

**DANIELA MAYUMI USUDA PRADO ROCHA**

**EFEITO DO CONSUMO DE DIFERENTES CARGAS LIPÍDICAS ASSOCIADO  
OU NÃO A BEBIDAS À BASE DE FRUTOSE NA RESPOSTA  
INFLAMATÓRIA PÓS-PRANDIAL EM MULHERES COM PESO NORMAL  
OU EXCESSO DE PESO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2016**

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da  
Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

R672e  
2016

Rocha, Daniela Mayumi Usuda Prado, 1987-  
Efeito do consumo de diferentes cargas lipídicas associado ou não a  
bebidas à base de frutose na resposta inflamatória pós-prandial em mulheres  
com peso normal ou excesso de peso / Daniela Mayumi Usuda Prado  
Rocha. - Viçosa, MG, 2016.  
xi, 113f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Inclui apêndices.

Orientador: Helen Hermana Miranda Hermsdorff.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.44-52.

1. Lipídios na nutrição humana. 2. Alimentos - Consumo. 3. Suco de  
laranja. 4. Inflamação. 5. Mulheres - Composição corporal. I. Universidade  
Federal de Viçosa. Departamento de Nutrição e Saúde. Programa de Pós-  
graduação em Ciência da Nutrição. II. Título.

CDD 22. ed. 612.397

**DANIELA MAYUMI USUDA PRADO ROCHA**

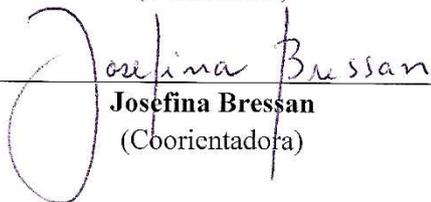
**EFEITO DO CONSUMO DE DIFERENTES CARGAS LIPÍDICAS ASSOCIADO  
OU NÃO A BEBIDAS À BASE DE FRUTOSE NA RESPOSTA  
INFLAMATÓRIA PÓS-PRANDIAL EM MULHERES COM PESO NORMAL  
OU EXCESSO DE PESO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**APROVADA:** 8 de Julho de 2016



**Helen Hermans Mirand Hermsdorff**  
(Orientadora)



**Josefina Bressan**  
(Coorientadora)



**Leandro Licursi de Oliveira**  
(Coorientador)



**Solange Silveira Pereira**

*“Na vida, não existe nada a se temer, apenas a ser compreendido.”*  
Marie Curie

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à minha família pelo apoio, em especial aos meus pais, Márcio e Valéria, e minha irmã, Isabela, pelo amor, carinho, e por tudo que sempre fizeram por mim.

Ao meu esposo, Márcio, por seu amor, compreensão e companheirismo ao longo de mais uma jornada ao meu lado.

À minha princesa, Alice, por alegrar minha vida e preenchê-la com um amor imensurável.

À minha orientadora, Helen, a quem eu muito admiro, e sou imensamente grata pelos ensinamentos, pela compreensão, e principalmente por toda dedicação e incentivo que me permitiram crescer e chegar até aqui.

Aos meus coorientadores, Josefina e Leandro, obrigada pelos ensinamentos e contribuições.

Aos pesquisadores que participaram da coleta de dados. Em especial, as companheiras, Lílian e Ale, que foram fundamentais para a execução do projeto.

As voluntárias da pesquisa por possibilitarem a concretização do trabalho.

Aos amigos, em especial aqueles que sempre estiveram presentes, mesmo separados pela distância. Um agradecimento especial aos amigos e colegas da pós-graduação do LAMECC, LIA e PROCARDIO-UFV, Ana Luísa, Ana Paula, Alinne, Flávia Galvão, Flávia Xavier, Jorge, Júlia, Júnia, Larissa, Lílian, Nínive, Olívia, Winder e Zé.

Ao CNPq e a CAPES, pelo apoio financeiro e a CAPES, pela concessão da bolsa.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, e aos professores do Departamento de Nutrição e Saúde pela contribuição da minha formação acadêmica, desde a graduação.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise e aos Laboratório de Metabolismo Energético e Composição Corporal (LAMECC) e Laboratório de Análises Clínicas (LAC), situados na UFV, pela disponibilização do espaço físico e equipamentos necessários às análises realizadas.

E, a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização do presente trabalho.

Muito obrigada!

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS .....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	vii
RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	x
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1 Obesidade .....	3
2.2 Marcadores inflamatórios .....	4
2.2.1 <i>Citocinas</i> .....	4
2.2.2 <i>Proteína C reativa</i> .....	7
2.3 Dieta e inflamação .....	7
2.3.1 Ácidos graxos .....	8
2.3.2 Suco de laranja e frutose .....	10
3. OBJETIVOS .....	12
3.1 Objetivo Geral .....	12
3.2 Objetivos Específicos .....	12
4. METODOLOGIA .....	13
4.1 Casuística .....	13
4.2 Aspectos Éticos .....	14
4.3 Desenho do estudo .....	14
4.4 Refeições teste .....	16
4.5 Quantificação da frutose .....	18
4.6 Variáveis analisadas .....	19
4.6.1 <i>Antropometria e composição corporal e pressão arterial</i> .....	19
4.6.2 <i>Coleta de sangue e preparo de amostras</i> .....	19

4.6.3	<i>Determinação de marcadores inflamatórios plasmáticos</i> .....	20
4.7	Análise estatística .....	20
5.	RESULTADOS .....	22
6.	DISCUSSÃO .....	32
7.	CONCLUSÕES .....	42
8.	REFERÊNCIAS .....	44
9.	ANEXOS .....	53
9.1	Anexo A: Termo de Consentimento Livre Esclarecido.....	53
9.2	Anexo B: História Clínica e Hábitos de Vida .....	55
9.3	Anexo C: Questionário Internacional de Atividade Física.....	56
9.4	Anexo D: Folha de Instruções para Participação no Estudo .....	58
9.5	Anexo E: Dieta branca (2 dias).....	59
9.6	Anexo F: Caderno de Registro de Dados (CRD) .....	62
9.7	Anexo G: Composição centesimal dos Muffins de AGS usados no estudo.....	72
9.8	Anexo H: Composição centesimal dos Muffins de AGMI usados no estudo .....	73
9.9	Anexo I: Aprovações do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos ....	74
10.	APÊNDICES .....	77
10.1	Apêndice A: Artigo de Revisão (publicado em janeiro de 2016 na revista Atherosclerosis).....	77
10.2	Apêndice B: Artigo de Revisão (aceito para publicação na revista São Paulo Medical Journal em 07 de Julho de 2016).....	82

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

### FIGURAS

- Figura 1.** Desenho experimental do estudo. .... 17
- Figura 2.** Fluxograma da seleção e participação das voluntárias no estudo. .... 23
- Gráfico 1.** Variação da concentração plasmática de IL-17A após o consumo de uma refeição com alto conteúdo de ácidos graxos saturados acompanhada de suco de laranja ou água. .... 28
- Gráfico 2.** Concentração plasmática de IL-6 após o consumo de uma refeição com alto conteúdo de ácidos graxos saturados acompanhada de suco de laranja ou água. .... 29
- Gráfico 3.** IL-6 após o consumo de uma refeição com alto conteúdo de ácidos graxos monoinsaturados acompanhada de suco de laranja, bebida à base de frutose ou água. . 30

### TABELAS

- Tabela 1.** Características basais das voluntárias ..... 24
- Tabela 2.** Área abaixo da curva de citocinas plasmáticas nos indivíduos que consumiram uma refeição com alto conteúdo de ácidos graxos saturados ou monoinsaturados acompanhada de suco de laranja, bebida à base de frutose ou água, no intervalo de 5 horas pós-prandiais. .... 27

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGMI: ácidos graxos monoinsaturados

AGS: ácidos graxos saturados

AUC: área embaixo da curva

EP: erro padrão

HDL: lipoproteína de alta densidade

IL: interleucina

IMC: índice de massa corporal

I $\kappa$ B $\alpha$ : inibidor do NF- $\kappa$ B alfa

LDL: lipoproteína de baixa densidade

MCP-1: proteína quimiotática de monócitos 1

NF- $\kappa$ B: fator nuclear  $\kappa$ B

PAI-1: ativador do plasminogênio tipo 1

PCR: proteína C reativa

SOCS-3: proteína supressora da sinalização das citocinas

TLR: receptores do tipo Toll

TNF: fator de necrose tumoral

## RESUMO

ROCHA, Daniela Mayumi Usuda Prado, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2016. **Efeito do consumo de diferentes cargas lipídicas associado ou não a bebidas à base de frutose na resposta inflamatória pós-prandial em mulheres com peso normal ou excesso de peso.** Orientadora: Helen Hermana Miranda Hermsdorff. Coorientadores: Josefina Bressan e Leandro Licursi de Oliveira.

