) and rs650966 (*CARD8*). Expression of TLR2 and TLR4 were positively correlated with high levels of TG and TC [73]. The CC genotype of rs3804099 was previously associated with severe coronary atherosclerosis [32]. Here we found that CC genotype individuals had increased TG levels after the physical exercise program. Although these SNP is a synonymous variant and no amino acid sequence change occurs, codon usage bias may affect expression depending on availability of the corresponding anti-codon [74]. Thus CC genotype could provide increase of *TLR2* expression interfering in lipid metabolism resulting in lower effect of exercise in lipid parameters. Still, there is a possibility that rs3804099 is in LD with a functional variant associated with higher *TLR2* expression.

For rs6509366 (CARD8) carriers of G allele showed reduction in TG levels. Furthermore, G allele of rs7258674 of CARD8 was associated with higher HDL-C, a protective factor against cardiovascular diseases. CARD8 is a negative regulator of NLRP3 and its higher expression may prevent NLRP3 activation. [38]. Activation of NLRP3 inflammasome triggers pro-inflammatory molecules transcription, including NF- κ B and ultimately leads to pro-inflammatory cytokine IL-1 β releasing. Expression of NLRP3 is associated with metabolic and inflammatory diseases including obesity, type 2 diabetes and gout [75]. It is possible that rs6509366 and rs7258674 are responsible for CARD8 higher expression, and thus by the protection against NLRP3 activation. Besides that, these variants were also tag SNPs and could be in LD with causal variants.

Polymorphism in *IL6* was associated with TC and LDL-C. IL-6 is a known cytokine secreted by many tissue types, including adipose tissue in expansion and skeletal muscle on exercise, inducing immune response. Obese individuals have higher IL-6 circulating levels. In a previous study with children and adolescents, G allele of rs2069845 was associated with obesity [16]. G allele was also associated with higher TG levels of and higher TC/HDL-C ratio [76]. We found that AA genotype of rs2069845 was associated with lower reduction in TC and LDL-C levels (increased TC and LDL-C levels). Although the role of IL-6 in the pathology of obesity is known, recent evidences showed lipolytic effects of IL-6, decreasing lipid levels [77]. Moreover, IL-6 mediates fat oxidation through AMPK pathway. Thus, contrasting results have been publishing regarding IL-6 effect in markers of obesity. The rs2069845 is a tag SNP in LD with rs1554606 ($D'=1.00$) which was associated with obesity and high BMI and altered lipid profile in Saudi population [15]. Considering IL-6 role in lipid metabolism, we hypothesize that A allele could lead to lower *IL6* expression and consequently to lower effect in regulation of fatty acid oxidation, even after the physical exercise intervention. Physical exercise may lead to regulation of inflammatory parameters and increase the release of IL-6, affecting lipid levels and insulin sensitizing [78].

In addition, GG genotype individuals (rs3755867 of *NFKB1*) exhibited increased LDL-C levels after the physical exercise program. Although this same

genotype was associated with fat loss, lipid metabolism is complex and involves several components. In experiment in cellular culture of human hepatocellular carcinoma it was observed an increase in intracellular cholesterol levels with LPS stimulation dependent of NF- κ B. In turn, cholesterol accumulation leads to inflammatory response mediated by LPS/NF- κ B, a mechanism of positive feedback [79]. Likely, LPS activation leads to IKK overexpression, consequently increasing p65 subunit expression and activating NF- κ B pro-inflammatory signaling through the formation of p50/p65 heterodimers. Thus, the anti-inflammatory effect of rs3755867, by increasing expression of p50 subunit, is undermined by the increase in p65 expression and the formation of p50/p65 heterodimers.

5 CONCLUSION:

Although this study has some limitations, such as small sample size and absence of inflammatory markers to analyze together with variants, the physical exercise intervention was effective in reducing anthropometrical and metabolic parameters. Together with the physical exercise intervention, variants in *TLR2*, *TLR4*, *IL1B*, *IL6*, *NFKB1*, *NFKBIA*, *NLRC4*, *CARD8* and *NEK7* exerted influence over anthropometrical and metabolic parameters variation. Combination of genotypes associated with anti-inflammatory profile may lead to ameliorated biochemical and anthropometrical profiles as outcomes of physical exercise programs. Inflammatory markers lead to metabolic dysfunction, impairment of weight loss, deregulation of insulin signaling and lipid metabolism and the associations we found may provide insights into inflammatory markers and metabolism in physical exercise context.

REFERENCES

1. Kotas ME, Medzhitov R. Review. Cell [Internet]. Elsevier Inc.; 2015;160:816–27. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.010>
2. Hotamisligil S. Review Foundations of Immunometabolism and Implications for Metabolic Health and Disease. 2017;
3. Hotamisligil GS. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. Nature. England; 2017;542:177–85.
4. Pekala P, Kawakami M, Vine W, Lane MD, Cerami A. Studies of insulin resistance in adipocytes induced by macrophage mediator. J Exp Med. United States; 1983;157:1360–5.
5. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : Direct role in obesity-linked insulin resistance. Science (80-). 1993;259:87–91.
6. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. J Clin Invest. 1995;95:2409–15.
7. Idriss HT, Naismith JH. TNF α and the TNF receptor superfamily: Structure-function relationship(s). Microsc Res Tech. 2000;50:184–95.
8. Golshani H, Haghani K, Dousti M, Bakhtiyari S. Association of TNF-alpha 308 G/A Polymorphism With Type 2 Diabetes: A Case-Control Study in the Iranian Kurdish Ethnic Group. Osong public Heal Res Perspect. Korea (South); 2015;6:94–9.
9. Antonicelli R, Olivieri F, Cavallone L, Spazzafumo L, Bonafe M, Marchegiani F, et al. Tumor necrosis factor-alpha gene -308G>A polymorphism is associated with ST-elevation myocardial infarction and with high plasma levels of biochemical ischemia markers. Coron Artery Dis. England; 2005;16:489–93.
10. Yang G, Chen J, Xu F, Bao Z, Yao Y, Zhou J. Association between tumor

necrosis factor-alpha rs1800629 polymorphism and risk of asthma: a meta-analysis. *PLoS One*. United States; 2014;9:e99962.

11. Ferreira AC, Almeida S, Tavares M, Canedo P, Pereira F, Regalo G, et al. NOD2/CARD15 and TNFA, but not IL1B and IL1RN, are associated with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. England; 2005;11:331–9.

12. Karimi M, Goldie LC, Cruickshank MN, Moses EK, Abraham LJ. A critical assessment of the factors affecting reporter gene assays for promoter SNP function: A reassessment of -308 TNF polymorphism function using a novel integrated reporter system. *Eur J Hum Genet*. 2009;17:1454–62.

13. Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, et al. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. *J Clin Endocrinol Metab*. United States; 1997;82:4196–200.

14. Illig T, Bongardt F, Schopfer A, Muller-Scholze S, Rathmann W, Koenig W, et al. Significant association of the interleukin-6 gene polymorphisms C-174G and A-598G with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. United States; 2004;89:5053–8.

15. Alharbi KK, Syed R, Khan IA. Association of interleukin-6 polymorphisms with obesity and metabolic alterations in young Saudi population. *Mol. Biol. Rep*. 2014. p. 1519–23.

16. Santa U De. Association of IL-6 and CRP gene polymorphisms with obesity and metabolic disorders in children and adolescents. 2015. p. 915–24.

17. Liu CS, Li TC, Li CI, Liao LN, Yang CW, Lin CH, et al. Gene-physical activity interactions in lower extremity performance: Inflammatory genes CRP, TNF- α , and LTA in community-dwelling elders. *Sci Rep*. 2017;7.

18. Pereira DS, Mateo ECC, de Queiroz BZ, Assumpcao AM, Miranda AS, Felicio DC, et al. TNF-alpha, IL6, and IL10 polymorphisms and the effect of physical exercise on inflammatory parameters and physical performance in elderly women. *Age (Dordr)*. Netherlands; 2013;35:2455–63.

19. Pedersen BK, Febbraio MA. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol Rev. United States*; 2008;88:1379–406.
20. Pedersen B, Febbraio M. Point : Counterpoint Interleukin-6 does / does not have a beneficial role in insulin sensitivity and glucose homeostasis. *J Appl Physiol*. 2007;102:814–9.
21. Mauer J, Chaurasia B, Goldau J, Vogt MC, Ruud J, Nguyen KD, et al. Signaling by IL-6 promotes alternative activation of macrophages to limit endotoxemia and obesity-associated resistance to insulin. *Nat Immunol*. 2014;15:423–30.
22. Baker RG, Hayden MS, Ghosh S. Review NF- κ B , Inflammation , and Metabolic Disease. 2011;11–22.
23. Tornatore L, Thotakura AK, Bennett J, Moretti M. The nuclear factor kappa B signaling pathway : integrating metabolism with inflammation. *Trends Cell Biol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012;22:557–66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2012.08.001>
24. Lai H, Chen Q, Li X, Ma Y, Xu R, Zhai H, et al. Association between genetic polymorphism in NFKB1 and NFKBIA and coronary artery disease in a Chinese Han population. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8:21487–96.
25. Lai H, Li X, Yang Y, Ma Y, Xu R, Pan S. Genetic Variation in NFKB1 and NFKBIA and Susceptibility to Coronary Artery Disease in a Chinese Uygur Population. 2015;1–14.
26. Bank S, Skytt Andersen P, Burisch J, Pedersen N, Roug S, Galsgaard J, et al. Polymorphisms in the inflammatory pathway genes TLR2, TLR4, TLR9, LY96, NFKBIA, NFKB1, TNFA, TNFRSF1A, IL6R, IL10, IL23R, PTPN22, and PPARG are associated with susceptibility of inflammatory bowel disease in a Danish cohort. *PLoS One*. 2014;9.
27. Vella L, Caldow MK, Larsen AE, Tassoni D, Della Gatta PA, Gran P, et al. Resistance exercise increases NF-kappaB activity in human skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. United States; 2012;302:R667-73.

28. Dicker A, van Harmelen V, Rydén M, Langin D, Laurencikiene J, Blomqvist L, et al. NF- κ B is important for TNF- α -induced lipolysis in human adipocytes. *J Lipid Res.* 2007;48:1069–77.
29. Lackey DE, Olefsky JM. by the innate immune system. *Nat Publ Gr* [Internet]. Nature Publishing Group; 2015;12:15–28. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2015.189>
30. Fukata M, Vamadevan AS, Abreu MT. Toll-like receptors (TLRs) and Nod-like receptors (NLRs) in inflammatory disorders. *Semin Immunol.* 2009;21:242–53.
31. Ahmad R, Al-Mass A, Atizado V, Al-Hubail A, Al-Ghimlas F, Al-Arouj M, et al. Elevated expression of the toll like receptors 2 and 4 in obese individuals: its significance for obesity-induced inflammation. *J Inflamm (Lond). England;* 2012;9:48.
32. Kutikhin AG, Ponasenko A V., Khutornaya M V., Yuzhalin AE, Zhidkova II, Salakhov RR, et al. Association of TLR and TREM-1 gene polymorphisms with atherosclerosis severity in a Russian population. *Meta Gene* [Internet]. Elsevier B.V.; 2016;9:76–89. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mgene.2016.04.001>
33. Junjie X, Songyao J, Minmin S, Yanyan S, Baiyong S, Xiaying D, et al. The association between Toll-like receptor 2 single-nucleotide polymorphisms and hepatocellular carcinoma susceptibility. *BMC Cancer.* 2012;12.
34. Song Y, Liu H, Long L, Zhang N, Liu Y. TLR4 rs1927911, but not TLR2 rs5743708, is associated with atherosclerotic cerebral infarction in the Southern Han population: a case-control study. *Medicine (Baltimore). United States;* 2015;94:e381.
35. Xu XH, Shah PK, Faure E, Equils O, Thomas L, Fishbein MC, et al. Toll-like receptor-4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL. *Circulation.* 2001;104:3103–8.
36. Strowig T, Henao-Mejia J, Elinav E, Flavell R. Inflammasomes in health and

disease. *Nature*. 2012;481:278–86.

37. He Y, Zeng MY, Yang D, Motro B, Núñez G. NEK7 is an essential mediator of NLRP3 activation downstream of potassium efflux. *Nature* [Internet]. Nature Publishing Group; 2016;530:354–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature16959>

38. Ito S, Hara Y, Kubota T. CARD8 is a negative regulator for NLRP3 inflammasome, but mutant NLRP3 in cryopyrin-associated periodic syndromes escapes the restriction. *Arthritis Res Ther* [Internet]. Arthritis Research & Therapy; 2014;16:1–11. Available from: Arthritis Research & Therapy

39. Paramel G V., Sirsjö A, Fransén K. Role of Genetic Alterations in the NLRP3 and CARD8 Genes in Health and Disease. *Mediators Inflamm* [Internet]. 2015;2015:1–10. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/mi/2015/846782/>

40. Nordlander S, Pott J, Maloy KJ. NLRC4 expression in intestinal epithelial cells mediates protection against an enteric pathogen. *Mucosal Immunol*. 2014;7:775–85.