A inflamação tem sido proposta como elo entre a obesidade e diversas condições clínicas como a síndrome metabólica, diabetes e aterosclerose. Por sua vez, a dieta é um reconhecido fator modulador da resposta inflamatória. Neste sentido, os ácidos graxos podem influenciar muitos eventos e mecanismos celulares, e desempenhar importante papel na regulação de respostas imunes e inflamatórias. O consumo de frutas, por outro lado, resultam em importante redução de marcadores pró-inflamatórios. Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do consumo de refeições com alto conteúdo de ácidos graxos saturados (AGS) e monoinsaturados (AGMI), acompanhadas de suco de laranja ou não, na resposta inflamatória pós-prandial em mulheres eutróficas ou com excesso de peso. Tratou-se de um estudo pós-prandial, aleatório, cruzado e controlado. Participaram do estudo 55 mulheres adultas (com idade entre 20 a 40 anos), pré-menopáusicas e não gestantes. Na primeira etapa do estudo, um grupo de voluntárias (n=33, 27±01 anos) recebeu uma refeição (≈1.000 kcal) com alto conteúdo de AGS (37% do valor calórico total), acompanhadas de 500 mL de suco de laranja (teste), ou de água (controle negativo). Na segunda etapa, outro grupo (n=22, 27±1 anos) recebeu uma refeição (≈1.000 kcal) com alto conteúdo de AGMI (53% do valor calórico total), acompanhadas de 500 mL de suco de laranja (teste), de uma bebida à base de frutose (controle), ou de água (controle negativo). As concentrações plasmáticas de marcadores inflamatórios (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- $\gamma$ , TNF e PCR) foram determinadas antes (jejum) e depois de 2, 3 e 5 horas da ingestão das refeições testes. Como resultados, o consumo agudo de uma refeição com alto conteúdo de AGS, em comparação a refeição com alto conteúdo de AGMI, apresentou maiores valores para AUC ajustada das citocinas TNF e IL-6, independente da bebida que acompanhou as refeições. Ainda, o consumo de AGS acompanhado de água, mas não de suco de laranja, também apresentou maiores valores para AUC ajustada para citocinas IL-17A, IL-4 e IL-2, em relação à refeição com alto conteúdo de AGMI acompanhada ou não da ingestão de suco de laranja. Também foi observado o aumento da AUC ajustada para IL-10, após

o consumo de AGS, em relação ao AGMI, possivelmente relacionado a uma compensação do organismo visando limitar a inflamação subclínica induzida pelo consumo desse ácido graxo. O consumo do suco de laranja, por sua vez, reduziu a inflamação pós-prandial, induzida pelo consumo de uma refeição com alto conteúdo de AGS, mediante a redução das concentrações de  $\Delta$ IL-17A. Ainda, o consumo de refeições com alto conteúdo de AGS ou AGMI aumentou a concentração pós-prandial da IL-6 plasmática, independente da refeição ser acompanhada ou não de suco de laranja. Nós não identificamos diferenças na resposta inflamatória pós-prandial de acordo com estado nutricional das voluntárias (eutrofia vs. excesso de peso) que consumiram uma refeição com alto conteúdo de AGS ou AGMI, acompanhadas ou não da ingestão de suco de laranja. Em conclusão, os resultados do presente estudo indicam um efeito anti-inflamatório dos AGMI em relação aos AGS. O consumo de suco de laranja, por sua vez, se mostrou capaz de atenuar o aumento subclínico da inflamação pós-prandial induzida pela dieta com alto conteúdo de AGS para um marcador específico (IL-17A). Estudos em longo prazo são necessários para avaliar os benefícios do seu consumo regular de AGMI e suco de laranja, bem como os mecanismos envolvidos.

## ABSTRACT

ROCHA, Daniela Mayumi Usuda Prado, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2016. **Effect of eating different fatty acids with or without a fructose based beverage intake on postprandial inflammatory response in normal weight or overweight women.** Adviser: Helen Hermana Miranda Hermsdorff. Co-advisers: Josefina Bressan and Leandro Licursi de Oliveira.

Inflammation has been proposed as a link between obesity and various clinical conditions such as metabolic syndrome, diabetes and atherosclerosis. Besides diet is a recognized modulator of the inflammatory response. In this regard, the fatty acids can influence many events and cellular mechanisms, and play an important role in regulating immune and inflammatory responses. The consumption of fruit on the other hand, results in significant reduction of pro-inflammatory markers. Considering the above, this study aimed to evaluate the effect of food consumption with high content of saturated fatty acids (SFA) and monounsaturated (MUFA), accompanied by orange juice or not, on postprandial inflammatory response in normal or overweight/obesity women. This was a post-prandial, randomized, crossover and controlled study design. The study included 55 adult women (aged 20 to 40 years), premenopausal and not pregnant. In the first stage of the study, a group of volunteers (n=33, 27±1 years) received a meal (≈1.000 kcal) rich in SFA (37% of energy intake) together with 500 ml of orange juice (test) or water (negative control). At the second stage, another group (n=22, 27±1 years) received a meal (≈1.000 kcal) rich in MUFA (53% of energy intake) together with 500 ml of orange juice (test), fructose beverage (control), or water (negative control). Plasma concentrations of inflammatory markers (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- $\gamma$ , TNF and hs-CRP) were determined before (fasting) and after 2, 3 and 5 hours of ingestion of the test meals. As a result, the acute consumption of a high-SFA meal compared with a high-MUFA meal, showed higher values for AUC of TNF and IL-6 cytokines, independent of the drink that accompanied the meals. Also, consumption of a high-SFA meal accompanied by water intake, but not orange juice, also had higher values for AUC of IL-17A, IL-4 and IL-2 for in relation to a high-MUFA meal with or without orange juice intake. It was also observed an increase in AUC of IL-10, after consumption of high-SFA meal, compared to a high-MUFA meal, possibly related to a compensation to limit the subclinical inflammation induced by the consumption of this fatty acid. On the other hand, the consumption of orange juice reduced postprandial inflammation induced by the consumption of a meal

rich in AGS, by reducing the concentrations of  $\Delta$ IL-17A. Moreover, the consumption of meals with high MUFA or SFA content, followed by orange juice or not, increased postprandial plasma concentration of IL-6. We have not identified differences in postprandial inflammatory response according to nutritional status of volunteers (normal weight vs. overweight) that consumed a meal rich in MUFA or SFA, with or without orange juice intake. In summary, the results of this study indicate an anti-inflammatory effect of MUFA compared to AGS. The consumption of orange juice, in turn, was able to mitigate the subclinical increase of postprandial inflammation induced by diet with high content of AGS for a particular biomarker (IL-17A). Long-term studies are needed to assess the benefits of MUFA and orange juice regular consumption, as well as the mechanisms involved.

## 1. INTRODUÇÃO

A obesidade é um problema de saúde mundial agravado pela sua relação com várias co-morbidades, como diabetes mellitus tipo 2, doenças cardiovasculares, dislipidemias e câncer (VIA; MECHANICK, 2014). Estima-se que mais de um terço (39%) da população adulta mundial com idade  $\geq 18$  anos apresenta sobrepeso (25-29,9 kg/m<sup>2</sup>), e que 11% dos homens e 15% das mulheres são obesos ( $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>) (WHO, 2015). Definida como expansão excessiva do tecido adiposo, a obesidade é uma doença crônica multifatorial caracterizada por uma inflamação crônica subclínica, associada com o aumento da adiposidade central (CHOI; JOSEPH; PILOTE, 2013; HERMSDORFF et al., 2010c, 2011a). Neste sentido, a inflamação tem sido proposta como elo entre a adiposidade e diversas condições clínicas, como a síndrome metabólica, diabetes e aterosclerose.

A inflamação é uma resposta fisiológica desencadeada por um agente infeccioso ou lesão tecidual que visa eliminar o agente irritante e acelerar a regeneração do tecido (CARRARO et al., 2015; MEDZHITOV, 2008). Neste processo, vários mediadores inflamatórios são liberados, incluindo moléculas de adesão celular, citocinas, quimiocinas, dentre outros agentes inflamatórios (KVIETYS; GRANGER, 2012). Visando o equilíbrio homeostático, é necessária uma resposta inflamatória controlada, com a ativação da inflamação seguida das fases de resolução e reparo. Por outro lado, uma inflamação persistente, excessiva ou inapropriada leva a um desbalanço na homeostasia, e promove um estado patológico inflamatório (MEDZHITOV, 2008).

Por sua vez, estudos sugerem que o consumo de refeições com conteúdo de gordura pode induzir episódios agudos de ativação imune (DE VRIES et al., 2014; HERIEKA; ERRIDGE, 2014; POPPITT et al., 2008). De fato, os ácidos graxos podem desempenhar importante papel na regulação de respostas imunes e inflamatórias (TENG et al., 2014).

Nesse sentido, o consumo de ácidos graxos saturados (AGS) têm influência sobre os processos pró-aterogênicos e inflamatórios e está associado com concentrações elevadas de proteína C reativa (PCR) (SANTOS et al., 2013; SANTOS; OLIVEIRA; LOPES, 2013), com o aumento da morbimortalidade cardiovascular (ERKKILÄ et al.,

2008; HOOPER et al., 2016; SALTER, 2011) e do câncer (GATHIRUA-MWANGI; ZHANG, 2014), embora alguns estudos relatem resultados conflitantes (FATTORE; FANELLI, 2013; O’SULLIVAN et al., 2013). Os ácidos graxos monoinsaturados (AGMI), por sua vez, têm sido associados com a redução da morbimortalidade cardiovascular (ESTRUCH et al., 2013; WIDMER et al., 2015) e com melhor perfil lipídico (SOLÁ et al., 2011). Além disso, o consumo de AGMI pode modular a resposta inflamatória pós-prandial, apresentando característica anti-inflamatória, particularmente quando comparado ao consumo dos AGS (CAMARGO et al., 2012; JIMÉNEZ-GÓMEZ et al., 2009).

Por outro lado, o consumo de frutas pode reduzir marcadores pró-inflamatórios (HERMSDORFF et al., 2010a, 2011b), o consumo do suco de laranja, por exemplo, devido às suas propriedades anti-inflamatórias, é capaz de modular a resposta inflamatória (COELHO; HERMSDORFF; BRESSAN, 2013; GHANIM et al., 2010a). A frutose presente em sucos de frutas, bem como no suco de laranja, no entanto, é associada com efeitos metabólicos implicados no desenvolvimento da síndrome metabólica, como a resistência à insulina e dislipidemia (DEKKER et al., 2010). Além disso, modelos animais, apontam a frutose como uma potente molécula indutora da inflamação (DEKKER et al., 2010; GLUSHAKOVA et al., 2008), com resultados controversos em estudos clínicos (BRYMORA et al., 2012; SILBERNAGEL et al., 2013).

O consumo de uma refeição com alto conteúdo de gorduras ativa leucócitos, que em condições inflamatórias são recrutadas para o sítio da inflamação em um processo dependente de citocinas que controlam a expressão de selectinas, integrinas, moléculas de adesão nos leucócitos e células endoteliais, e dessa maneira contribui para a disfunção endotelial (OOSTROM et al., 2004). Dessa forma, a dieta é um importante fator de risco capaz de modular a inflamação subclínica pós-prandial e está envolvida na progressão de doenças crônicas, incluindo a aterosclerose.

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do consumo de refeições com alto conteúdo de AGS e AGMI, acompanhadas de bebidas à base de frutose (como o suco de laranja) ou não, na resposta inflamatória pós-prandial em mulheres eutróficas ou com excesso de peso.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Obesidade

Reconhecida como doença desde 1985 pelo *Consensus Development Conference on Obesity (National Institute of Health)*, a obesidade é uma doença multifatorial, caracterizada pelo acúmulo anormal ou excessivo de lipídios, com prejuízos à saúde, cuja expressão fenotípica resulta da interação entre fatores genéticos e ambientais (BRESSAN; HERMSDORFF, 2008; GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2011; WHO, 2015).

No mundo, a prevalência do excesso de peso vem aumentando desde 1980 (STEVENS et al., 2012). Estimativas da Organização Mundial da Saúde, indicam que mais de um terço (39%) da população adulta com idade  $\geq 18$  anos apresenta sobrepeso (25-29,9 kg/m<sup>2</sup>), e que 11% dos homens e 15% das mulheres são obesos ( $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>) (WHO, 2014). Se a essa tendência do aumento da obesidade continuar, em 2025, a prevalência global de obesidade será de 18% para os homens e maior que 21% para as mulheres, caminhando na contramão da meta de redução global da obesidade (NCD RISK FACTOR COLLABORATION (NCD-RISC), 2016).

A obesidade, particularmente a obesidade abdominal, é um dos principais fatores de risco para a síndrome metabólica (JUNG; CHOI, 2014), que por sua vez representa um conjunto de fatores de risco metabólico além da obesidade abdominal/central, como dislipidemia (hipertrigliceridemia e/ou baixo HDL-c), hipertrigliceridemia ou diabetes, pré-hipertensão ou hipertensão arterial sistêmica (SILVA et al., 2015). Logo, a obesidade se relaciona com várias co-morbidades, sendo um importante fator de risco para diversas doenças crônicas e desordens metabólicas incluindo o diabetes mellitus tipo 2, doenças cardiovasculares, dislipidemias e câncer (VIA; MECHANICK, 2014).

O tecido adiposo além de armazenar energia é também reconhecidamente um órgão endócrino. Assim, a obesidade desencadeia a expansão do tecido adiposo, que é acompanhada por alterações na produção de várias substâncias bioativas, conhecidas como adipocitocinas ou adipocinas, com desequilíbrio entre marcadores anti e pró-inflamatórios, e conseqüente aumento de marcadores inflamatórios circulantes como das citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e MCP-1), levando a inflamação crônica subclínica associada a obesidade (CARRARO et al., 2015; CHOE et al., 2016; JUNG;

CHOI, 2014). Essa inflamação subclínica na obesidade tem sido associada com distúrbios metabólicos, incluindo a resistência à insulina, lipotoxicidade, e efeitos nocivos a outros órgãos metabólicos, como o fígado, músculo e pâncreas (CHOE et al., 2016).

## **2.2 Marcadores inflamatórios**

A inflamação aguda é desencadeada em resposta a agente infeccioso ou lesão tecidual. Trata-se de um processo fisiológico que visa a manutenção da homeostase (CALDER et al., 2013). Neste processo, vários mediadores inflamatórios são liberados, incluindo moléculas de adesão celular, citocinas, quimiocinas, dentre outros agentes inflamatórios (KVIETYS; GRANGER, 2012). A seguir, nós discutimos o papel das citocinas e da PCR na inflamação.

### **2.2.1 Citocinas**

As citocinas são importantes mediadores imunológicos, produzidos pelas células do sistema imune sob estimulação. Elas se ligam a receptores específicos que podem induzir a ativação, proliferação, diferenciação das células alvo; ou ainda regular/modular as reações imunológicas, inibindo o crescimento de células, atuando como agentes citotóxicos, e induzindo ou suprimindo a produção de outras citocinas. Dependendo da sua atuação as citocinas podem ser classificadas como anti-inflamatórias ou pró-inflamatórias (TRIFUNOVIĆ et al., 2015).

A interleucina-2 (IL-2) foi descoberta em 1976, sendo inicialmente reconhecida pelo seu papel sobre as células T ativadas (LIAO; LIN; LEONARD, 2011). Trata-se de uma citocina pró-inflamatória envolvida na ativação e proliferação de vários tipos de células T (LIAO; LIN; LEONARD, 2013; SHARMA; FU; JU, 2011). A IL-2 correlaciona-se positivamente com o IMC e medidas de adiposidade central (perímetro da cintura e razão cintura/quadril), além da hemoglobina glicada (HbA1c) (LUCAS et al., 2013; SCHMIDT et al., 2015). Contudo, em adolescentes com sobrepeso, após 13 meses de um programa de intervenção nutricional e de atividade física, não houve redução dessa citocina, apesar da melhora observada na composição corporal (ROMEIO et al., 2011).

A interleucina-4 (IL-4) é uma citocina produzida por linfócitos, basófilos, eosinófilos e mastócitos, que desempenha importante papel nas respostas alérgicas e

parasitárias, sendo implicada na fase de início e também efetora da resposta imunológica do tipo 2 (LIANG et al., 2011; VOEHRINGER et al., 2006). Estudos apontam que a IL-4 atua também no metabolismo lipídico, inibindo a deposição de lipídios no tecido adiposo, que conseqüentemente reduz tanto o ganho de peso quanto a massa de gordura corporal (CHANG et al., 2012; TSAO et al., 2014). A IL-4 também está envolvida no metabolismo da glicose, e tem papel importante na promoção da sensibilidade à insulina e da tolerância a glicose (CHANG et al., 2012).

A interleucina-6 (IL-6) é conhecida como uma citocina inflamatória secretada principalmente pelo tecido adiposo (10-35%), e também pelo músculo esquelético e fígado (CARRERO et al., 2009). A IL-6 é mediadora da resposta aguda, e promove o aumento das concentrações plasmáticas do PCR e soro amiloide A (TANAKA; KISHIMOTO, 2014). A sua concentração está correlacionada com o aumento da adiposidade e também com um aumento do risco de resistência à insulina (CARRARO et al., 2015; HERMSDORFF et al., 2011d; PARK; PARK; YU, 2005). Além disso a IL-6 é associada ao aumento do risco cardiovascular (AMAR et al., 2006; KAPTOGE et al., 2014) e com desenvolvimento de várias doenças, incluindo as doenças autoimunes e inflamatórias e câncer (NGUYEN; LI; TEWARI, 2014; YAO et al., 2014). Além disso, um alto consumo de frutas e hortaliças e também uma grande adesão a uma dieta de restrição calórica com base em um padrão de dieta mediterrânea pode reduzir a expressão e a síntese deste marcador inflamatório (HERMSDORFF et al., 2010b, 2011c).

A interleucina-10 (IL-10) apresenta propriedades anti-inflamatórias, sendo produzida principalmente por macrófagos, mas também por linfócitos T auxiliares Th1 e Th2, células dendríticas, células T citotóxicas, linfócitos B, monócitos e mastócitos (TRIFUNOVIĆ et al., 2015). A IL-10 tem como principal função impedir danos ao tecido limitando a resposta inflamatória, no caso de uma injúria (CHANG et al., 2014). Além disso, possui capacidade de inibir a apresentação de antígenos às células T por monócitos e macrófagos. E suprime a expressão de IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 e TNF- $\alpha$ . A deficiência de IL-10 é implicada a uma série de doenças, como a doença inflamatória intestinal, psoríase, asma e artrite reumatoide (TRIFUNOVIĆ et al., 2015). A baixa concentração de IL-10 tem sido apontada como marcador para síndrome metabólica (CHANG et al., 2014; VAN EXEL et al., 2002).

A interleucina-17 (IL-17) é uma citocina pró-inflamatória, relacionada com várias doenças, como artrite reumatoide, psoríase, doença de Chrohn, e esclerose múltipla (MIOSSEC, 2009). Estudos clínicos sugerem que indivíduos obesos apresentam elevadas concentrações de IL-17 (AHMED; GAFFEN, 2010). Além disso, a IL-17 contribuiu para o favorecimento da aterogênese subclínica em pacientes obesos (TARANTINO et al., 2014). Em modelos experimentos, o papel pró-inflamatório e pró-aterogênico da IL-17A, em resposta ao consumo de uma dieta com alto conteúdo de lipídios, já foi evidenciado com o aumento da inflamação sistêmica e vascular, desempenhando importante papel na progressão de lesões ateroscleróticas (CHEN et al., 2010; MADHUR et al., 2011)

O interferon gama (IFN- $\gamma$ ) é secretado por linfócitos T e macrófagos. Dentre as suas várias funções, o IFN- $\gamma$  participa da iniciação e modulação de respostas inflamatórias. Nos macrófagos, estimula a produção de outras citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IL-6, e radicais de oxigênio (VOLOSHYNA; LITTLEFIELD; REISS, 2014). Nas doenças autoimunes, o IFN- $\gamma$  vem sendo um apontando como um importante efector na patogênese de doenças como no lúpus eritematoso, esclerose, e artrite reumatoide (POLLARD et al., 2013). Ainda, o IFN- $\gamma$  é implicado no desenvolvimento e progressão da aterosclerose (VOLOSHYNA; LITTLEFIELD; REISS, 2014). Elevadas concentrações de IFN- $\gamma$  são encontradas na obesidade e na síndrome metabólica (SCHMIDT et al., 2015; SURENDAR et al., 2011).

O fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), anteriormente conhecida como caquetina, é uma citocina pró-inflamatória produzida principalmente por macrófagos e monócitos, mediante a ativação das vias MAPK e NF- $\kappa$ B, que resulta na expressão de genes inflamatórios e de outras citocinas inflamatórias tais como IL 1 $\beta$  e IL-6 (BILLIET et al., 2014; SHURETY et al., 2001). Os adipócitos também contribuem para a produção de TNF- $\alpha$ , a qual é altamente expressa no tecido adiposo de obesos e proposta como um elo entre a obesidade e a resistência à insulina (MAKKI; FROGUEL; WOLOWCZUK, 2013). TNF- $\alpha$  é também associado com um risco cardiovascular aumentado, e no desenvolvimento de doenças como o câncer e outras condições inflamatórias, incluindo doenças inflamatórias do intestino, artrite reumatoide e psoríase (BILLIET et al., 2014; KAPTOGE et al., 2014; YANG et al., 2011). De modo semelhante à IL-6, uma dieta hipocalórico e o consumo de frutas e hortaliças pode modular sua síntese e expressão (HERMSDORFF et al., 2010b, 2011c).

### **2.2.2 Proteína C reativa**

A proteína C reativa (PCR) é uma proteína de fase aguda, produzida no fígado em resposta a um agente inflamatório ou dano tecidual, comumente utilizado como marcador não específico da inflamação sistêmica. A PCR exerce efeitos pró-aterogênicos, facilitando a adesão e a transmigração de monócitos através da parede vascular (YOUSUF et al., 2013). Na inflamação crônica subclínica, como aquela que ocorre em indivíduos obesos relacionada com a obesidade abdominal, a PCR é um importante marcador utilizado (CHOI; JOSEPH; PILOTE, 2013; HERMSDORFF et al., 2011a). Elevadas concentrações desse marcador, particularmente da PCR, estão fortemente correlacionadas com o risco cardiovascular, além disso associa-se com o risco aumentado para hipertensão, evento isquêmico transitório, acidente vascular cerebral, doença arterial periférica e morte coronária súbita (WINDGASSEN et al., 2011). Ademais, o consumo hortaliças associado a dieta hipocalórica, pode reduzir esse marcador inflamatório, em indivíduos obesos independente da perda de peso (HERMSDORFF et al., 2011b).

### **2.3 Dieta e inflamação**

A perda de peso associada a uma dieta hipocalórica é associada com a melhora do perfil lipídico, redução do estresse oxidativo e também da inflamação, com a redução nas concentrações de TNF- $\alpha$ , IL-6, leptina, de moléculas de adesão ICAM-I, além da PCR. Assim, a dieta pode modular a inflamação subclínica induzida pelo excesso de peso (BOUGOULIA; TRIANTOS; KOLIAKOS, 2006a, 2006b; SHARMAN; VOLEK, 2004). De fato, a dieta é um importante fator modificável envolvido na obesidade e, conseqüentemente, na inflamação induzida pela obesidade (EXLEY et al., 2014; WILLETT; HU; PH, 2011). Ademais, estudos indicam que a fisiologia dos nutrientes e a imunologia estão relacionadas. O jejum ou alto teor de gordura das refeições pode induzir episódios agudos de ativação imune, induzidos pela disponibilidade de nutrientes (DE VRIES et al., 2014; HERIEKA; ERRIDGE, 2014). Nesse sentido, os ácidos graxos podem ter importante papel na regulação da resposta imunológica e inflamatória. Por outro lado, o consumo do suco de laranja é recomendado pelas suas propriedades benéficas à saúde, incluindo o seu efeito anti-inflamatório associado a presença de

compostos bioativos em sua composição (COELHO; HERMSDORFF; BRESSAN, 2013).

### **2.3.1 Ácidos graxos**

Dentre os macronutrientes, os lipídios são os mais discutidos no desenvolvimento de doenças como a obesidade, além de outras doenças crônicas não transmissíveis.

Nesse contexto, o consumo de ácidos graxos saturados (AGS) está associado com efeitos nocivos para a saúde humana, especialmente relacionado ao seu efeito sobre a hipercolesterolemia, com impacto importante sobre a LDL (lipoproteína de baixa densidade) pelo ácido mirístico (14:0), seguido do ácido láurico (12:0) e do ácido palmítico (16:0) (SACKS; KATAN, 2002). De fato, sabe-se que uma mudança de estilo de vida, como a redução do consumo de AGS, é eficaz para diminuir a alta LDL (KELLY, 2010; SACKS; KATAN, 2002). Os AGS também podem influenciar os processos pró-aterogênicos e inflamatórios e está associado a concentrações elevadas de PCR (SANTOS et al., 2013; SANTOS; OLIVEIRA; LOPES, 2013), com o aumento da morbimortalidade cardiovascular (ERKKILÄ et al., 2008; HOOPER et al., 2016; SALTER, 2011) e câncer (GATHIRUA-MWANGI; ZHANG, 2014), embora alguns estudos relatem resultados conflitantes (FATTORE; FANELLI, 2013; O'SULLIVAN et al., 2013). Além disso, a ingestão de AGS também influencia a saciedade pós-prandial diminuindo a liberação de peptídeos gastrointestinais que podem levar a uma maior ingestão calórica, balanço energético positivo, e, assim, contribuir para o ganho de peso e obesidade (BRESSAN et al., 2009), a qual está relacionada ao aumento da inflamação.

O papel dos AGS na inflamação ainda não é bem esclarecido. Sugere-se que os AGS podem induzir a inflamação mediada por receptores do tipo Toll (TLR – toll-like receptors), por diversas vias moleculares. Nesse sentido, o AGS tem sido proposto como um ligante não microbiano do TLR4, de forma similar ao LPS. Além disso, o consumo de uma refeição com alto conteúdo de AGS pode induzir a endotoxemia metabólica pelo aumento e incorporação de LPS, que por sua vez ativa a inflamação via TLR4. Ainda os AGS contribuem para o aumento da lipemia e do estresse oxidativo, fatores que também parecem estar envolvido no processo inflamatório subclínico induzido por esses ácidos graxos. Todos esses eventos levam a ativação do fator NF- $\kappa$ B, e assim, estimulam

aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e células de adesão (ROCHA et al., 2016) (Apêndice A).

Por outro lado, a dieta mediterrânea é caracterizada pela alta quantidade de ácidos graxos monoinsaturados (AGMI), principalmente na forma de azeite de oliva (WIDMER et al., 2015). O consumo de uma dieta mediterrânea com alto conteúdo de AGMI tem sido associado com a redução da morbimortalidade cardiovascular (ESTRUCH et al., 2013; WIDMER et al., 2015). Além disso, o consumo de AGMI proveniente de alimentos como o azeite de oliva e castanhas, apresenta efeito benéfico sobre marcadores do metabolismo lipídico em curto prazo (lipemia pós-prandial), e também em longo prazo com a melhora do perfil lipídico plasmático, seja nas concentrações, seja no tamanho das partículas de HDL-C e LDL-C, amplamente conhecidos como fatores de proteção e risco, respectivamente, para as doenças cardiovasculares (LOPES; PELUZIO; HERMSDORFF, 2016). Além disso, a dieta mediterrânea, com alto conteúdo de azeite de oliva, também pode contribuir para a prevenção e o controle da hipertensão arterial sistêmica (MIURA et al., 2013; TOLEDO et al., 2013).

Em estudo realizado pelo PREDIMED (PREvención con Dieta MEDiterránea), na Espanha, foram fornecidos 1 L de azeite de oliva/semana para consumo *ad libitum*, no contexto da dieta mediterrânea, a indivíduos com elevado risco cardiometabólico. Após um ano de intervenção foi observada a redução das concentrações plasmáticas de marcadores inflamatórios como o IL-6 e os receptores TNF (TNFR60 e TNFR80) (URPISARDA et al., 2012a). Estudos pós-prandiais também mostram que os AGMI podem ser capazes de modular a resposta inflamatória pós-prandial, apresentando característica anti-inflamatória, particularmente quando comparado ao consumo de AGS. Os efeitos dos AGMI incluem a redução da expressão de genes inflamatórios em células mononucleares de sangue periférico, como MCP-1 (proteína quimiotática de monócitos 1), MMP-9, TNF- $\alpha$  e da subunidade p65 do NF- $\kappa$ B, e o aumento da expressão de genes anti-inflamatórios como I $\kappa$ B $\alpha$  (Inibidor do NF- $\kappa$ B  $\alpha$ ) quando comparados ao consumo de dieta com alto conteúdo de AGS (CAMARGO et al., 2012; CRUZ-TENO et al., 2012; JIMÉNEZ-GÓMEZ et al., 2009). No tecido adiposo subcutâneo, o consumo agudo de AGMI por indivíduos saudáveis também mostrou efeito anti-inflamatório, com aumento da expressão do gene da adiponectina. Mas também aumentou a expressão de genes envolvidos na inflamação (*TNFRSF1A* – gene para o receptor TNF superfamília 1A),

contudo, a resposta inflamatória observada foi menor em comparação com a ingestão de AGS (PIETRASZEK; GREGERSEN; HERMANSEN, 2011). Em indivíduos obesos, o consumo em longo prazo de uma dieta com alto conteúdo de AGMI também resultou na redução ou manutenção de genes pró-inflamatórios, no tecido adiposo subcutâneo, em relação a dieta com alto conteúdo de AGS (DIJK et al., 2009). Dessa forma, os AGMI podem exercer um papel inflamatório, porém não tão pronunciado quanto ao associado ao consumo de refeições com alto conteúdo de AGS.