41. Kolb R, Phan L, Borchering N, Liu Y, Yuan F, Janowski AM, et al. Obesity-associated NLRC4 inflammasome activation drives breast cancer progression. *Nat Commun* [Internet]. Nature Publishing Group; 2016;7:1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms13007>

42. Johansson A, Eriksson N, Becker RC, Storey RF, Himmelmann A, Hagström E, et al. NLRC4 Inflammasome Is an Important Regulator of Interleukin-18 Levels in Patients with Acute Coronary Syndromes: Genome-Wide Association Study in the PLATElet inhibition and patient Outcomes Trial (PLATO). *Circ Cardiovasc Genet*. 2015;8:498–506.

43. Zeller T, Haase T, Muller C, Riess H, Lau D, Zeller S, et al. Molecular Characterization of the NLRC4 Expression in Relation to Interleukin-18 Levels. *Circ Cardiovasc Genet*. United States; 2015;8:717–26.

44. Stienstra R, van Diepen JA, Tack CJ, Zaki MH, van de Veerdonk FL, Perera D, et al. Inflammasome is a central player in the induction of obesity and insulin

resistance. *Proc Natl Acad Sci [Internet]*. 2011;108:15324–9. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1100255108>

45. Hoffman HM, Wanderer AA. Inflammasome and IL-1 β -mediated disorders. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 2010. p. 229–35.

46. Nov O, Shapiro H, Ovadia H, Tarnovski T, Dvir I, Shemesh E, et al. Interleukin-1 β Regulates Fat-Liver Crosstalk in Obesity by Auto-Paracrine Modulation of Adipose Tissue Inflammation and Expandability. *PLoS One*. 2013;8.

47. Manica-Cattani MF, Bittencourt L, Rocha MIU, Algarve TD, Bodanese LC, Rech R, et al. Association between interleukin-1 beta polymorphism (+3953) and obesity. *Mol Cell Endocrinol*. 2010;314:84–9.

48. Vargas-Alarcón G, Cruz-López M, Valladares A, Álvarez-León E, Juárez-Cedillo T, Pérez-Méndez Ó, et al. The interleukin-1 β -511 T>C (rs16944) gene polymorphism is associated with risk of developing silent myocardial ischemia in diabetic patients. *Immunol Lett*. 2015;168:7–12.

49. Pizzi J, Furtado-Alle L, Schiavoni D, Lopes WA, da Rosa Silva L, Bono GF, et al. Reduction in Butyrylcholinesterase Activity and Cardiovascular Risk Factors in Obese Adolescents after 12-Weeks of High-Intensity Interval Training. *J Exerc Physiol Online [Internet]*. 2017;20:110–21. Available from: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=s3h&AN=123430639&site=ehost-live>

50. Do Nascimento GA, Teixeira MD, Furtado-Alle L, Leite N, de Souza RLR, Saliba LF, et al. FTO rs9939609 A allele influences anthropometric outcome in response to dietary intervention, but not in response to physical exercise program. *Eur J Nutr*. 2017;1–10.

51. do Nascimento GA, Leite N, Furtado-Alle L, Teixeira MD, de Souza RLR, Milano GE, et al. FTO rs9939609 Does Not Interact with Physical Exercise but Influences Basal Insulin Metabolism in Brazilian Overweight and Obese Adolescents. *J Obes. United States*; 2018;2018:3134026.

52. Milano GE, Leite N, Chaves TJ, Eisfeld G, Lehtonen R, Souza R De, et al.

- Atividade da butirilcolinesterase e fatores de risco cardiovascular em adolescentes obesos submetidos a um programa de exercícios físicos. 2013;
53. Lopes M de FA, Bento PCB, Lazzaroto L, Rodacki AF, Leite N. The effects of water walking on the anthropometrics and metabolic aspects in young obese. *Rev Bras Cineantropometria Desempenho Hum*. 2015;17:146–55.
 54. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski a S, Naylor B a, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28:412–9.
 55. Katz A, Nambi SS, Mather K, Baron AD, Follmann DA, Sullivan G, et al. Quantitative Insulin Sensitivity Check Index : A Simple, Accurate Method for Assessiong Insulin Sensitivity In Humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85:2402–10.
 56. Lahiri DK, Nurnberger JI. A rapid no-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP analysis. *Nucleic Acids Res*. 1991;19:5444.
 57. Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, et al. The Structure of Haplotype Blocks in the Human Genome. *Science* (80-) [Internet]. 2002;296:2225 LP-2229. Available from: <http://science.sciencemag.org/content/296/5576/2225.abstract>
 58. Spiegelman BM, Hotamisligil GS. Through thick and thin: Wasting, obesity, and TNF α . *Cell*. 1993. p. 625–7.
 59. Faggioni R, Jones-Carson J, Reed DA, Dinarello CA, Feingold KR, Grunfeld C, et al. Leptin-deficient (ob/ob) mice are protected from T cell-mediated hepatotoxicity: role of tumor necrosis factor alpha and IL-18. *Proc Natl Acad Sci U S A*. United States; 2000;97:2367–72.
 60. Shen J, Sakaida I, Uchida K, Terai S, Okita K. Leptin enhances TNF- α production via p38 and JNK MAPK in LPS-stimulated Kupffer cells. *Life Sci*. 2005;77:1502–15.
 61. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM.

Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. England; 1994;372:425–32.

62. Batra A, Pietsch J, Fedke I, Glauben R, Okur B, Stroh T, et al. Leptin-dependent toll-like receptor expression and responsiveness in preadipocytes and adipocytes. *Am J Pathol*. 2007;170:1931–41.

63. Sarraf P, Frederich RC, Turner EM, Ma G, Jaskowiak NT, Rivet DJ, et al. Multiple Cytokines and Acute Inflammation Raise Mouse Leptin Levels: Potential Role in Inflammatory Anorexia. *J Exp Med* [Internet]. Rockefeller University Press; 1997 [cited 2019 Mar 14];185:171–6. Available from: <http://jem.rupress.org/content/185/1/171>

64. Seidi A, Mirzaahmadi S, Mahmoodi K, Soleiman-Soltanpour M. The association between NFKB1 -94ATTG ins/del and NFKB1A 826C/T genetic variations and coronary artery disease risk. *Mol Biol Res Commun*. Iran; 2018;7:17–24.

65. Gomes Torres ACMB, Leite N, Tureck LV, de Souza RLR, Titski ACK, Milano-Gai GE, et al. Association between Toll-like receptors (TLR) and NOD-like receptor (NLR) polymorphisms and lipid and glucose metabolism. *Gene* [Internet]. Elsevier; 2018;685:211–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30481552>0Ahttps://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378111918312083

66. Nov O, Shapiro H, Ovadia H, Tarnovskii T, Dvir I, Shemesh E, et al. Interleukin-1 β regulates fat-liver crosstalk in obesity by auto-paracrine modulation of adipose tissue inflammation and expandability. *PLoS One*. United States; 2013;8:e53626.

67. Esposito K, Pontillo A, Di Palo C, Giugliano G, Masella M, Marfella R, et al. Effect of weight loss and lifestyle changes on vascular inflammatory markers in obese women: a randomized trial. *JAMA*. United States; 2003;289:1799–804.

68. Vetrivel Venkatasamy V, Pericherla S, Manthuruthil S, Mishra S, Hanno R. Effect of physical activity on insulin resistance, inflammation and oxidative stress in diabetes mellitus. *J. Clin. Diagnostic Res*. 2013. p. 1764–6.

69. Kim JJ, Sears DD. TLR4 and Insulin Resistance. *Gastroenterol Res Pract*. 2010;2010:1–11.
70. Cai H, Cai J, Tao G. Association of toll-like receptor 4 polymorphisms with type 2 diabetes mellitus. *APMIS*. Denmark; 2013;121:605–11.
71. Zhao Z, Zhong X, Wu T, Yang T, Chen G, Xie X, et al. Identification of a NFKBIA polymorphism associated with lower NFKBIA protein levels and poor survival outcomes in patients with glioblastoma multiforme. *Int J Mol Med*. 2014;34:1233–40.
72. Ma ZZ, Sun HS, Lv JC, Guo L, Yang QR. Expression and clinical significance of the NEK7-NLRP3 inflammasome signaling pathway in patients with systemic lupus erythematosus. *J Inflamm (United Kingdom)*. 2018;15.
73. Zhu Y-J, Wang C, Song G, Zang S-S, Liu Y-X, Li L. Toll-like receptor-2 and -4 are associated with hyperlipidemia. *Mol Med Rep*. Greece; 2015;12:8241–6.
74. Miller JE, Shivakumar MK, Risacher SL, Saykin AJ, Lee S, Nho K, et al. Codon bias among synonymous rare variants is associated with Alzheimer's disease imaging biomarker. *Pac Symp Biocomput [Internet]*. 2018;23:365–76. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29218897>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5756629>
75. De Nardo D, Latz E. NLRP3 inflammasomes link inflammation and metabolic disease. *Trends Immunol [Internet]*. Elsevier Ltd; 2011;32:373–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2011.05.004>
76. Joffe YT, van der Merwe L, Evans J, Collins M, Lambert E V., September A V., et al. Interleukin-6 gene polymorphisms, dietary fat intake, obesity and serum lipid concentrations in black and white South African Women. *Nutrients*. 2014;6:2436–65.
77. Hashizume M, Mihara M. IL-6 and lipid metabolism. *Inflamm Regen*. 2011;31:325–33.
78. Topic AF, Glasgow S, Edited J, Downes C, Nottingham PG. IL-6 signalling

in exercise and disease. 2007;1295–7.

79. He M, Zhang W, Dong Y, Wang L, Fang T, Tang W, et al. Pro-inflammation NF- κ B signaling triggers a positive feedback via enhancing cholesterol accumulation in liver cancer cells. J Exp Clin Cancer Res. 2017;36.

CAPÍTULO III

Artigo preparado para submissão à revista *Inflammation Research*

Relações entre marcadores metabólicos e polimorfismos nos genes da via inflamatória *TNF*, *IL6*, *IL1B*, *NFKB1* e *NFKBIA*

RESUMO

O tecido adiposo é um importante órgão na regulação metabólica, responsável pela secreção de citocinas e marcadores inflamatórios, no entanto na quebra da homeostase há uma alteração no padrão destas citocinas podendo prejudicar a sinalização insulínica e o metabolismo lipídico. Portanto o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de polimorfismos nos genes codificadores de componentes da via inflamatória como *NFKB1*, *NFKBIA*, *TNF*, *IL6* e *IL1B* e marcadores antropométricos e bioquímicos. A amostra foi constituída de 115 adultos e 158 crianças e adolescentes. Os dados antropométricos coletados foram: altura, peso, índice de massa corporal (IMC) circunferência abdominal (CA), de quadril (CQ) e de cintura (CC). As variáveis bioquímicas coletadas foram LDL-C, HDL-C, triglicerídeos (TG), colesterol total (TC), insulina e glicose. Insulina e glicose foram usadas para cálculo de HOMA-IR (Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance) e QUICKI (*Quantitative Insulin Sensitivity Check Index*). Dados foram analisados através de regressão univariada para selecionar as possíveis associações e posteriormente, foram realizadas regressões multivariadas ajustando para sexo, idade e IMC. Foram encontradas associações entre polimorfismos nos genes *NFKB1*, *NFKBIA*, *TNF* e *IL6* e variáveis antropométricas e bioquímicas. Genótipo TT de rs3138053 (*NFKBIA*) foi associado com maiores níveis de TG, e os portadores do genótipo CC apresentaram maiores níveis de adiponectina e visfatina. Genótipo CC de rs696 (*NFKBIA*) foi associado com maiores níveis de adiponectina. Genótipo GG e alelo G de rs3755867 (*NFKB1*) foram associados a maior IMC e maior circunferência de quadril. Alelo A de rs1800629 (*TNF*) foi associado com maiores níveis de TG, genótipo GG de rs2069845 associado a menores valores de QUICKI. Estes resultados mostram a relação entre polimorfismos nos genes relacionados a via inflamatória e componentes do metabolismo.

Palavras-chave: polimorfismos, metabolismo, via inflamatória, citocinas.