### **2.3.2 Suco de laranja e frutose**

As frutas e hortaliças são importantes fontes de vitaminas, minerais e fibras, além de compostos bioativos. O consumo desse grupo alimentar está relacionado com a melhora do estresse oxidativo, com a diminuição da LDL-oxidada e o aumento da capacidade antioxidante (COCATE et al., 2013; HERMSDORFF et al., 2012). Além disso, as frutas e hortaliças também apresentam boa capacidade anti-inflamatória, com redução das concentrações de PCR e homocisteína, e reduzida expressão de genes pró-inflamatórios como IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1R (HERMSDORFF et al., 2010a, 2011c).

Os flavonoides são compostos polifenólicos biologicamente ativos encontrados em frutas, hortaliças, castanhas e bebidas à base de frutas ou chás. Vários efeitos benéficos à saúde tem sido relacionados aos flavonoides, incluindo a prevenção de doenças cardiovasculares, câncer, doenças neurodegenerativas e outras (GONZÁLEZ-GALLEGO et al., 2010). As frutas cítricas, por exemplo, contém flavonoides e flavonas (hesperidina e nangerina) que não são comuns em outras frutas (COELHO; HERMSDORFF; BRESSAN, 2013; GONZÁLEZ-GALLEGO et al., 2010).

Dentre os sucos de fruta, o consumo do suco de laranja é o mais popular, e encorajado pela sua composição nutricional, sendo fonte de vitamina C, flavonoides e componentes bioativos (COELHO; HERMSDORFF; BRESSAN, 2013; O'NEIL et al., 2012). O consumo do suco de laranja também pode ter efeito sobre o perfil lipídico, associado com a redução do colesterol total e LDL (O'NEIL et al., 2012), assim como a diminuição do IMC, perímetro da cintura, e percentual de gordura corporal, além de menor risco de obesidade (O'NEIL et al., 2012; WANG et al., 2012).

Ademais, o consumo regular de suco de laranja (500 ml) pode afetar vários genes em leucócitos, apresentando um perfil anti-aterogênico e anti-inflamatório, que parece estar relacionado com um de seus flavonoides, a hesperidina (MILENKOVIC et al., 2011). Ainda, o suco de laranja pode reduzir as concentrações de marcadores inflamatórios como PCR, IL-6 e TNF- $\alpha$  em indivíduos com elevado risco cardiovascular (BUSCEMI et al., 2012). Em estudo agudo, o consumo do suco de laranja neutralizou o efeito pró-inflamatório do consumo de uma refeição com alto conteúdo de lipídios e carboidratos, inibindo a secreção de MMP-9 (metaloproteinase-9) e de endotoxinas, e a expressão de MMP-9, e TLR (receptores Toll-like) (GHANIM et al., 2010a).

Apesar dos efeitos benéficos, o consumo do suco de laranja também tem sido relacionado com maior risco de desenvolvimento de gota, associado ao seu conteúdo de frutose (17%) (CHOI; WILLETT; CURHAN, 2010). A frutose é um açúcar simples altamente lipogênico, com efeitos metabólicos importantes implicados no desenvolvimento da síndrome metabólica, como a resistência à insulina e dislipidemia (DEKKER et al., 2010). Além disso, modelos animais, apontam a frutose como uma potente molécula indutora da inflamação capaz de ativar a inflamação via NF- $\kappa$ B, aumentar a expressão e a síntese de TNF- $\alpha$  e da molécula de adesão ICAM-1 (DEKKER et al., 2010; GLUSHAKOVA et al., 2008). Contudo, em um estudo clínico, o consumo elevado consumo de frutose (150 g) não apresentou efeito inflamatório em indivíduos saudáveis, após 4 semanas de intervenção (SILBERNAGEL et al., 2013). Ademais, o seu consumo em baixas doses (12 g) diminuiu o perfil inflamatório (PCR e ICAM-1), comparado a doses moderadas (60 g), em pacientes com doença renal crônica (BRYMORA et al., 2012). Dessa forma, ao avaliar o efeito inflamatório do consumo do suco de laranja é também interessante avaliar os efeitos associado ao seu conteúdo de frutose.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar o efeito do consumo de diferentes ácidos graxos (AGS e AGMI) e diferentes fontes de frutose (suco de laranja e bebida à base de frutose) sobre os marcadores pós-prandiais inflamatórios em mulheres adultas saudáveis, com peso normal ou excesso de peso.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Caracterizar as voluntárias em relação às variáveis antropométricas, clínicas e metabólicas.
- Determinar as concentrações plasmáticas de marcadores inflamatórios (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- $\gamma$ , TNF e PCR) antes (em jejum) e depois da ingestão das refeições testes.
- Avaliar se existe diferença (em jejum e no período pós-prandial) nos marcadores inflamatórios de acordo com a refeição teste (com alto conteúdo em AGS ou em AGMI).
- Avaliar se existe diferença (em jejum e no período pós-prandial) nos marcadores inflamatórios de acordo com o tipo de bebida (suco de laranja, bebida à base de frutose ou água).
- Avaliar se existe diferença (em jejum e no período pós-prandial) nos marcadores inflamatórios de acordo com estado nutricional das voluntárias (eutrofia frente a sobrepeso/ obesidade), para cada refeição teste.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Casuística

O estudo foi delineado para recrutar 80 mulheres adultas (com idade entre 20 a 40 anos), pré-menopáusicas e não gestantes, sendo 40 mulheres com peso normal (Índice de massa corporal – IMC entre 18,5-24,9 kg/m<sup>2</sup>) e 40 com sobrepeso / obesidade grau I (IMC entre 25,0-35,0 kg/m<sup>2</sup> e alto conteúdo de gordura corporal - >30%) (BRAY; BOUCHARD; JAMES, 1998), residentes na cidade de Viçosa – MG.

Os critérios de inclusão na pesquisa foram os seguintes:

- Idade compreendida entre 20-40 anos;
- Não estar em período gestacional, lactância ou menopausa;
- Não sofrer nenhum processo infeccioso que possa afetar de forma aguda ao estado inflamatório nos dias de experimento;
- Não ter nenhuma doença inflamatória, hormonal, cardíaca, respiratória, renal ou hepática, ou ainda, alguma doença gastrointestinal que altere os processos de digestão e absorção de nutrientes;
- Não usar medicação que afete o metabolismo, a composição corporal ou algum outro parâmetro avaliado na pesquisa;
- Não fumantes;
- Não ter antecedentes de alcoolismo e droga-dependência;
- Não haver estado em tratamento nutricional para perda de peso e ter peso estável ( $\geq 5\%$  do peso habitual) nos últimos três meses;
- Não ter alergia e/ou aversão à oleaginosas, azeite, azeitona e abacate;
- Não ser atleta (serão incluídos indivíduos classificados como irregularmente ativos e sedentários de acordo com o Questionário Internacional de Atividade Física – IPAQ);
- Ter disponibilidade para comparecer ao Laboratório de Metabolismo Energético e Composição Corporal (LAMECC) em quatro encontros, sendo três deles no horário de 7:00 às 12:00.

## **4.2 Aspectos Éticos**

Os procedimentos descritos no presente projeto de pesquisa estão de acordo com a Resolução CNS/466 de 2012, que trata dos princípios éticos na pesquisa. Para realização do projeto, todas suas etapas foram aprovadas previamente (Of. Ref. N° 184/2011 e 542.585/2014) (Anexo I) pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Viçosa (UFV). As mulheres selecionadas para o estudo receberam informações sobre o objetivo do estudo e os procedimentos a serem realizados. E aquelas que aceitaram as condições, termos e objetivos do estudo, bem como a realização de testes bioquímicos, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido em duas vias (Anexo A), de acordo com os princípios da Declaração de Helsinki.

## **4.3 Desenho do estudo**

Trata-se de um ensaio clínico agudo (pós-prandial), cruzado, aleatorizado e controlado. As voluntárias foram recrutadas por meio de imprensa, cartazes afixados em comércio local, rádio, redes sociais e página *web* da UFV, deixando à disposição um telefone e um e-mail de contato. As mulheres interessadas em participar do estudo compareceram em quatro ocasiões no Laboratório de Metabolismo Energético e Composição Corporal (LAMECC) do Departamento de Nutrição e Saúde (DNS) da UFV, onde foi realizado o estudo.

O primeiro contato com as voluntárias foi através de uma triagem telefônica, na qual todas aquelas interessadas em participar do estudo, tiveram agendada uma primeira visita ao LAMECC. Nessa primeira visita, as mulheres receberam uma folha informativa sobre o estudo para leitura. Ao aceitarem participar do estudo, elas assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo A), e responderam a um questionário semiestruturado em relação à sua história clínica (Anexo B).

O nível de atividade física foi avaliado através do Questionário Internacional de Atividade Física (IPAQ – Anexo C). Sendo incluídas as voluntárias classificadas como sedentárias ou irregularmente ativas, de acordo com a correção deste questionário.

As voluntárias selecionadas, de acordo com todos os critérios de inclusão, receberam uma folha (Anexo D) com instruções e recomendações (Anexo E) sobre sua alimentação nos dias anteriores a segunda visita.

Na segunda visita, as voluntárias compareceram ao LAMECC em jejum de 12 horas, às 07:00 h da manhã. Neste momento, foram realizadas as medidas antropométricas, aferição da pressão arterial, de acordo com o protocolo do LAMECC. Por volta das 7:30h, as voluntárias receberam uma das três refeições testes, que foi previamente selecionada de forma aleatória, por meio do *web* site [www.random.org](http://www.random.org). As voluntárias foram instruídas a realizar a refeição em, no máximo, 30 minutos.