1 INTRODUÇÃO

O tecido adiposo por muito tempo foi visto como apenas um tecido com função de reserva energética. Com a descoberta da secreção de leptina, uma molécula com importante função na saciedade, essa visão mudou radicalmente e agora o tecido adiposo é visto como um órgão com importante função endócrina [1]. Secrete diversas citocinas, chamadas adipocinas que regulam vários processos, tais como saciedade, imunidade, inflamação, crescimento tumoral entre outros. Estas moléculas exercem importante função na homeostase metabólica, reagindo frente às flutuações de energia e de nutrientes [2]. Em resposta ao rompimento da homeostase, o padrão destas citocinas pode ser alterado para um perfil inflamatório. Essa mudança de perfil, com liberação destas citocinas inflamatórias, pode desencadear distúrbios metabólicos incluindo a obesidade, resistência insulínica e aterosclerose [3].

A primeira molécula identificada que ofereceu pistas para o entendimento da relação entre citocinas inflamatórias, obesidade e doenças metabólicas foi TNF. Esta citocina foi identificada primeiramente no tecido adiposo de roedores obesos. Depois, expressão elevada de TNF foi encontrada em músculo de humanos obesos [4]. É a citocina pró-inflamatória mais conhecida no contexto metabólico, sua transcrição é ativada em resposta a inflamação, infecção e ao estresse. TNF é capaz de prejudicar a captação de glicose, através do bloqueio da fosforilação da serina do receptor da insulina [5]. Além disso, parece ter um papel na lipólise inibindo a expressão de perilipina (PLIN) e lipase hormônio sensível (HSL) mediado por fator nuclear κ B (NF κ B) [6]. Polimorfismos em TNF têm sido associados com doenças metabólicas, como por exemplo, o rs1800629 (G>A), foi associado com doenças cardiovasculares [7] e diabetes tipo 2 [8]. Este *SNP* (*single nucleotide polymorphism*) se encontra na região promotora do gene e estudos mostram o alelo A relacionado à maior expressão de TNF [9].

IL-6 também é uma molécula com importante função metabólica. Juntamente com TNF tem sua maior expressão em pacientes obesos. A exata função de IL-6 ainda é debatida, pois ainda é incerto se ela exerce um papel protetor ou de risco nas doenças metabólicas [10]. Camundongos tratados com

alta dose de IL-6 tiveram a sinalização insulínica prejudicada [11]. No entanto, ausência de IL-6 culminou em obesidade na vida adulta [12]. Existem indícios de uma possível função imunorregulatória de IL-6, agindo principalmente na modulação nos perfis de macrófagos e atenuando a resposta ao estresse, dependendo do contexto [10,13]. Por exemplo, na obesidade sua expressão aumentada pode mitigar o efeito do estresse metabólico, ativando o perfil M2 (anti-inflamatório) de macrófagos. Por outro lado, na desregulação metabólica na qual há um grande número de moléculas inflamatórias circulantes, como ácidos graxos saturados e lipopolissacarídeos (componente presente na parede celular de bactérias gram negativa oriundas da flora intestinal), IL-6 ativaria o perfil de macrófagos M1 (pró-inflamatório) [10,14]. Polimorfismos no gene *IL-6* também têm sido associados a doenças metabólicas, como por exemplo, o alelo G do polimorfismo rs2069845 que foi associado à obesidade em crianças brasileiras [15] e à maior adiposidade em mulheres negras [16].

Citocinas pró-inflamatórias secretadas por macrófagos de perfil M1 como TNF e PAMPs (*pathogens associated molecular patterns*) ou DAMPs (*danger associated molecular patterns*) que ativam receptores do sistema imune inato, incluindo TLRs (*toll-like receptors*), são capazes de induzir a ativação do fator transcricional NF- κ B. A atividade de NF- κ B é inibida por I κ B α (*inhibitor of κ B alpha*) que o sequestra no citosol e impede a sua translocação para o núcleo. Citocinas e PAMPs podem iniciar a cascata que ativará o complexo IKK (*inhibitor of κ B kinase*) que irá fosforilar I κ B, promovendo sua degradação e liberando NF- κ B para se mover ao núcleo e realizar a transcrição de moléculas pró-inflamatórias como interleucina 1 β (IL-1 β) [17,18].

A estrutura de NF- κ B pode ser formada por homodímeros ou heterodímeros, a forma mais abundante é o heterodímero p65/p50. A subunidade p50 é codificada pelo gene *NF κ B1*, e a subunidade p65 por *RELA*. O homodímero p50/p50 tem propriedades anti-inflamatórias, pois inibe a transcrição de citocinas pró-inflamatórias. O I κ B inibidor de NF- κ B é transcrito por *NF κ BIA*. Polimorfismos tanto em *NF κ B1* quanto em *NF κ BIA* têm sido associados a doenças cardiovasculares. Como por exemplo, rs28362491 (*NF κ B1*), caracterizado por uma variação indel (inserção/deleção) de 4 bases (-94 ins/del ATTG) e que foi associado com doenças cardiovasculares [19]. A

variante ins (inserção) parece fornecer um efeito protetor, pois está relacionada com aumento na expressão de *NFKB1* [20]. O polimorfismo rs696 (*NFKBIA*) é uma variante localizada na região 3'UTR (*untranslated region*) do gene. Polimorfismos nesta região podem alterar a estabilidade do RNAm (RNA mensageiro) e impactar a expressão de *NFKBIA*. Esse *SNP* foi associado ao risco de colite ulcerativa [21].

O heterodímero p65/p50 de NF- κ B promove a transcrição de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β . Secreção de IL-1 β ocorre por meio da ativação de PAMPs ou DAMPs através dos receptores do sistema imune inato, como o inflamossomo [22]. Inflamossomo é um complexo de multi-proteínas, formado por moléculas adaptadoras. Estas irão ativar caspase-1 que irá clivar pro-IL-1 β na sua forma ativa. Mecanismo mediado por caspase-1 pode levar a um tipo de morte celular por lise chamada de piroptose [23]. Polimorfismo em IL-1 β tem sido associado à aterosclerose [24] e ao diabetes [25]. Genótipo CC do rs114363 (IL-1 β) foi associado à obesidade e o genótipo TT a maior circunferência de quadril [26]. Este polimorfismo é uma variante sinônima, que apesar de não alterar a sequência de aminoácidos, pode alterar o uso de códons e devido a uma possível menor disponibilidade de RNA transportador com anticódon específico impactar na expressão de *IL-1B*.

Nosso objetivo foi verificar se existe associação entre polimorfismos nos genes *TNF*, *IL6*, *IL1B*, *NFKB1* e *NFKBIA* e variáveis antropométricas e bioquímicas geralmente impactadas na desregulação metabólica.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Amostra e coleta de dados

A amostra é constituída de dois grupos independentes, 115 adultos e 158 crianças e adolescentes, totalizando 273 indivíduos. Todos os indivíduos assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido para participação do estudo. As crianças e adolescentes foram recrutadas em escolas públicas de Curitiba em parceria com o Núcleo de Qualidade de Vida do Programa de Pós-Graduação em Educação Física da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Os critérios de exclusão foram o uso de medicamentos para níveis de colesterol e controle do peso. Foram coletadas as seguintes variáveis antropométricas: peso e altura para cálculo do IMC (índice de massa corporal), circunferência abdominal ou de quadril.

Os adultos participantes do estudo são trabalhadores da UFPR. Nenhum critério de exclusão foi aplicado aos participantes. As variáveis antropométricas coletadas foram: peso e altura para cálculo do IMC, circunferência de quadril (CQ) e de cintura (CC).

Nos dois grupos foram coletadas amostras de sangue para mensurar parâmetros bioquímicos e para extração do DNA. Parâmetros bioquímicos coletados foram: LDL-colesterol (LDL-C), HDL-colesterol (HDL-C), colesterol total (CT), triglicerídeos (TG), insulina e glicose. Mensuração dos níveis de adiponectina e visfatina foram realizadas apenas para amostras de adultos. Dados de insulina e glicose foram usados para calcular os indexes de HOMA-IR (*Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance*) [27] para ambas as amostras e QUICKI (*Quantitative Insulin Sensitivity Check Index*) [28] para a amostra de crianças e adolescentes.

2.1 Seleção dos Polimorfismos e Genotipagem

Primeiramente, foram selecionados genes que codificam citocinas e componentes da via inflamatória previamente conhecidos no contexto metabólico como: *IL1B*, *IL6*, *TNF*, *NFKB1* e *NFKBIA*. Os polimorfismos nestes genes foram escolhidos com base no desequilíbrio de ligação (DL) através do programa Haploview [29] a partir dos dados *1000 genomes* [30]. Muitos genes possuem um ou mais blocos de *SNPs* (*single nucleotide polymorphisms*) que possui forte DL ($D' > 0,80$). Para este estudo, foram escolhidos no mínimo um SNP representativo de cada bloco. Além disso, polimorfismos previamente associados com doenças metabólicas ou inflamatórias também foram selecionados (Tabela 1). Os *tag SNPs* selecionados e seus respectivos genes foram: rs1143634 e rs3917356 (*IL1B*), rs2069845 (*IL6*), rs3774932 e rs3755867 (*NFKB1*), rs3138053 (*NFKBIA*) e rs915654 (*TNF*). Polimorfismos selecionados devido à associação prévia encontrada na literatura foram: rs16944 (*IL1B*); rs1800629 (*TNF*) e rs696 (*NFKBIA*). Na Tabela 2 estão descritas as frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos incluídos neste estudo.

O DNA foi extraído de sangue periférico pela técnica de *salting out* adaptada de Lahiri e Nurnberger [31]. A amostra foi diluída para a concentração final de 20ng/ul em um volume final de 50 ul. A genotipagem foi realizada pela metodologia de espectrometria de massa baseada na plataforma Sequenom massARRAY (EUA) [32] em laboratório localizado na Universidade de Auckland (Nova Zelândia).

Tabela 1 – Características dos *SNPs* selecionados

Gene	SNP	Substituição nucleotídica	Localização	MAF*	Classificação
<i>NFKB1</i>	rs3774932	c.-54+1248A>T	intron	0,40 (A)	Tag SNP
<i>NFKB1</i>	rs3755867	c.1750-979A>G	intron	0,30 (G)	Tag SNP
<i>NFKBIA</i>	rs3138053	c.-1004A>G	Promotora	0,32 (C)	Tag SNP
<i>NFKBIA</i>	rs696	c.*126C>T	3'UTR	0,37 (T)	Literatura
<i>IL-6</i>	rs2069845	c.2783-514C>T	Intron	0,39 (C)	Tag SNP
<i>TNF</i>	rs1800629	c.-488G>A	Promotora	0,18 (A)	Literatura
<i>TNF</i>	rs915654	c.-1736T>A	Intergênica	0,33 (A)	Literatura
<i>IL1B</i>	rs1143634	c.315G>A	sinônima	0,23 (A)	Tag SNP
<i>IL1B</i>	rs3917356	c.99+780C>T	Intron	0,44 (T)	Tag SNP
<i>IL1B</i>	rs16944	c.-598A>G	5'UTR	0,34 (A)	Literatura

Legenda: MAF - *minor allele frequency*. Literatura: polimorfismo previamente associado com distúrbios metabólicos ou inflamatórios.

Tabela 2 – Frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos incluídos neste estudo.

SNP (Gene)	Alelo/Genótipo	CA n(%)	Adultos n(%)	SNP (Gene)	Alelo/Genótipo	CA n(%)	Adultos n(%)
rs1143634 <i>IL1B</i>	G	266 (84)	184 (80)	rs1800629 <i>TNF</i>	G	281 (89)	207 (90)
	A	50 (16)	46 (20)		A	33 (11)	23 (10)
	GG	113 (72)	73 (63)		GG	126 (80)	93 (81)
	GA	40 (25)	38 (33)		GA	29 (18)	21 (18)
	AA	5 (3)	4 (3)		AA	2 (1)	1 (1)
rs16944 <i>IL1B</i>	G	174 (55)	145 (63)	rs3138053 <i>NFKBIA</i>	T	228 (73)	162 (70)
	A	142 (45)	85 (37)		C	86 (27)	68 (30)
	GG	46 (29)	43 (37)		TT	86 (55)	56 (49)
	GA	82 (52)	59 (51)		TC	56 (36)	50 (43)
	AA	30 (19)	13 (11)		CC	15 (10)	9 (8)
rs3917356 <i>IL1B</i>	C	191 (6)	127 (55)	rs696 <i>NFKBIA</i>	C	193 (61)	155 (67)
	T	125 (4)	103 (45)		T	123 (39)	75 (33)
	CC	57 (36)	32 (28)		CC	60 (38)	53 (46)
	CT	77 (49)	63 (55)		CT	73 (46)	49 (43)
	TT	24 (15)	20 (17)		TT	25 (16)	13 (11)
rs2069845 <i>IL6</i>	A	215 (68)	147 (64)	rs3755867 <i>NFKB1</i>	A	209 (66)	154 (67)
	G	101 (32)	83 (36)		G	107 (34)	76 (33)
	AA	77 (49)	44 (38)		AA	68 (43)	49 (43)
	AG	61 (39)	59 (51)		AG	73 (46)	56 (49)
	GG	20 (13)	12 (10)		GG	17 (11)	10 (9)
rs915654 <i>TNF</i>	T	177 (57)	130 (57)	rs3774932 <i>NFKB1</i>	G	176 (56)	125 (54)
	A	133 (43)	100 (43)		A	138 (44)	105 (46)
	TT	51 (33)	33 (29)		GG	49 (31)	33 (29)
	TA	75 (48)	64 (56)		GA	78 (50)	59 (51)
	AA	29 (19)	18 (16)		AA	30 (19)	23 (20)

Legenda: CA: amostra de crianças e adolescentes

2.2 Análises estatísticas

Frequências alélicas e genotípicas foram obtidas por contagem direta e equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testado pelo teste de qui-quadrado. As variáveis incluídas neste estudo foram testadas para normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov com correção de Lilliefors.

Três modelos de interação foram testados, o modelo recessivo, no qual o homozigoto para o alelo menos frequente foi comparado com os portadores do alelo mais frequente (heterozigotos e homozigotos para o alelo mais frequente). O modelo dominante, no qual o homozigoto para o alelo mais frequente foi comparado aos portadores do alelo menos frequente (heterozigotos e homozigotos para o alelo menos frequente). Por último, o modelo codominante no qual o homozigoto para o alelo mais frequente foi comparado ao heterozigoto e ao homozigoto para o alelo menos frequente.

Para testar a influência dos *SNPs* sobre as variáveis antropométricas e bioquímicas, primeiramente foi realizada regressão linear univariada. Após isso, com os modelos que se mostraram significativos, realizamos regressões lineares multivariadas ajustando para idade, sexo e IMC.

3 RESULTADOS

Encontramos associação entre cinco polimorfismos e os níveis de TG, adiponectina, visfatina, IMC e quadril (Tabela 3 e 4).

Na amostra dos adultos foram encontradas associações entre os níveis de TG, adiponectina e visfatina e o polimorfismo rs3138053 (*NFKB1A*). Portadores do genótipo TT apresentaram maiores níveis de TG, 17,57% a mais que os portadores do alelo C. Portadores do genótipo CC apresentaram maiores níveis de visfatina e de adiponectina que os portadores do alelo T e genótipo TT, respectivamente. Portadores do genótipo CC do polimorfismo rs696 (*NFKB1A*) também apresentaram maiores níveis de adiponectina. Portadores do genótipo AG do polimorfismo rs3755867 (*NFKB1*) apresentaram maior IMC e portadores do alelo G apresentaram maior circunferência de quadril.

Na amostra das crianças e adolescentes foi encontrada associação entre rs1800629 (*TNF*) e TG: portadores do alelo A tiveram maior níveis de TG. Portadores do genótipo GG do *SNP* rs2069845 apresentaram menor valores de QUICKI, conseqüentemente menor sensibilidade à insulina, comparados aos portadores do alelo A.

Tabela 3 – Resultados da regressão linear multivariada na amostra de adultos.

Gene	SNP	Variável	Genótipo Média±DP		p
NFKB1A	rs3138053	TG	TT (n=56) 143,32±78,04	CC+CT (n=59) 118,15±50,18	0,0022
		Visf.	CC (n=7) 75,34±147,79	TT+CT (n=102) 20,33±34,09	0,0089
		Adipo	TT (n=55) 4,03±1,89	CT (n=48) 4,60±2,1	0,0492
				CC (n=7) 5,47±2,31	
	rs696	Adipo	CC (n=50) 4,86±2,31	TT+CT (n=60) 3,96±1,69	0,01
NFKB1	rs3755867	IMC	GG (n=33) 27,62±4,93	AA+AG (n=82) 27,37±5,56	0,0064
		CQ	AA (n=23) 102,59±10,67	GG+AG (n=91) 102,93±14,11	0,0005

TG: triglicerídeos; Visf: visfatina; Adipo: adiponectina; IMC: índice de massa corporal; CQ: circunferência de quadril; DP: desvio padrão.

Tabela 4 – Resultados da regressão logística multivariada na amostra de crianças e adolescentes.

Gene	SNP	Variável	Genótipo Média±DP		p
TNF	rs1800629	TG	GG (n=126) 86,25±47,16	AA+GA (n=30) 108,31±62,96	0,0141
IL6	rs2069845	QUICKI	GG (n=19) 0,35±0,02	AA+AG (n=128) 0,38±0,07	0,033

TG: triglicerídeos, QUICKI: *Quantitative Insulin Sensitivity Check Index*; DP: desvio padrão.

4 DISCUSSÃO

Nós analisamos 10 polimorfismos em 5 genes codificantes de componentes da via inflamatória em duas amostras independentes. Encontramos associação entre polimorfismos nos genes codificantes das subunidades p50 e p105 do fator transcricional NF- κ B (*NFKB1*), I κ B (*NFKBIA*) na amostra de adultos. E associação com os polimorfismos nos genes *TNF* e *IL6* na amostra de crianças e adolescentes.

Foi encontrada associação entre o alelo G e o Genótipo GG de rs3755867 (*NFKB1*) com maior IMC e circunferência de quadril respectivamente. Em um estudo recente do nosso grupo o polimorfismo rs3755867 do gene *NFKB1* foi associado com diminuição de porcentagem de gordura corporal e aumento nos níveis de LDL-C em uma amostra de crianças que sofreram intervenção física (dados não publicados). Isso possivelmente se deve à composição da amostra, faixa etária e também ao possível efeito do exercício na modulação nos níveis inflamatórios e na potencialização da queima de gordura. Desta forma, é possível que o alelo G atue no aumento da expressão de *NFKB1* e, conseqüentemente na expressão p50, no entanto o efeito pode ser modulado por fatores como aumento na indução da resposta inflamatória por LPS, levando a maior expressão da subunidade p65 e formação do heterodímero p50/p65, aumentando a resposta inflamatória [33]. No entanto, na prática de atividade física regular, há mudança no perfil de citocinas e diminuição nos potenciais agentes indutores da inflamação, desta forma pode haver maior expressão do heterodímero p50/p50, o qual tem propriedades anti-inflamatórias.

O *SNP* rs3755867 é um *tag SNP* e está em DL com rs28362491, uma variante indel (inserção/deleção) de 4 bases (-94 ins/del ATTG) localizada na região promotora. Essa variante foi associada à predisposição a doenças cardíacas como aterosclerose [34], doença cardíaca congênita [35] e a diabetes tipo 2 [36]. Estes estudos mostraram uma maior frequência do alelo deleção (del) nos casos quando comparados aos controles. Possivelmente o alelo del está relacionado com menor expressão de *NFKB1* e conseqüentemente uma menor formação do homodímero p50/p50.

Em um estudo a combinação do genótipo GG do rs696 (*NFKBIA*) conjuntamente com genótipo ins/ins (inserção/inserção) de rs28362491 apresentou um efeito protetor ao desenvolvimento de tireoidite de Hashimoto [37]. Em nosso

estudo foi encontrada associação entre os portadores do genótipo TT de rs696 e do genótipo TT de rs3138053 (*NFKBIA*) com menores níveis de adiponectina na amostra de adultos. Adiponectina é uma adipocina secretada pelo tecido adiposo que tem papel na sensibilidade a insulina e cujos níveis são negativamente associados com a adiposidade. Além disso, níveis de adiponectina são inversamente relacionados aos níveis de inflamação e positivamente associadas aos níveis de I κ B [38]. Acredita-se que maior expressão de *NFKBIA* cause maior inibição de NF- κ B.

Portanto, hipotetizamos que os genótipos TT do rs696 e do rs3138053 do gene *NFKBIA* podem conferir uma menor expressão de *NFKBIA* nos tecidos, principalmente no tecido adiposo, culminando em uma maior expressão de NF- κ B levando a menores níveis de adiponectina.

Adiponectina também tem sido relacionada positivamente com níveis de HDL-C e negativamente com níveis de TG. Acredita-se que adiponectina reduz os níveis de triglicerídeos por aumentar o catabolismo do VLDL (lipoproteína de muito baixa densidade) sua principal função é induzir a expressão de LPL (lipoproteína lipase). LPL hidrolisa VLDL-TG e libera os ácidos graxos livres que serão utilizados pelo tecido esquelético, músculo cardíaco ou serão armazenados no tecido adiposo [39,40]. Portanto é possível que o efeito no aumento do LDL observado possa ser devido à diminuição dos níveis de adiponectina visto nos portadores do genótipo TT de rs3138053. Outra possibilidade é que tal efeito seja devido à ativação clássica de NF- κ B, de modo que portadores do genótipo TT do rs3138053 apresentariam uma menor expressão de *NFKBIA* levando a uma menor inibição de NF- κ B. Ativação de NF- κ B pode levar à transcrição de moléculas responsáveis pela biossíntese de colesterol, como SREBP1-a (*sterol regulatory element binding protein 1 a*). Seu papel no processo inflamatório já foi relacionado com ativação de componentes do sistema imune inato como o TLR4 (*Toll-like receptor 4*) e NLRP3 (*NOD-like receptor family pyrin domain-containing 3*) [41,42].

Além disso, o alelo T (CT+TT) do rs3138053 foi associado também a menores níveis de visfatina, outra adipocina. De modo inverso à adiponectina, maiores níveis de visfatina são relacionadas com maior adiposidade e inflamação [43]. Foi observado o papel estimulador da atividade transcricional de NF- κ B no tecido endotelial [44]. Portanto, seguindo na mesma direção seriam esperados maiores níveis de visfatina, considerando que a falta de inibição de NF- κ B induziria sua maior

produção. Adicionalmente, visfatina é secretada principalmente pelo tecido adiposo visceral e é possível que esta maior expressão seja observada em tecidos alvo, como órgãos endócrinos. Além disso, o genótipo CT pode ser responsável pela maior expressão de *NFKBIA* neste tecido.

Na amostra de crianças e adolescentes foi observado que portadores do alelo A do rs1800629 (*TNF*) apresentaram maiores níveis de TG. Este polimorfismo foi associado com doenças metabólicas, como diabetes tipo 2 [8]. O alelo A desse polimorfismo foi associado à resistência insulínica em pacientes obesos [45]. Karimi e colaboradores utilizando ensaio de gene repórter observaram que o alelo A foi responsável por maior expressão de *TNF* [9]. No entanto, em outro estudo, o alelo G de rs1800629 foi associado a maior TG pós-prandial em pacientes com síndrome metabólica que foram submetidos à intervenção nutricional (dieta mediterrânea) [46].

TNF e IL-6 têm sido relacionados com a fisiopatologia da obesidade e com o metabolismo de glicose e de lipídeos. Um experimento recente, realizado através de cultura de linfócitos T, mostrou a expressão de TNF como consequência de elevados níveis de TG [47]. Foi encontrado também uma relação direta com a quantidade de TG intramuscular e expressão de TNF [48]. Um estudo em modelo animal (hamster sírio – *Mesocricetus auratus*) apontou a relação de TNF com a estimulação da apolipoproteína apoB-48 intestinal, levando a uma maior circulação de TG, tanto em estado de jejum quanto em estado pós-prandial [49]. Apesar disso, a relação de TNF com a hiperlipidemia ainda é pouco elucidada. Considerando estas evidências, é possível que maiores níveis de TG observados nos portadores do alelo A do rs1800629, possam ser devidos à superexpressão de TNF, levando à ativação de componentes relacionados ao metabolismo lipídico, como as lipoproteínas, e ao consequentemente aumento nos níveis de colesterol e TG.

O genótipo GG do rs2069845 (*IL6*) foi associado com menor sensibilidade à insulina pelo índice QUICKI. Embora o papel da IL-6 no contexto da resistência a insulina ainda seja incerto, pela sua função pleiotrópica, é possível que tenha tanto papel pro-inflamatório quanto anti-inflamatório. Um papel imunorregulatório de IL-6 tem sido sugerido [14]. Apesar de vários trabalhos priorizarem o seu papel inflamatório, recentes evidências têm demonstrado o seu papel na regulação dos perfis de macrófagos. No contexto de homeostase metabólica IL-6 potencializou a expressão de macrófagos de perfil M2 (anti-inflamatório) mediada por IL-4 (citocina anti-inflamatória) potencializando a tolerância a glicose. Camundongos IL-6 *knockout*

desenvolveram resistência insulínica em uma dieta de alto teor lipídico [10]. Dessa forma, é possível que os portadores do alelo A do rs2069845 tenham menor expressão de IL-6 tecidual, levando a um contexto anti-inflamatório e, por consequência uma melhor tolerância a glicose nos tecidos. Além disso, o polimorfismo rs2069845, que se encontra na região intrônica do gene *IL6*, é um *tag SNP* e pode estar em DL com a variante causal. Uma possível variante seria a rs1800795 ($D'=0,95$ e $r^2=0,86$) que se encontra na região promotora do gene. O genótipo GG foi associado com o risco aumentado de diabetes tipo 2 em um estudo de meta análise. Possivelmente, o polimorfismo afeta a transcrição de IL-6 prejudicando sua expressão, por consequência, uma menor sensibilidade a insulina [50].