Para avaliação pós-prandial as voluntárias ficaram em repouso, no LAMECC, sem consumir outro alimento durante 5h, mas podendo beber água. Nesse período, foram realizadas coletas de sangue por técnicos em enfermagem capacitados, em tubos EDTA (4mL) no tempo T0 (jejum) e nos tempos T2, T3 e T5 que correspondem a 2, 3 e 5 h pós-prandiais. Após, a extração de sangue, foram realizados os procedimentos para a adequada separação e conservação das amostras biológicas (ver tópico: Coleta e preparação de amostras de sangue).

As terceira e quarta visitas foram agendadas com um intervalo mínimo de uma a duas semanas (período de *washout* entre as refeições testes). Nessas visitas, as voluntárias receberam a segunda e terceira refeições testes, respectivamente, onde, todos os procedimentos serão realizados igualmente aos da segunda visita. Os encontros foram agendados de modo que a voluntária esteja fora do período menstrual. Os dados antropométricos, pressão arterial e, aquelas informações referentes à adequada coleta de dados foram registradas no caderno de registro de dados, devidamente codificados com um número para cada voluntário, para garantir a confidencialidade (Anexo F).

A primeira fase do estudo foi realizada em 2012 (Projeto número: Of. Ref. N° 184/2011), e fez parte da dissertação intitulada “Resposta pós-prandial de marcadores metabólicos e inflamatórios ao consumo de gordura saturada e suco de laranja em mulheres eutróficas e com excesso de peso” defendida em 2013 por Raquel Cristina Lopes Assis Coelho. Neste estudo, participaram 36 mulheres com idade média de  $24 \pm 4$  anos, sendo 21 eutróficas ( $22,0 \pm 1,8 \text{ kg/m}^2$ ) e 15 com excesso de peso ( $31,2 \pm 3,7 \text{ kg/m}^2$ ). Todas as voluntárias foram selecionadas de acordo com critérios descritos anteriormente e submetidas aos mesmos procedimentos descritos aqui. Em 2015, foi dada continuidade ao projeto (Projeto número: Of. Ref. N° 40.512466850/2015), sendo realizada uma segunda fase, desta vez com a avaliação do consumo de AGMI e suco de laranja em mulheres eutróficas e com excesso de peso. A diferença entre os estudos reside no tipo

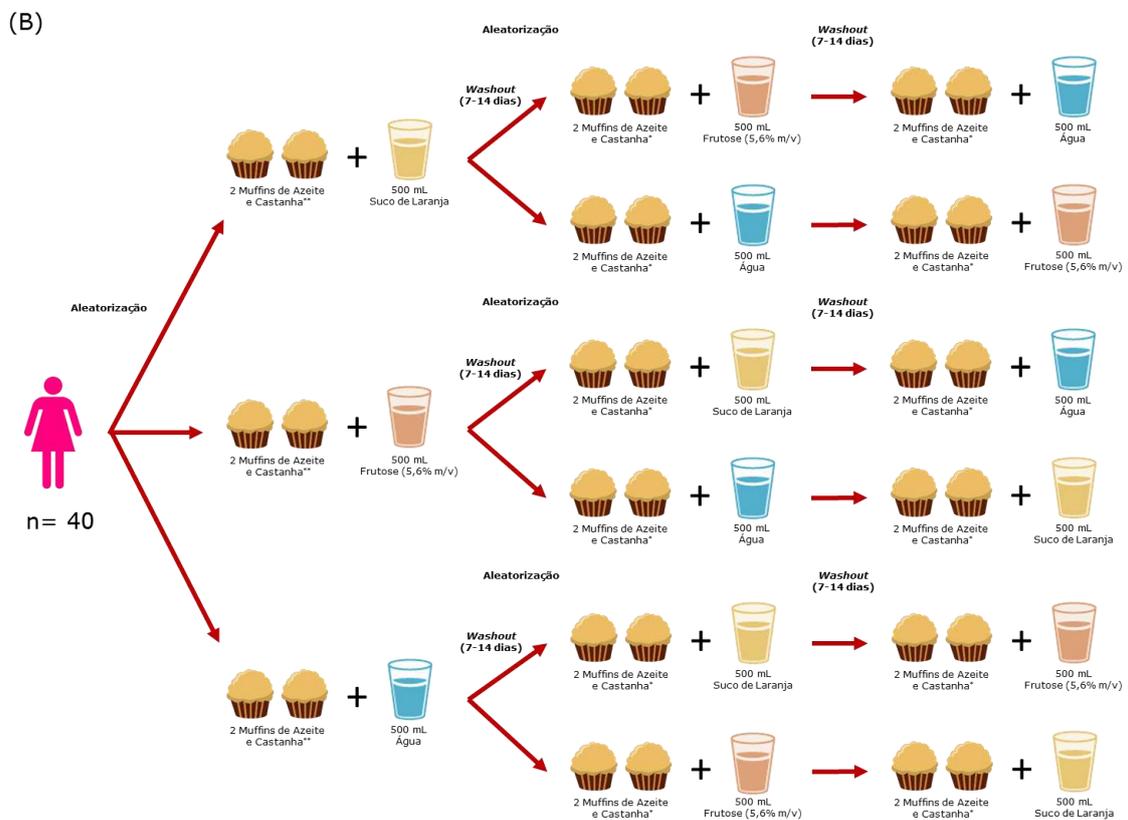
de refeição teste recebida (ver tópico: Refeições teste) e no número de visitas realizadas durante o estudo, que foi menor no primeiro estudo devido ao menor número de refeições teste oferecidas.

#### **4.4 Refeições teste**

Nos dois dias que precederam a refeição teste, as voluntárias consumiram uma “dieta branca”, que consistiu no consumo restrito de alimentos, como frutas e hortaliças fontes de vitaminas, minerais e compostos fenólicos que poderiam ter influência sobre os resultados analisados. Essas orientações, como citadas anteriormente, foram entregues às voluntárias, antes da segunda visita (Anexo E).

Na primeira fase do estudo, as voluntárias receberam uma refeição com alto conteúdo de AGS (37% do valor calórico total). Essa refeição foi composta por 2 muffins à base de bacon, queijo e manteiga, totalizando 2 unidades de 90 g cada e 1.000 kcal (Anexo G). As refeições foram acompanhadas de 500 ml de suco de laranja (teste), ou de água (controle negativo). Já na segunda fase, as voluntárias receberam uma refeição com alto conteúdo de AGMI (53% do valor calórico total), composta de 2 muffins à base de azeite de oliva e castanhas, totalizando 2 unidades de 90g cada e 1.000 Kcal (Anexo H). As refeições foram acompanhadas de 500 ml de suco de laranja (teste), de uma bebida à base de frutose (controle), ou de água (controle negativo) (Figura 1). O objetivo da primeira fase foi verificar o efeito do suco de laranja sobre os marcadores inflamatórios, sendo que na segunda fase foi incluído um teste à base de frutose para avaliar também o efeito isolado de um de seus constituintes.

Para evitar variabilidade sazonal e entre lotes e variedades da fruta foi utilizado suco pronto, industrializado, adquirido no comércio local. A bebida à base de frutose possuía teor de frutose semelhante ao suco de laranja de 5,6% (m/v), os métodos utilizados na sua quantificação são descritos a seguir.



**Figura 1.** Desenho experimental do estudo.

(A) Primeira fase do estudo: intervenção aguda com refeição de alto conteúdo de AGS; (B) Segunda fase: intervenção aguda com refeição de alto conteúdo de AGMI; \* Muffins de Bacon e Queijo (1.000kcal): 16% carboidratos, 6% proteínas e 78% lipídios, com 37% do VCT de AGS; \*\* Muffins de Azeite e Castanha (1.000kcal): 19% carboidratos, 4% proteínas e 77% lipídios, com 53% do VCT de AGMI; % referente ao valor calórico total (VCT) ingerido.

#### 4.5 Quantificação da frutose

A análise dos açúcares totais no suco de laranja foi realizada utilizando-se dois métodos, um titulométrico (determinação de açúcares redutores totais) e outro colorimétrico (determinação de açúcares solúveis totais). A quantidade de frutose adicionada na bebida teste à base de frutose, então, foi calculada a partir da média dos valores obtidos nos dois métodos, descritos a seguir.

Para determinação de açúcares totais (Lane e Eynon, 1934) foi pesado, em balança analítica, 5g de suco de laranja, em duplicata. A esta quantidade adicionou-se 50 ml de água morna destilada e a mistura foi aquecida em banho-maria a 60°C por 10 minutos.

Em seguida, retirou-se a amostra do banho-maria e adicionou-se 2 ml de ácido clorídrico, levando-a ao banho-maria por 60 minutos. A mistura foi transferida para um balão volumétrico de 250 ml, adicionando-se 2 ml de ferrocianeto de potássio a 15% e 2 ml de sulfato de zinco a 30%, agitando-se e completando o volume. Com um filtro de papel, a mistura foi filtrada e transferida para uma bureta de 50mL.

Em um balão de fundo redondo foi pipetado 5 ml de Fehling A e 5 ml de Fehling B, adicionando 40 ml de água destilada. Essa mistura foi aquecida até ebulição. A amostra foi gotejada na solução até que esta adquirisse cor azulada.

Após esse procedimento, manteve-se a ebulição e adicionou-se uma gota azul de metileno a 1%. A amostra foi gotejada novamente até que a solução se tornasse vermelho tijolo, sendo reduzida a óxido cuproso. O volume de amostra utilizado na titulação foi anotado para posterior cálculo de açúcares totais.