5 CONCLUSÃO

No presente estudo, observamos associação de polimorfismos em *NFKB1*, *NFKBIA*, *IL6* e *TNF* com variáveis antropométricas (IMC e quadril) e bioquímicas (adiponectina, visfatina, TG e QUICKI). Moléculas codificadas por estes genes têm sido relacionados ao contexto metabólico, como por exemplo, IL-6 e TNF, as quais são encontradas em maiores níveis em pacientes obesos. O regulador chave da resposta inflamatória, o fator transcricional NF- κ B é frequentemente ativado frente a estímulos externos, como componentes da dieta.

Quanto aos nossos achados é possível que, portadores dos genótipos relacionados ao perfil anti-inflamatório apresentem melhor resposta frente ao excesso de consumo de nutrientes potencialmente indutores da resposta inflamatória como lipídeos e açúcar, apresentando menores níveis de colesterol e glucose circulantes bem como menores valores antropométricos.

Apesar das limitações deste estudo como o tamanho amostral reduzido e ausência de mensuração de marcadores inflamatórios, os quais reduzem o poder estatístico, foi possível observar a influência dos genes codificadores de componentes inflamatórios *NFKB1*, *NFKBIA*, *TNF* e *IL6* sobre os níveis de adipocinas, variáveis antropométricas, lipídicas e de resistência insulínica. Estas associações podem ajudar a compreender os efeitos dos marcadores inflamatórios sobre componentes do metabolismo e auxiliar em novas terapias.

REFERÊNCIAS

1. Stern JH, Rutkowski JM, Scherer PE. Adiponectin, leptin, and fatty acids in the maintenance of metabolic homeostasis through adipose tissue crosstalk. *Cell Metab.* 2016;23:770–84.
2. Choe SS, Huh JY, Hwang IJ, Kim JI, Kim JB. Adipose tissue remodeling: Its role in energy metabolism and metabolic disorders. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2016;7:1–16.
3. Chouchani ET, Kajimura S. Metabolic adaptation and maladaptation in adipose tissue. *Nat Metab.* 2019;1:189–200.
4. Hotamisligil GS. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. *Nature.* 2017;542:177–85.
5. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : Direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* (80-). 1993;259:87–91.
6. Dicker A, van Harmelen V, Rydén M, Langin D, Laurencikiene J, Blomqvist L, et al. NF- κ B is important for TNF- α -induced lipolysis in human adipocytes. *J Lipid Res.* 2007;48:1069–77.
7. Antonicelli R, Olivieri F, Cavallone L, Spazzafumo L, Bonafe M, Marchegiani F, et al. Tumor necrosis factor-alpha gene -308G>A polymorphism is associated with ST-elevation myocardial infarction and with high plasma levels of biochemical ischemia markers. *Coron Artery Dis.* 2005;16:489–93.
8. Golshani H, Haghani K, Dousti M, Bakhtiyari S. Association of TNF-alpha 308 G/A Polymorphism with Type 2 Diabetes: A Case-Control Study in the Iranian Kurdish Ethnic Group. *Osong public Heal Res Perspect.* 2015;6:94–9.
9. Karimi M, Goldie LC, Cruickshank MN, Moses EK, Abraham LJ. A critical assessment of the factors affecting reporter gene assays for promoter SNP function: a reassessment of -308 TNF polymorphism function using a novel integrated reporter system. *Eur J Hum Genet.* 2009;17:1454–62.
10. Mauer J, Chaurasia B, Goldau J, Vogt MC, Ruud J, Nguyen KD, et al. Signaling by IL-6 promotes alternative activation of macrophages to limit endotoxemia and obesity-

associated resistance to insulin. *Nat Immunol*. 2014;15:423–30.

11. Kim HJ, Higashimori T, Park SY, Choi H, Dong J, Kim YJ, et al. Differential Effects of Interleukin-6 and -10 on Skeletal Muscle and Liver Insulin Action In Vivo. *Diabetes*. 2004;53:1060–7.

12. Wallenius V, Wallenius K, Ahren B, Rudling M, Carlsten H, Dickson SL, et al. Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. *Nat Med*. United States; 2002;8:75–9.

13. Pedersen BK, Febbraio MA. Point : Counterpoint Interleukin-6 does / does not have a beneficial role in insulin sensitivity and glucose homeostasis. *J Appl Physiol*. 2007;102:814–9.

14. Covarrubias AJ, Horng T. Previews IL-6 Strikes a Balance in Metabolic Inflammation. *Cell Metab* [Internet]. Elsevier Inc.; 2014;19:898–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2014.05.009>

15. Santa U De. Association of IL-6 and CRP gene polymorphisms with obesity and metabolic disorders in children and adolescents. 2015. p. 915–24.

16. Joffe YT, van der Merwe L, Evans J, Collins M, Lambert E V., September A V., et al. Interleukin-6 gene polymorphisms, dietary fat intake, obesity and serum lipid concentrations in black and white South African Women. *Nutrients*. 2014;6:2436–65.

17. Baker RG, Hayden MS, Ghosh S. NF- κ B, inflammation, and metabolic disease. *Cell Metab*. 2011;13:11–22.

18. Tornatore L, Thotakura AK, Bennett J, Moretti M. The nuclear factor kappa B signaling pathway : integrating metabolism with inflammation. *Trends Cell Biol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012;22:557–66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2012.08.001>

19. Seidi A, Mirzaahmadi S, Mahmoodi K, Soleiman-Soltanpour M. The association between NFKB1 -94ATTG ins/del and NFKB1A 826C/T genetic variations and coronary artery disease risk. *Mol Biol Res Commun*. Iran; 2018;7:17–24.

20. Lai H, Li X, Yang Y, Ma Y, Xu R, Pan S. Genetic Variation in NFKB1 and NFKBIA and

Susceptibility to Coronary Artery Disease in a Chinese Uygur Population. 2015;1–14.

21. Bank S, Skytt Andersen P, Burisch J, Pedersen N, Roug S, Galsgaard J, et al. Polymorphisms in the inflammatory pathway genes TLR2, TLR4, TLR9, LY96, NFKBIA, NFKB1, TNFA, TNFRSF1A, IL6R, IL10, IL23R, PTPN22, and PPARG are associated with susceptibility of inflammatory bowel disease in a Danish cohort. PLoS One. 2014;9.

22. Lopez-Castejon G, Brough D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. Cytokine Growth Factor Rev. 2011. p. 189–95.

23. Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis: Host cell death and inflammation. Nat. Rev. Microbiol. 2009. p. 99–109.

24. Vargas-Alarcón G, Cruz-López M, Valladares A, Álvarez-León E, Juárez-Cedillo T, Pérez-Méndez Ó, et al. The interleukin-1 β -511 T>C (rs16944) gene polymorphism is associated with risk of developing silent myocardial ischemia in diabetic patients. Immunol Lett. 2015;168:7–12.

25. Luotola K, Paakkonen R, Alanne M, Lanki T, Moilanen L, Surakka I, et al. Association of variation in the interleukin-1 gene family with diabetes and glucose homeostasis. J Clin Endocrinol Metab. 2009;94:4575–83.

26. Carter KW, Hung J, Powell BL, Wiltshire S, Foo BTX, Leow YC, et al. Association of Interleukin-1 gene polymorphisms with central obesity and metabolic syndrome in a coronary heart disease population. Hum Genet. 2008;124:199–206.

27. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski a S, Naylor B a, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. Diabetologia. 1985;28:412–9.

28. Katz A, Nambi SS, Mather K, Baron AD, Follmann DA, Sullivan G, et al. Quantitative Insulin Sensitivity Check Index : A Simple, Accurate Method for Assessing Insulin Sensitivity In Humans. J Clin Endocrinol Metab. 2000;85:2402–10.

29. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: Analysis and visualization of LD and haplotype maps. Bioinformatics. 2005;21:263–5.

30. 1000 Genomes Project [Internet]. [cited 2016 Jul 2]. Available from:

<http://www.internationalgenome.org>

31. Lahiri DK, Nurnberger JI. A rapid no-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP analysis. *Nucleic Acids Res.* 1991;19:5444.
32. Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, et al. The Structure of Haplotype Blocks in the Human Genome. *Science* (80-) [Internet]. 2002;296:2225 LP – 2229. Available from: <http://science.sciencemag.org/content/296/5576/2225.abstract>
33. He M, Zhang W, Dong Y, Wang L, Fang T, Tang W, et al. Pro-inflammation NF- κ B signaling triggers a positive feedback via enhancing cholesterol accumulation in liver cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res.* 2017;36.
34. Lai H, Chen Q, Li X, Ma Y, Xu R, Zhai H, et al. Association between genetic polymorphism in NFKB1 and NFKBIA and coronary artery disease in a Chinese Han population. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8:21487–96.
35. Zhang D, Li L, Zhu Y, Zhao L, Wan L, Lv J, et al. The NFKB1 -94 ATTG insertion/deletion polymorphism (rs28362491) contributes to the susceptibility of congenital heart disease in a Chinese population. *Gene. Netherlands;* 2013;516:307–10.
36. E. C, C. D-C, S. T, J. G, B. A, S. I, et al. Gene variants in the NF-KB pathway (NFKB1, NFKBIA, NFKBIZ) and their association with type 2 diabetes and impaired renal function. *Hum Immunol* [Internet]. 2018;79:494–8. Available from: <http://www.elsevier.com/locate/humimm%0Ahttp://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emexb&NEWS=N&AN=2000610170>
37. Koc A, Batar B, Celik O, Onaran I, Tasan E, Sultuybek GK. Polymorphism of the NFKB1 affects the serum inflammatory levels of IL-6 in Hashimoto thyroiditis in a Turkish population. *Immunobiology* [Internet]. Elsevier GmbH.; 2014;219:531–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2014.03.009>
38. Zamboni M, Di Francesco V, Garbin U, Fratta Pasini A, Mazzali G, Stranieri C, et al. Adiponectin gene expression and adipocyte NF-kappaB transcriptional activity in elderly overweight and obese women: inter-relationships with fat distribution, hs-CRP, leptin and insulin resistance. *Int J Obes (Lond).* England; 2007;31:1104–9.

39. Qiao L, Zou C, Van Der Westhuyzen DR, Shao J. Adiponectin reduces plasma triglyceride by increasing VLDL triglyceride catabolism. *Diabetes*. 2008;57:1824–33.
40. Christou GA, Kiortsis DN. Adiponectin and lipoprotein metabolism. *Obes Rev*. England; 2013;14:939–49.
41. Oishi Y, Spann NJ, Link VM, Muse ED, Strid T, Edillor C, et al. SREBP1 Contributes to Resolution of Pro-inflammatory TLR4 Signaling by Reprogramming Fatty Acid Metabolism. *Cell Metab*. 2017;25:412–27.
42. Shimano H, Sato R. SREBP-regulated lipid metabolism: Convergent physiology-divergent pathophysiology. *Nat. Rev. Endocrinol*. 2017. p. 710–30.
43. Lee W-J, Wu C-S, Lin H, Lee I-T, Wu C-M, Tseng J-J, et al. Visfatin-induced expression of inflammatory mediators in human endothelial cells through the NF-kappaB pathway. *Int J Obes (Lond)*. England; 2009;33:465–72.
44. Adya R, Tan BK, Chen J, Randeva HS. Nuclear factor-kb induction by visfatin in human vascular endothelial cells. *Diabetes Care*. 2008;31:758–60.
45. Dalziel B, Gosby AK, Richman RM, Bryson JM, Caterson ID. Association of the TNF-alpha -308 G/A promoter polymorphism with insulin resistance in obesity. *Obes Res*. United States; 2002;10:401–7.
46. Gomez-Delgado F, Alcala-Diaz JF, Garcia-Rios A, Delgado-Lista J, Ortiz-Morales A, Rangel-Zuniga O, et al. Polymorphism at the TNF-alpha gene interacts with Mediterranean diet to influence triglyceride metabolism and inflammation status in metabolic syndrome patients: from the CORDIOPREV clinical trial. *Mol Nutr Food Res*. 2014;58:1519–27.
47. Lim J, Yang EJ, Chang JH. Upregulation of TNF- α by Triglycerides is Mediated by MEK1 Activation in Jurkat T Cells. *Biomed Sci Lett*. 2018;24:213–20.
48. Mingrone G, Rosa G, Di Rocco P, Manco M, Capristo E, Castagneto M, et al. Skeletal muscle triglycerides lowering is associated with net improvement of insulin sensitivity, TNF- α reduction and GLUT4 expression enhancement. *Int J Obes*. 2002;26:1165–72.
49. Qin B, Qiu W, Avramoglu RK, Adeli K. Tumor necrosis factor- α induces intestinal

insulin resistance and stimulates the overproduction of intestinal apolipoprotein b48-containing lipoproteins. *Diabetes*. 2007;56:450–61.

50. Qi L, van Dam RM, Meigs JB, Manson JAE, Hunter D, Hu FB. Genetic variation in IL6 gene and type 2 diabetes: Tagging-SNP haplotype analysis in large-scale case-control study and meta-analysis. *Hum Mol Genet*. 2006;15:1914–20.

6 DISCUSSÃO GERAL

O papel desempenhado pelos componentes do sistema imune vai muito além do combate a patógenos, pois seus componentes são responsáveis pela manutenção da homeostase do indivíduo, incluindo a energética e a metabólica. Sabe-se que diversos fatores ambientais são responsáveis pela ativação da resposta imune: alterações nos componentes bioquímicos, ocasionados por componentes da dieta, como excesso no consumo de AGS.

No presente estudo, avaliamos polimorfismos em genes codificadores de potenciais componentes da resposta imune e os perfis antropométricos e bioquímicos em duas amostras independentes. Primeiramente, analisamos os polimorfismos nos genes pertencentes à via dos receptores do sistema imune inato, TLR e NLR (inflamossomo). As variantes nos genes *TLR2* mostraram influenciar o metabolismo lipídico, especialmente no aumento nos níveis de HDL-C (rs13105517) e de CT (rs3804099). Além disso, influenciaram na resposta ao exercício, quanto à redução do IMC (rs13105517), na melhoria da sensibilidade a insulina (rs13105517) e diminuição nos níveis de TG (rs3804099). As variantes do gene *TLR4* foram associadas aos níveis de LDL-C (rs1554973), e na redução do IMC (rs1927911 e rs1554973) e na melhoria da sensibilidade a insulina (rs1927911). TLRs, principalmente *TLR4*, são considerados sensores de nutrientes, capazes de desencadear a resposta inflamatória, afetando os metabolismos de lipídeos, glicose e influenciando na massa corporal. Além disso, LDL modificado parece induzir a expressão de *TLR4* em macrófagos que participam na formação das células espumosas (HOWELL et al., 2011). Expressão de *TLR2* e *TLR4* foram associadas com hiperlipidemia em humanos e em camundongos (ZHU et al., 2015).

Variantes no gene *NLRC4*, mostraram influenciar na diminuição nos níveis de TG (rs455060), nos níveis de insulina (rs212704 e rs455060) e na melhoria na sensibilidade a insulina (rs212704). E também no aumento do percentual de gordura corporal em resposta ao exercício, influenciando na adiposidade (rs385076 e rs455060). O inflamossomo *NLRC4* já foi associado ao câncer de mama relacionado a obesidade e o SNP rs385076 foi associado ao aumento de IL-18 e a relação com doença cardiovascular (ZELLER et al., 2015). Polimorfismos no gene *CARD8* foram associados aos níveis de glicose (rs7258674) em ambas as amostras. E no aumento

nos níveis de HDL-C (rs7258674) e na diminuição nos níveis de TG (rs6509366) em resposta ao exercício, afetando o metabolismo lipídico. O polimorfismo rs6671879 (*NEK7*) apresentou, principalmente, influência no aumento nos níveis de LDL-C e CT e na diminuição nos níveis de TG e de glicose no processo de intervenção física, sugerindo um possível efeito no metabolismo lipídico e de glicose. Ativação do inflamossomo promove a resposta inflamatória, através de liberação de IL-1 β e IL-18, sendo relacionado com alguns distúrbios metabólicos. O principal envolvido é inflamossomo NLRP3, que, assim como TLR4, pode agir como sensor de nutrientes e ativar a resposta através de componentes lipídicos como cristais de colesterol (DUEWELL et al., 2010). Sua atividade é regulada negativamente por CARD8 (ITO; HARA; KUBOTA, 2014) e positivamente por NEK7 (HE et al., 2016).

Polimorfismos em genes codificantes de componentes da via de NF- κ B e das citocinas pró-inflamatórias também apresentaram influência nos parâmetros bioquímicos e antropométricos. O polimorfismo rs3755867 do gene *NFKB1* foi associado ao maior IMC e circunferência de quadril, e com maior redução na gordura corporal e maiores níveis de LDL-C em resposta a intervenção física. Polimorfismo *NFKBIA* foi associado aos maiores níveis de TG, visfatina (rs3138053) e adiponectina (rs3138053 e rs696) e a maior redução dos níveis de glicose (rs3138053) na resposta ao exercício. Variante rs2069845 do gene *IL-6*, foi associada a menor sensibilidade à insulina (QUICKI) e na menor redução nos níveis de LDL-C e CT em resposta à intervenção física. Polimorfismo rs1800629 (*TNF*) foi associado aos níveis de TG na diferença de IMC (exercício físico). SNP rs3917356 (*IL1B*) apresentou influência na menor redução de percentual de gordura. Ativação da via de NF- κ B, através do reconhecimento dos receptores do sistema imune inato ou através das citocinas, leva a transcrição de genes relacionados a resposta inflamatória e a liberação de ainda mais citocinas pró-inflamatórias, gerando uma cascata de ativação. Polimorfismos no gene *NFKB1* e no inibidor *NFKBIA* podem levar a maior transcrição de genes pró-inflamatórios como os que codificam as citocinas TNF, IL-6 e IL-1 β . Componentes do metabolismo lipídico e de glicose podem ser responsáveis pelo desencadeamento da resposta inflamatória. Além disso, NF κ B e TNF são previstos para aumentarem a expressão de LPL e a atividade de lipólise, afetando o metabolismo lipídico e podendo afetar os parâmetros antropométricos (DICKER et al., 2007). IL-6 participa do metabolismo

lipídico de várias formas, diminuindo a expressão de apolipoproteínas e também aumentando a expressão de AMPK, estimulando a oxidação de ácidos graxos e aumentando a absorção de glicose (HASHIZUME; MIHARA, 2011; PEDERSEN; FEBBRAIO, 2007). E, por fim, IL-1 β que parece exercer uma função no aumento do tecido adiposo levando ao aumento do acúmulo de gordura nos tecidos ectópicos (NOV et al., 2013).

Considerando essas evidências que relacionam sistema imune e metabolismo, é possível hipotetizar que através dos componentes da dieta a resposta seja ativada em indivíduos portadores de polimorfismos relacionados a um perfil pró-inflamatório, ou ainda, portadores dos polimorfismos com este perfil podem ser suscetíveis à ativação da resposta. Esta pode levar a um efeito nos perfis lipídicos e de glicose, ou ainda a uma resistência aos efeitos na redução nos parâmetros bioquímicos e antropométricos durante o exercício físico. O aumento na resposta inflamatória pode ser responsável pelo desencadeamento de diversas doenças metabólicas como aterosclerose, doença do fígado gorduroso não alcoólico, e da resistência insulínica, podendo levar ao desenvolvimento da diabetes tipo 2.

Finalmente, as associações encontradas no presente estudo podem servir de base para futuras investigações que relacionem os polimorfismos estudados com aumento na expressão de citocinas ou ainda, que relacionem alterações na expressão gênica, polimorfismos em genes codificadores de componentes inflamatórios e parâmetros metabólicos.

7 CONCLUSÕES

- IMC e a circunferência de quadril em adultos foram influenciadas por rs3755867 (*NFKB1*).
- A diferença no IMC em resposta ao exercício foi influenciada pelo rs13105517 (*TLR2*); rs1927911, rs1554973 (*TLR4*) e rs1800629 (*TNF*).
- A diferença do percentual de gordura corporal foi influenciada por rs3755867 (*NFKB1*), rs3917356 (*IL1B*); rs385076 e rs455060 (*NLRC4*).
- Os níveis de glicose foram influenciados por rs7258674 (*CARD8*) em adultos e crianças e adolescentes
- A diferença nos níveis de glicose em resposta ao exercício foi influenciada por rs3138053 (*NFkBIA*) e rs6671879 (*NEK7*).
- A diferença no valor de HOMA-IR foi influenciada por rs13105517 (*TLR2*) e por rs1927911 (*TLR4*).
- Valores de QUICKI foram influenciados por rs212704 (*NLRC4*) e rs2069845 (*IL-6*).
- A diferença nos valores de QUICKI em resposta ao exercício foi influenciada por rs13105517 (*TLR2*).
- Níveis de insulina foram influenciados por rs212704 (*NLRC4*) e rs455060 (*NLRC4*) na amostra de crianças e adolescentes.
- Os níveis de LDL-C foram influenciados por rs1554973 (*TLR4*) e rs6671879 (*NEK7*).
- A diferença nos níveis de LDL-C em resposta ao exercício foi influenciada por rs2069845 (*IL-6*) e rs3755867 (*NFkB1*).
- Os níveis de HDL-C foram influenciados por rs13105517 (*TLR2*).
- A diferença nos níveis de HDL-C em resposta ao exercício foi influenciada por rs7258674 (*CARD8*).
- Os níveis de CT foram influenciados por rs3804099 (*TLR2*) e rs6671879 (*NEK7*).
- Diferença nos níveis de CT foi influenciado por rs2069845 (*IL-6*).
- Os níveis de TG foram influenciados por rs1800629 (*TNF*) e rs3138053 (*NFkBIA*).

- A diferença nos níveis de TG foi influenciado por rs3804099 (*TLR2*), rs6509366 (*CARD8*) e rs6671879 (*NEK7*).
- Os níveis de adiponectina foram influenciados por rs3138053 (*NFκBIA*) e por rs696 (*NFκBIA*) e os níveis de visfatina por rs3138053 (*NFκBIA*).
- De modo geral, foi possível observar o efeito dos polimorfismos nas variáveis relacionados ao metabolismo lipídico, de glicose e nas variáveis antropométricas e o seu efeito na resposta ao exercício.

REFERÊNCIAS

- ABBATE, A. et al. Effects of interleukin-1 blockade with anakinra on adverse cardiac remodeling and heart failure after acute myocardial infarction (Virginia Commonwealth University-Anakinra Remodeling Trial [VCU-ART2] pilot study). **The American journal of cardiology**, v. 111, n. 10, p. 1394–1400, 2013.
- AGRAWAL, N. et al. The Drosophila TNF Eiger is an adipokine that acts on insulin-producing cells to mediate nutrient response. **Cell Metabolism**, v. 23, n. 4, p. 675–684, 2016.
- AHMAD, R. et al. Elevated expression of the toll like receptors 2 and 4 in obese individuals: its significance for obesity-induced inflammation. **Journal of inflammation**, v. 9, n. 1, p. 48, 2012.
- ALI, S. et al. Functional genetic variation in NFKBIA and susceptibility to childhood asthma, bronchiolitis, and bronchopulmonary dysplasia. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 8, p. 3949–3958, 2013.
- ALISSA, E. M. et al. Role of omentin-1 and C-reactive protein in obese subjects with subclinical inflammation. **Journal of Clinical and Translational Endocrinology**, v. 3, p. 7–11, 2016.
- ANTONICELLI, R. et al. Tumor necrosis factor-alpha gene -308G>A polymorphism is associated with ST-elevation myocardial infarction and with high plasma levels of biochemical ischemia markers. **Coronary artery disease**, v. 16, n. 8, p. 489–493, 2005.
- ARINGER, M.; SMOLEN, J. S. The role of tumor necrosis factor-alpha in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Research and Therapy**, v. 10, n. 202, p. 1–8, 2008.
- BAGNALL, R. D. et al. Novel isoforms of the CARD8 (TUCAN) gene evade a nonsense mutation. **European Journal Of Human Genetics**, v. 16, p. 619, 2008.
- BAI, H. et al. Association between interleukin 10 gene polymorphisms and risk of type 2 diabetes mellitus in a Chinese population. **Journal of International Medical Research**, v. 42, n. 3, p. 702–710, 2014.
- BAKER, R. G.; HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. NF- κ B, inflammation, and metabolic

disease. **Cell Metabolism**, v. 13, n. 1, p. 11–22, 2011.

BANK, S. et al. Polymorphisms in the inflammatory pathway genes TLR2, TLR4, TLR9, LY96, NFKBIA, NFKB1, TNFA, TNFRSF1A, IL6R, IL10, IL23R, PTPN22, and PPARG are associated with susceptibility of inflammatory bowel disease in a Danish cohort. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, 2014.

BENATTI, F. B.; PEDERSEN, B. K. Exercise as an anti-inflammatory therapy for rheumatic diseases - Myokine regulation. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 11, n. 2, p. 86–97, 2015.

BOUCHIER-HAYES, L. et al. CARDINAL, a novel caspase recruitment domain protein, is an inhibitor of multiple NF- κ B activation pathways. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 47, p. 44069–44077, 2001.