O cálculo foi realizado a partir da seguinte fórmula:

Açúcares totais (%) =  $100 \times 100 \times Fc / P \times V$ , onde:

Fc = Fator de correção equivalente a 0,05

P = Massa em gramas da amostra

V = Volume em ml gasto na titulação

Os açúcares solúveis totais foram quantificados pelo método fenol-sulfúrico (Dubois et al., 1956), com adaptações. Em cada réplica, foram pipetados 0,25 ml do extrato diluído em tubo de ensaio. Em seguida, foram adicionados 0,25 ml de fenol a 5% e os tubos foram homogeneizados. Posteriormente, a cada um dos tubos foram adicionados 1,25 ml de ácido sulfúrico concentrado, sendo novamente agitados e levados a banho-maria a 30°C, por 20 minutos, sempre em duplicata. Em seguida, foi realizada a

leitura da absorvância a 490 nm em espectrofotômetro, modelo UV1601 (Shimadzu). Os valores obtidos foram comparados com a curva-padrão de sacarose previamente preparada.

## **4.6 Variáveis analisadas**

### ***4.6.1 Antropometria e composição corporal e pressão arterial***

As medidas antropométricas (peso, altura, e perímetros da cintura e do quadril) foram obtidos com indivíduos trajando roupas leves e sem sapatos, seguindo recomendações padronizadas (NHANES, 2013). O peso das voluntárias foi aferido usando equipamento de bioimpedância elétrica tetrapolar (InBody, modelo 230, BiospaceCo., Ltd), com capacidade máxima de 250 kg. A estatura foi aferida utilizando estadiômetro de parede (Seca, modelo 206, Hamburg, Germany), com extensão máxima de 2 metros, precisão de um milímetro. O Índice de Massa Corporal (IMC) foi calculado por meio do peso dividido pela altura ao quadrado ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) (WHO, 2010).

Os perímetros da cintura (ponto médio entre a crista ilíaca e a última costela e acima da crista ilíaca), e do quadril foram aferidos utilizando uma fita métrica flexível e inelástica, subdividida em milímetros.

O percentual de gordura corporal total foi obtido mediante análise de bioimpedância elétrica tetrapolar (InBody, modelo 230, BiospaceCo., Ltd), seguindo o protocolo proposto pelo fabricante.

A pressão arterial sistólica e diastólica foi aferida através de monitor de braço automático (Omron, modelo BP742, Omron Healthcare, Inc.), com precisão de 3 mmHg, seguindo protocolo proposto pelo fabricante.

### ***4.6.2 Coleta de sangue e preparo de amostras***

As amostras sanguíneas foram extraídas após jejum de 12 horas, e após 2, 3, e 5h as refeições mediante punção endovenosa na veia antecubital mediana, utilizando sistema de vácuo VACUETTE®. Para a punção venosa foi utilizado o cateter venoso periférico SCALP®, seringa com agulha hipodérmica ou ainda sistema à vácuo com coletas sucessivas. A escolha do método foi feita pelo técnico em enfermagem, de acordo com

cada voluntária. Após a coleta em tubos (VACUETTE®, K3E K3EDTA, 4 ml), procedeu-se à centrifugação (3.500 rpm, 4° C, 15 min), separação do plasma, e identificação das amostras nos Laboratórios de Análises Clínicas (LAC) do DNS/UFV. Todas as amostras foram armazenadas a -80°C até o momento das análises.

#### **4.6.3 Determinação de marcadores inflamatórios plasmáticos**

O equipamento de Citometria de Fluxo FACVerse™ (BD Immunocytometry Systems), do Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM-UFV) foi utilizado para determinar as concentrações plasmáticas de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- $\gamma$  e TNF analisados com o kit *Human Th1/Th2/Th17 Kit* (BD Biosciences, EUA), o qual permite a identificação simultânea das citocinas citadas em cada amostra (50  $\mu$ L) de plasma. Os dados obtidos serão analisados no *software* FCAP Array™.

Concentrações plasmáticas de PCR foram mensuradas por meio de imunoensaio turbidimétrico (kit CRP, Beckman Coulter, Inc.) em laboratório de análises clínicas terceirizado.

#### **4.7 Análise estatística**

O teste t de Student ou Mann-Whitney, quando apropriado, foram utilizados para comparar diferenças nas médias das características basais das participantes do estudo que consumiram dietas ricas em AGS daquelas que consumiram dietas ricas em AGMI.

O teste de ANOVA de medidas repetidas de dois fatores (tempo, dieta), seguido do posthoc Bonferroni, foi aplicado para testar o efeito do tempo, da dieta e também da interação dos dois fatores (dieta\*tempo) nas concentrações de citocinas e PCR, bem como o delta entre valores finais e iniciais (final-inicial) desses parâmetros. O teste foi aplicado separadamente para o grupo que consumiu uma refeição com alto conteúdo de AGS, e para o grupo que recebeu uma dieta com alto conteúdo de AGMI.

O método trapezoidal foi utilizado para calcular a área abaixo da curva (AUC) da concentração de citocinas e PCR ao longo do tempo (0-5h) utilizando o software Prism, versão 5 (Prism, GraphPad Software, São Diego, EUA). O teste de ANOVA de medidas repetidas de um fator (dieta), seguido do posthoc Bonferroni, foi aplicado para testar diferenças significativas na AUC da concentração de citocinas e PCR entre as dietas ricas

em AGMI. E o teste t Student pareado foi aplicado para testar diferenças significativas na AUC da concentração de citocinas e PCR entre as dietas ricas em AGS.

O teste de ANCOVA foi aplicado para avaliar diferenças na AUC ajustada de citocinas e PCR, tendo os valores iniciais das citocinas e PCR como co-variáveis, uma vez que os valores iniciais diferiram entre os grupos que receberam dietas ricas em AGS e AGMI, e aqui buscou-se comparar os dois grupos concomitantemente.

As voluntárias foram classificadas de acordo com seu IMC em eutróficas ( $<25,0$  kg/m<sup>2</sup>) e em excesso de peso ( $IMC \geq 25,0$  kg/m<sup>2</sup>), e também de acordo com seu percentual de gordura corporal, em normal ( $<30\%$ ) ou excesso de gordura corporal ( $\geq 30\%$ ). Todos os testes estatísticos foram realizados considerando o grupo como um todo, ou dividido pela classificação de IMC e também do percentual de gordura corporal.

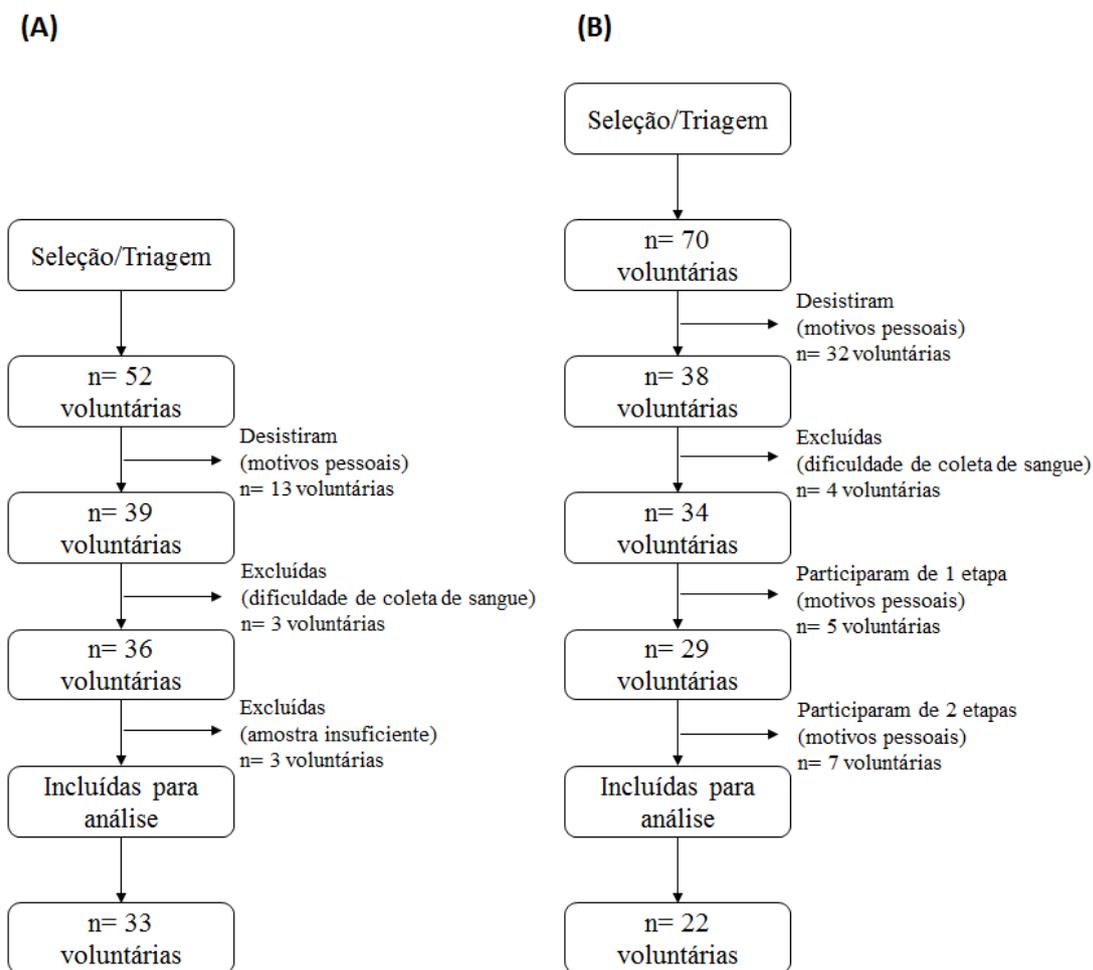
As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), versão 20.0 (SPSS, Chicago, EUA), adotando-se como nível de significância estatística  $\alpha = 0,05$  (5% de probabilidade) para todas as comparações. Os gráficos foram produzidos com o auxílio do software Prism, versão 5 (Prism, GraphPad Software, São Diego, EUA). Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão (EP).