BRAND, E. et al. Tumor necrosis factor alpha -308 G/A polymorphism in obese caucasians. **International Journal of Obesity**, v. 7308, 2001.

CASTOLDI, Angela et al. The macrophage switch in obesity development. **Frontiers in Immunology**, v. 6, p. 1–11, 2016.

CHEN, Y. et al. CARD8 rs2043211 polymorphism is associated with gout in a chinese male population. **Cellular physiology and biochemistry**, Germany, v. 35, n. 4, p. 1394–1400, 2015 a.

CHEN, Y. et al. The NFKB1 polymorphism (rs4648068) is associated with the cell proliferation and motility in gastric cancer. **BMC Gastroenterology**, v. 15, n. 1, 2015 b.

CHENG, S. C.; JOOSTEN, L. A.; NETEA, M. G. The interplay between central metabolism and innate immune responses. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 25, n. 6, p. 707–713, 2014.

CHOE, S. S. et al. Adipose tissue remodeling: Its role in energy metabolism and metabolic disorders. **Frontiers in Endocrinology**, v. 7, p. 1–16, 2016.

CHRISTOU, G. A.; KIORTSIS, D. N. Adiponectin and lipoprotein metabolism. **Obesity Reviews**, England, v. 14, n. 12, p. 939–949, 2013.

CONFORTI-ANDREONI, C.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; MORTELLARO, A. The inflammasomes in health and disease : from genetics to molecular mechanisms of autoinflammation and beyond. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 8, n. 2, p. 135–145, 2011.

COVARRUBIAS, A. J.; HORNG, T. IL-6 strikes a balance in metabolic inflammation. **Cell Metabolism**, v. 19, n. 6, p. 898–899, 2014.

CUI, H.; LÓPEZ, M.; RAHMOUNI, K. The cellular and molecular bases of leptin and ghrelin resistance in obesity. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 13, n. 6, p. 338–351, 2017.

DAYER, J. M.; OLIVIERO, F.; PUNZI, L. A brief history of IL-1 and IL-1 Ra in rheumatology. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, 2017.

DELGADO-LISTA, J. et al. Interleukin 1B variant -1473G/C (rs1143623) influences triglyceride and interleukin 6 metabolism. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 96, n. 5, p. E816-20, 2011.

DIANGELO, J. R. et al. The immune response attenuates growth and nutrient storage in Drosophila by reducing insulin signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 49, p. 20853–20858, 2009.

DICKER, A. et al. NF- κ B is important for TNF- α -induced lipolysis in human adipocytes. **Journal of Lipid Research**, v. 48, n. 5, p. 1069–1077, 2007.

DINARELLO, C. A. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. **Immunological Reviews**, v. 281, n. 1, p. 8–27, 2018.

DONATH, M. Y.; BÖNI-SCHNETZLER, M. IL-1 β activation as a response to metabolic disturbances. **Cell Metabolism**, v. 12, n. 5, p. 427–428, 2010.

DUEWELL, P. et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals that form early in disease. **Nature**, v. 464, n. 7293, p. 1357–1361, 2010.

ENQUOBAHRIE, D. A. et al. Cholesterol ester transfer protein, interleukin-8, peroxisome proliferator activator receptor alpha, and Toll-like receptor 4 genetic variations and risk of incident nonfatal myocardial infarction and ischemic stroke. **The**

American journal of cardiology, v. 101, n. 12, p. 1683–1688, 2008.

ETOKEBE, G. E. et al. Toll-like receptor 2 (P631H) mutant impairs membrane internalization and is a dominant negative allele. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 71, n. 5, p. 369–381, 2010.

FERREIRA, A. C. et al. NOD2/CARD15 and TNFA, but not IL1B and IL1RN, are associated with Crohn's disease. **Inflammatory bowel diseases**, England, v. 11, n. 4, p. 331–339, 2005.

FRY, A. M. et al. Cell cycle regulation by the NEK family of protein kinases. **Journal of cell science**, v. 125, p. 4423–4433, 2012.

GEORGEL, P.; MACQUIN, C.; BAHRAM, S. The heterogeneous allelic repertoire of human toll-like receptor (TLR) genes. **PLoS ONE**, v. 4, n. 11, p. 1–11, 2009.

GOLSHANI, H. et al. Association of TNF-alpha 308 G/A Polymorphism with Type 2 Diabetes: A Case-Control Study in the Iranian Kurdish Ethnic Group. **Osong public health and research perspectives**, v. 6, n. 2, p. 94–99, 2015.

GOMEZ-DELGADO, F. et al. Polymorphism at the TNF-alpha gene interacts with Mediterranean diet to influence triglyceride metabolism and inflammation status in metabolic syndrome patients: from the CORDIOPREV clinical trial. **Molecular nutrition & food research**, v. 58, n. 7, p. 1519–1527, 2014.

GOTEA, V. et al. The functional relevance of somatic synonymous mutations in melanoma and other cancers. **Pigment Cell and Melanoma Research**, v. 28, n. 6, p. 673–684, 2015.

GOURANTON, E. et al. Visfatin is involved in TNFalpha-mediated insulin resistance via an NAD(+)/Sirt1/PTP1B pathway in 3T3-L1 adipocytes. **Adipocyte**, v. 3, n. 3, p. 180–189, 2014.

GOYENECHEA, E.; PARRA, D.; MARTÍNEZ, J. A. Impact of interleukin 6 -174G>C polymorphism on obesity-related metabolic disorders in people with excess in body weight. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 56, n. 12, p. 1643–1648, 2007.

GREEN, A. et al. Stimulation of Lipolysis by Tumor Necrosis Factor- α in 3T3-L1 Adipocytes Is Glucose Dependent: Implications for Long-Term Regulation of

Lipolysis. **Diabetes**, v. 53, n. 1, p. 74–81, 2004.

GUO, H.; CALLAWAY, J. B.; TING, J. P. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. **Nature medicine**, v. 21, n. 7, p. 677–687, 2015.

HAMEED, I. et al. Genetic variations in key inflammatory cytokines exacerbates the risk of diabetic nephropathy by influencing the gene expression. **Gene**, v. 661, p. 51–59, 2018.

HASHIZUME, M.; MIHARA, M. IL-6 and lipid metabolism. **Inflammation and Regeneration**, v. 31, n. 3, p. 325–333, 2011.

HASHIZUME, M.; MIHARA, M. Atherogenic effects of TNF- α and IL-6 via up-regulation of scavenger receptors. **Cytokine**, v. 58, n. 3, p. 424–430, 2012.

HE, Y. et al. NEK7 is an essential mediator of NLRP3 activation downstream of potassium efflux. **Nature**, v. 530, n. 7590, p. 354–357, 2016.

HE, Y.; HARA, H.; NÚÑEZ, G. Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 41, n. 12, p. 1012–1021, 2016.

HORIUCHI, T. et al. Transmembrane TNF- α : Structure, function and interaction with anti-TNF agents. **Rheumatology**, v. 49, n. 7, p. 1215–1228, 2010.

HOTAMISLIGIL, G. S. et al. Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 11, p. 4854–4858, 1994.

HOTAMISLIGIL, G. S. et al. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, v. 95, n. 5, p. 2409–2415, 1995.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 860–867, 2006.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. **Nature**, v. 542, n. 7640, p. 177–185, 2017.

HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : Direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, v.

259, n. 5091, p. 87–91, 1993.

HOWELL, K. W. et al. Toll-like receptor 4 mediates oxidized LDL-induced macrophage differentiation to foam cells. **Journal of Surgical Research**, v. 171, n. 1, 2011.

HUANG, W. H. et al. Association of TLR2 and TLR4 non-missense single nucleotide polymorphisms with type 2 diabetes risk in a Southern Chinese population: A case-control study. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 3, p. 8694–8705, 2015.

HUYNH, F. K. et al. A role for hepatic leptin signaling in lipid metabolism via altered very low density lipoprotein composition and liver lipase activity in mice. **Hepatology**, v. 57, n. 2, p. 543–554, 2013.

IANNITTI, R. G. et al. IL-1 receptor antagonist ameliorates inflammasome-dependent inflammation in murine and human cystic fibrosis. **Nature communications**, v. 7, n. 10791, p. 1–16, 2016.

ILLIG, T. et al. Significant association of the interleukin-6 gene polymorphisms C-174G and A-598G with type 2 diabetes. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 89, n. 10, p. 5053–5058, 2004.

ITO, S.; HARA, Y.; KUBOTA, T. CARD8 is a negative regulator for NLRP3 inflammasome, but mutant NLRP3 in cryopyrin-associated periodic syndromes escapes the restriction. **Arthritis Research and Therapy**, v. 16, n. 1, p. 1–11, 2014.

JIANG, Y. et al. Resistin induces hypertension and insulin resistance in mice via a TLR4-dependent pathway. **Scientific Reports**, v. 6, 2016.

JIN, C.; HENAO-MEJIA, J.; FLAVELL, R. A. Innate immune receptors: Key regulators of metabolic disease progression. **Cell Metabolism**, v. 17, n. 6, p. 873–882, 2013.

KARBAN, A. S. et al. Functional annotation of a novel NFkB1 promoter polymorphism that increases risk for ulcerative colitis. **Human molecular genetics**, v. 13, n. 1, p. 35–45, 2004.

KARIMI, M. et al. A critical assessment of the factors affecting reporter gene assays for promoter SNP function: a reassessment of -308 TNF polymorphism function using a novel integrated reporter system. **European Journal of Human Genetics**, v. 17, n.

11, p. 1454–1462, 2009.

KEDDIE, S. et al. Cryopyrin-Associated Periodic Fever Syndrome and the Nervous System. **Current treatment options in neurology**, v. 20, n. 10, p. 43, 2018.

KERN, L. et al. Obesity-induced TNF α and IL-6 signaling: The missing link between obesity and inflammation- driven liver and colorectal cancers. **Cancers**, v. 11, n. 1, 2019.

KIECHL, S. et al. Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. **The New England journal of medicine**, v. 347, n. 3, p. 185–192, 2002.

KOLB, R. et al. Obesity-associated NLRC4 inflammasome activation drives breast cancer progression. **Nature Communications**, v. 7, p. 1–12, 2016.

KÖNNER, A. C.; BRÜNING, J. C. Toll-like receptors: linking inflammation to metabolism. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 22, n. 1, p. 16–23, 2011.

KUTIKHIN, A. G. et al. Association of TLR and TREM-1 gene polymorphisms with atherosclerosis severity in a Russian population. **Meta Gene**, v. 9, p. 76–89, 2016.

LACKEY, D. E.; OLEFSKY, J. M. Regulation of metabolism by the innate immune system. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 12, n. 1, p. 15–28, 2015.

LAGO, F. et al. Adipokines as novel modulators of lipid metabolism. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 34, n. 10, p. 500–510, 2009.

LEE, Y. S.; WOLLAM, J.; OLEFSKY, J. M. An Integrated View of Immunometabolism. **Cell**, v. 172, n. 1–2, p. 22–40, 2018.

LESNA, J. et al. Omentin-1 plasma levels and cholesterol metabolism in obese patients with diabetes mellitus type 1: impact of weight reduction. **Nutrition & diabetes**, v. 5, n. e183, p. 1–6, 2015.

LI, D. et al. Association of NFKB1 and NFKBIA gene polymorphisms with susceptibility of gastric cancer. **Tumor Biology**, v. 39, n. 7, p. 1–6, 2017.

LING, P. R. et al. Effects of systemic infusions of endotoxin, tumor necrosis factor, and interleukin-1 on glucose metabolism in the rat: relationship to endogenous glucose production and peripheral tissue glucose uptake. **Metabolism**, v. 43, n. 3, p.

279–284, 1994.

LIU, T. et al. NF- κ B signaling in inflammation. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 2, p. 17023, 2017.

LUOTOLA, K. et al. Association of variation in the interleukin-1 gene family with diabetes and glucose homeostasis. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 94, n. 11, p. 4575–4583, 2009.

MA, Z. Z. et al. Expression and clinical significance of the NEK7-NLRP3 inflammasome signaling pathway in patients with systemic lupus erythematosus. **Journal of Inflammation (United Kingdom)**, v. 15, n. 1, 2018.

MANICA-CATTANI, M. F. et al. Association between interleukin-1 beta polymorphism (+3953) and obesity. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 314, n. 1, p. 84–89, 2010.

MAUER, J. et al. Signaling by IL-6 promotes alternative activation of macrophages to limit endotoxemia and obesity-associated resistance to insulin. **Nature Immunology**, v. 15, n. 5, p. 423–430, 2014.

MCKELLAR, G. E. et al. Role for TNF in atherosclerosis? Lessons from autoimmune disease. **Nature Reviews Cardiology**, v. 6, p. 410, 2009.

MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and innate immunity. **Nature reviews. Immunology**, v. 1, n. 2, p. 135–145, 2001.

MEIRELLES, G. V. et al. “Stop Ne(c)king around”: How interactomics contributes to functionally characterize Nek family kinases. **World journal of biological chemistry**, v. 5, n. 2, p. 141–160, 2014.

MILLER, J. E. et al. Codon bias among synonymous rare variants is associated with Alzheimer’s disease imaging biomarker. **Pacific Symposium on Biocomputing. Pacific Symposium on Biocomputing**, v. 23, p. 365–376, 2018.

MORRIS, S. N. S. et al. Development of diet-induced insulin resistance in adult *Drosophila melanogaster*. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1822, n. 8, p. 1230–1237, 2012.

MURRAY, J. L. et al. Prognostic value of single nucleotide polymorphisms of candidate genes associated with inflammation in early stage breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 138, n. 3, p. 917–924, 2013.

MUTLUER, F. O. et al. Association of Interleukin-1 Gene cluster polymorphisms with coronary slow flow phenomenon. **Anatolian journal of cardiology**, v. 19, n. 1, p. 34–41, 2018.

NETEA, M. G.; DINARELLO, C. A. More than inflammation: Interleukin-1 β polymorphisms and the lipid metabolism. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 96, n. 5, p. 1279–1281, 2011.

NIETO-VAZQUEZ, I. et al. Insulin resistance associated to obesity: The link TNF- α . **Archives of Physiology and Biochemistry**, v. 114, n. 3, p. 183–194, 2008.

NOV, O. et al. Interleukin-1 β regulates fat-liver crosstalk in obesity by auto-paracrine modulation of adipose tissue inflammation and expandability. **PloS one**, v. 8, n. 1, p. e53626, 2013.

O'NEILL, L. A. J.; GOLENBOCK, Douglas; BOWIE, Andrew G. The history of Toll-like receptors-redefining innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 6, p. 453–460, 2013.

ONER, T. et al. Association of NFKB1A and microRNAs variations and the susceptibility to atherosclerosis. **Journal of genetics**, v. 96, n. 2, p. 251–259, 2017.

OSTROWSKI, K. et al. A trauma-like elevation of plasma cytokines in humans in response to treadmill running. **Journal of Physiology**, v. 513, n. 3, p. 889–894, 1998.

OSTROWSKI, K. et al. Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. **Journal of Physiology**, v. 515, n. 1, p. 287–291, 1999.

PAL, D. et al. Fetuin-A acts as an endogenous ligand of TLR4 to promote lipid-induced insulin resistance. **Nature Medicine**, v. 18, n. 8, p. 1279–1285, 2012.

PARAMEL, G. V.; SIRSJÖ, A.; FRANSÉN, K. Role of Genetic Alterations in the NLRP3 and CARD8 Genes in Health and Disease. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, p. 1–10, 2015. Disponível em:

<<http://www.hindawi.com/journals/mi/2015/846782/>>

PASCO, M. Y.; LÉOPOLD, P. High sugar-induced insulin resistance in *Drosophila* relies on the Lipocalin Neural Lazarillo. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.

PEDERSEN, B. K. Anti-inflammatory effects of exercise: role in diabetes and cardiovascular disease. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 47, n. 8, p. 600–611, 2017.

PEDERSEN, B. K.; FEBBRAIO, M. A. Point : Counterpoint Interleukin-6 does / does not have a beneficial role in insulin sensitivity and glucose homeostasis. **Journal of applied physiology**, v. 102, n. 16, p. 814–819, 2007.

PEDERSEN, B. K.; FEBBRAIO, Mark A. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. **Physiological reviews**, v. 88, n. 4, p. 1379–1406, 2008.

PENG, D. et al. Association of Toll-like Receptor 4 gene polymorphisms with susceptibility to type 2 diabetes mellitus in the Chinese population. **Journal of Diabetes**, v. 7, n. 4, p. 485–492, 2015.

PITOULIAS, M. G. et al. The role of Visfatin in atherosclerotic peripheral arterial obstructive disease. **Cytokine**, v. 91, p. 140–144, 2017.

QIU, G. et al. Suppression of endothelial or lipoprotein lipase in THP-1 macrophages attenuates proinflammatory cytokine secretion. **Journal of Lipid Research**, v. 48, n. 2, p. 385–394, 2006.

RANKIN, L. C.; ARTIS, D. Beyond Host Defense: Emerging Functions of the Immune System in Regulating Complex Tissue Physiology. **Cell**, v. 173, n. 3, p. 554–567, 2018.

RAZMARA, M. et al. CARD-8 protein, a new CARD family member that regulates caspase-1 activation and apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 16, p. 13952–13958, 2002.

REGO-PEREZ, I.; FERNANDEZ-MORENO, M.; BLANCO, F. Gene polymorphisms and pharmacogenetics in rheumatoid arthritis. **Current Genomics**, v. 9, n. 6, p. 381–393, 2008.

REILLY, S. M.; SALTIEL, A. R. Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 13, n. 11, p. 633–643, 2017.

REISS, A. B.; SIEGART, N. M.; DE LEON, J. Interleukin-6 in atherosclerosis: atherogenic or atheroprotective? **Clinical Lipidology**, v. 12, n. 1, p. 14–23, 2017.

ROBERTS, R. L. et al. Evidence of interaction of CARD8 rs2043211 with NALP3 rs35829419 in Crohn's disease. **Genes and Immunity**, v. 11, n. 4, p. 351–356, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/gene.2010.11>>

ROBERTS, Rebecca L. et al. Interaction of the inflammasome genes CARD8 and NLRP3 in abdominal aortic aneurysms. **Atherosclerosis**, v. 218, n. 1, p. 123–126, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.04.043>>

ROMBERG, N.; VOGEL, T. P.; CANNA, S. W. NLRC4 inflammasomopathies. **Current opinion in allergy and clinical immunology**, v. 17, n. 6, p. 398–404, 2017.

SADDI-ROSA, P. et al. Visfatin, glucose metabolism and vascular disease: a review of evidence. **Diabetology & metabolic syndrome**, v. 2, p. 21, 2010.

SANTANA, N. L. et al. Polymorphisms in genes TLR1, 2 and 4 are associated with differential cytokine and chemokine serum production in patients with leprosy. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 4, p. 260–268, 2017.

SATTAR, N. et al. Explaining How “High-Grade” Systemic Inflammation Accelerates Vascular Risk in Rheumatoid Arthritis. **Circulation**, v. 108, n. 24, p. 2957–63, 2003.

SHELLER, J. et al. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1813, n. 5, p. 878–888, 2011.

SCHRODER, K.; TSCHOPP, J. The Inflammasomes. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 821–832, 2010.

SEMLALI, A. et al. Potential role of toll-like receptor 2 expression and polymorphisms in colon cancer susceptibility in the Saudi Arabian population. **OncoTargets and Therapy**, v. 11, p. 8127–8141, 2018.

SHARMA, D.; KANNEGANTI, T. The cell biology of inflammasomes: Mechanisms of

inflammasome activation and regulation. **The Journal of Cell Biology**, v. 213, n. 6, p. 617–629, 2016.

SIMPSON, R. J. et al. Interleukin-6: structure-function relationships. **Protein science**, v. 6, n. 5, p. 929–955, 1997.

SO, A.; DUMUSC, A.; NASI, S. The role of IL-1 in gout: from bench to bedside. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 57, n. 1, p. i12–i19, 2018.

SOARES, J. L.; OLIVEIRA, E. M.; PONTILLO, A. Variants in NLRP3 and NLRC4 inflammasome associate with susceptibility and severity of multiple sclerosis. **Multiple sclerosis and related disorders**, v. 29, p. 26–34, 2019.

SONG, Shunxin et al. NFκB1 and NFκBIA polymorphisms are associated with increased risk for sporadic colorectal cancer in a Southern Chinese Population. **PLOS ONE**, v. 6, n. 6, p. e21726, 2011.

STARKIE, R. et al. Exercise and IL-6 infusion inhibit endotoxin-induced TNF-α production in humans. **The FASEB journal**, v. 17, n. 8, p. 884–886, 2003.

STATOVCI, D. et al. The impact of western diet and nutrients on the microbiota and immune response at mucosal interfaces. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. 838, 2017.

STEPPAN, C. M. et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. **Nature**, v. 409, n. 6818, p. 307–312, 2001.

STERN, J. H.; RUTKOWSKI, J. M.; SCHERER, P. E. Adiponectin, leptin, and fatty acids in the maintenance of metabolic homeostasis through adipose tissue crosstalk. **Cell Metabolism**, v. 23, n. 5, p. 770–784, 2016.

SUN, X. F.; ZHANG, H. NFκB and NFκBI polymorphisms in relation to susceptibility of tumour and other diseases. **Histology and Histopathology**, v. 22, n. 10–12, p. 1387–1398, 2007.

SWAROOP, J. J.; RAJARAJESWARI, D.; NAIDU, J. N. Association of TNF-α with insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. **Indian Journal of Medical Research**, v. 135, n. 1, p. 127–130, 2012.

TANAKA, T.; NARAZAKI, M.; KISHIMOTO, T. IL-6 in inflammation, Immunity, and disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 6, n. 10, 2014.

TANIGUCHI, R. et al. Polymorphisms in TLR-2 are associated with congenital cytomegalovirus (CMV) infection but not with congenital CMV disease. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 12, p. e1092–e1097, 2013.

TODENDI, P. F. et al. Association of IL-6 and CRP gene polymorphisms with obesity and metabolic disorders in children and adolescents. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 87, n. 2, p. 915–924, 2015.

TODENDI, P. F. et al. Low-grade inflammation markers in children and adolescents: Influence of anthropometric characteristics and CRP and IL6 polymorphisms. **Cytokine**, v. 88, p. 177–183, 2016.

TSCHOPP, J.; SCHRODER, K. NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production? **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 3, p. 210–215, 2010.

VARGAS-ALARCÓN, G. et al. The interleukin-1 β -511 T>C (rs16944) gene polymorphism is associated with risk of developing silent myocardial ischemia in diabetic patients. **Immunology Letters**, v. 168, n. 1, p. 7–12, 2015.

VASANTHI, P.; NALINI, G.; RAJASEKHAR, G. Role of tumor necrosis factor-alpha in rheumatoid arthritis: A review. **APLAR Journal of Rheumatology**, v. 10, n. 4, p. 270–274, 2007.

WAJANT, H.; PFIZENMAIER, K.; SCHEURICH, P. Tumor necrosis factor signaling. **Cell Death & Differentiation**, v. 10, n. 1, p. 45–65, 2003.

WANG, J. et al. Interleukin 18 function in atherosclerosis is mediated by the interleukin 18 receptor and the Na-Cl co-transporter. **Nature Medicine**, v. 21, p. 820, 2015.

WANG, M. C.; BOHMANN, D.; JASPER, H. JNK extends life span and limits growth by antagonizing cellular and organism-wide responses to insulin signaling. **Cell**, v. 121, n. 1, p. 115–125, 2005.

XIAO, W. Advances in NF-kappaB signaling transduction and transcription. **Cell Mol**

Immunol, v. 1, n. 6, p. 425–435, 2004.

XU, X. H. et al. Toll-like receptor-4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL.

Circulation, v. 104, n. 25, p. 3103–3108, 2001.

YENMIS, G. et al. Association of NFKB1 and NFKBIA polymorphisms in relation to susceptibility of behçet's disease. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 81, n. 1, p. 81–86, 2015.

ZELLER, T. et al. Molecular characterization of the NLRC4 expression in relation to interleukin-18 Levels. **Circulation: Cardiovascular genetics**, v. 8, n. 5, p. 717–726, 2015.

ZHANG, M. et al. Common polymorphisms in the NFKBIA gene and cancer susceptibility: a Meta-Analysis. **Medical Science Monitor**, v. 21, p. 3186–3196, 2015.

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

ZHAO, Gang et al. Possible role of interleukin-1 β in type 2 Diabetes onset and implications for anti-inflammatory therapy strategies. **PLoS Computational Biology**, v. 10, n. 8, 2014.

ZHENG, C.; YIN, Q.; WU, H. Structural studies of NF- κ B signaling. **Cell Research**, v. 21, n. 1, p. 183–195, 2011.

ZHOU, B. et al. Functional polymorphism of the NFKB1 gene promoter is related to the risk of dilated cardiomyopathy. **BMC Medical Genetics**, v. 10, n. 47, p. 1–5, 2009.

ZHU, Y. et al. Toll-like receptor-2 and -4 are associated with hyperlipidemia. **Molecular medicine reports**, v. 12, n. 6, p. 8241–8246, 2015.

ZMORA, N. et al. The role of the immune system in metabolic health and disease. **Cell metabolism**, v. 25, n. 3, p. 506–521, 2017.