## 5. RESULTADOS

Na primeira fase do estudo, foi avaliado o consumo de uma refeição com alto conteúdo de AGS acompanhada de suco de laranja ou água foram selecionadas/triadas 52 voluntárias que atendiam os critérios de inclusão. Por motivos pessoais, 13 voluntárias abandonaram o estudo. Ainda, foram excluídas 3 voluntárias, por dificuldade de coleta de sangue. Outras 3 voluntárias participaram do estudo, mas no presente trabalho foram excluídas por quantidade insuficiente de amostras para análise. Desse modo 33 voluntárias foram incluídas para análise dos marcadores inflamatórios no período pós-prandial após o consumo de dietas com alto conteúdo de AGS acompanhadas de suco de laranja ou água. Já na segunda fase do estudo, foi avaliado o consumo de uma refeição com alto conteúdo de AGMI acompanhado suco de laranja, bebida à base de frutose ou água foram selecionadas/triadas 70 voluntárias que atendiam os critérios de inclusão. Por motivos pessoais, 32 voluntárias abandonaram o estudo. Por dificuldades de coleta de sangue, 4 voluntárias foram excluídas. Cinco voluntárias participaram apenas de uma etapa do estudo, e outras 7 voluntárias participaram de duas etapas. Dessa forma, foram incluídas 22 voluntárias para análise dos marcadores inflamatórios após o consumo de dietas ricas em AGMI acompanhadas de suco de laranja, bebida à base de frutose ou água (Figura 2).

No total, participaram do estudo 55 voluntárias. No grupo das que consumiram a refeição com alto conteúdo de AGS, a média de idade foi de  $27,18 \pm 0,82$  anos, IMC de  $25,96 \pm 0,67$  kg/m<sup>2</sup> e percentual de gordura corporal de  $30,57 \pm 0,83$  %. Dezoito voluntárias (54,5%) possuíam percentual de gordura corporal normal (<30%) e 15 voluntárias (45,5%) excesso de gordura corporal ( $\geq 30\%$ ). Já aquelas que participaram do consumo de refeições ricas em AGMI, possuíam idade média de  $27,00 \pm 0,69$  anos, IMC de  $23,41 \pm 0,47$  kg/m<sup>2</sup> e percentual de gordura corporal de  $30,15 \pm 0,93$  %, sendo que metade das 22 participantes possuía percentual de gordura normal (<30 %) ou excesso de gordura corporal ( $\geq 30\%$ ). O perfil de citocinas inflamatórias inicial (jejum) foi diferente entre os grupos, sendo maior para aquelas voluntárias que participaram do estudo envolvendo o consumo de refeição com alto conteúdo de AGS em relação ao grupo que consumiu AGMI. A média da concentração de PCR, no entanto, foi a mesma para ambos os grupos estudados (

Tabela I).



**Figura 2.** Fluxograma da seleção e participação das voluntárias no estudo.

(A) primeira fase do estudo que avaliou o consumo de dietas com alto conteúdo de AGS associado ao consumo de suco de laranja ou água; (B) segunda fase do estudo que avaliou o consumo de dietas com alto conteúdo de AGMI associado ao consumo de suco de laranja, bebida à base de frutose ou água; AGS: ácidos graxos saturados; AGMI: ácidos graxos monoinsaturados.

**Tabela 1.** Características basais das voluntárias

Características	Voluntárias do	Voluntárias do	P
	estudo AGS (n=33)	estudo AGMI (n=22)	
Idade (anos)	27±0,8	27±0,7	0,661
Peso (kg)	68,1±1,9	60,4±1,0	<b>0,012</b>
Altura (m)	1,62±0,01	1,61±0,01	0,556
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	25,96±0,67	23,41±0,47	<b>0,010</b>
Perímetro da cintura (cm)	82,0±1,7	79,8±1,2	0,276
Perímetro do quadril (cm)	98,6±1,1	98,8±0,8	0,460
Razão Cintura/Quadril	0,83±0,01	0,81±0,01	0,107
Gordura Corporal (%)	30,6±0,8	30,1±0,9	0,736
PAS (mmHg)	106±1	107±1	0,676
PAD (mmHg)	67±0,9	67±1	0,829
TNF (pg/ml)	6,5±1,4	0,2±0,1	<b>&lt;0,001</b>
IL-6 (pg/ml)	7,0±0,8	0,3±0,2	<b>&lt;0,001</b>
IL-10 (pg/ml)	4,8±0,7	0,2±0,1	<b>&lt;0,001</b>
IL-17A (pg/ml)	63,0±10,7	7,5±1,1	<b>&lt;0,001</b>
IFN-γ (pg/ml)	21,0±5,1	0,66±0,2	<b>&lt;0,001</b>
IL-4 (pg/ml)	4,7±1,1	0,1±0,1	<b>&lt;0,001</b>
IL-2 (pg/ml)	2,9±0,6	0,4±0,1	<b>&lt;0,001</b>
PCR (mg/L)	3,6±0,7	4,4±0,8	0,581

AGS: ácido graxo saturado; AGMI: ácido graxo monoinsaturado; IMC: índice de massa corporal; PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica. TNF: Dados expressos em média±EP. Teste t de Student ou Mann-Whitney, quando apropriado.

Ao comparar o efeito do consumo das refeições com alto conteúdo em AGS e AGMI, verificamos que os indivíduos que consumiram uma refeição com alto conteúdo de AGS apresentaram maiores valores médios de AUC ajustada, pelo valor de citocina basal, para as citocinas TNF, IL-6 e IL-10, independente da bebida que acompanhou a refeição. Ainda, a refeição com alto conteúdo de AGS acompanhada de água apresentou maiores valores médios de AUC ajustada para as citocinas IL-17A, IL-4 e IL-2, em relação às demais refeições ricas em AGMI acompanhadas de suco de laranja, bebida à

base de frutose ou água. E a AUC ajustada para a citocina IL-2 também foi maior para a refeição com alto conteúdo de AGS acompanhada de suco de laranja, comparada às refeições ricas em AGMI com bebida à base de frutose e água. Por outro lado, a AUC ajustada concentração de PCR foi menor para a refeição de AGS acompanhada de suco de laranja em comparação com a refeição com alto conteúdo de AGMI acompanhada de uma bebida à base de frutose ( $p=0,01$ ) (Tabela 2).

A variação da concentração de IL-17A plasmática, em relação aos valores basais – delta –, foi maior nos indivíduos que consumiram uma refeição com alto conteúdo de AGS acompanhada de água, em relação aqueles que consumiram suco de laranja ( $p=0,02$ ) (Gráfico 1).

A concentração de citocinas plasmáticas nos indivíduos que consumiram uma refeição com alto conteúdo de AGS, apresentou um efeito temporal na concentração da citocina plasmática IL-6 ( $p=0,02$ ), que aumentou sua concentração entre 3 e 5 horas pós-prandiais ( $p=0,049$ ), independente da bebida (suco de laranja ou água) (Gráfico 2).

Nos indivíduos que consumiram uma refeição com alto conteúdo de AGMI acompanhada de suco de laranja, bebida à base de frutose ou água, a concentração da citocina plasmática IL-6 também apresentou efeito temporal ( $p<0,001$ ), com aumento entre as 3 e 5 horas pós-prandiais. Contudo, não foi verificada um efeito da interação dieta\*tempo. De forma semelhante, o mesmo foi verificado para variação desta citocina, em relação aos valores basais ( $p=0,02$ ) (Gráfico 3).

Área abaixo da curva de citocinas plasmáticas e PCR nos indivíduos que consumiram uma refeição com alto conteúdo de AGS acompanhada de suco de laranja ou água, no intervalo de 5 horas pós-prandiais, não apresentou diferença estatísticas significativas entre as refeições. Da mesma forma, a área abaixo da curva de citocinas plasmáticas nos indivíduos que consumiram uma refeição com alto conteúdo de AGMI acompanhada de suco de laranja, bebida à base de frutose ou água, no intervalo de 5 horas pós-prandiais, não apresentou diferença significativa para as diferentes refeições recebidas (dados não apresentados).

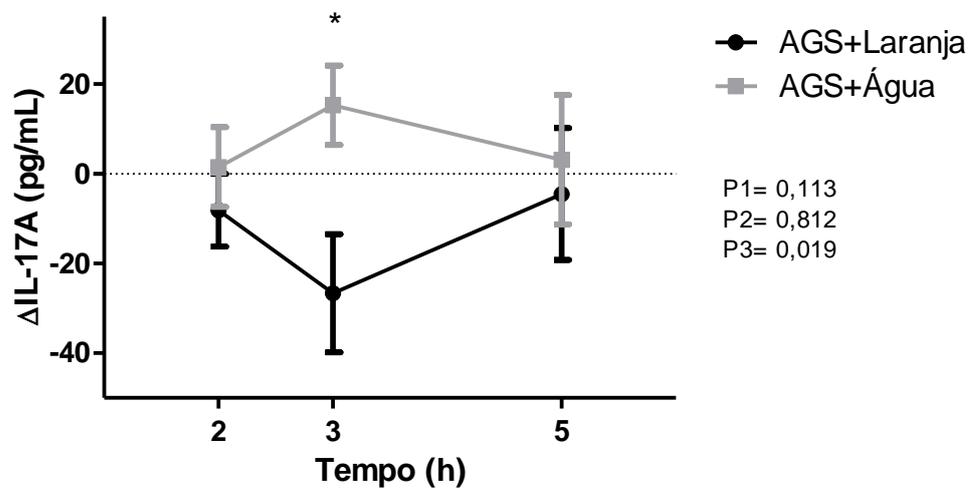
Ao se dividir os grupos de acordo com estado nutricional em eutróficas ( $<25,0$   $\text{kg/m}^2$ ) ou excesso de peso ( $\geq 25,0$   $\text{kg/m}^2$ ), e também em percentual de gordura normal ( $<30\%$ ) ou excesso de gordura corporal ( $\geq 30\%$ ), nós não observamos diferenças estatísticas significantes na resposta inflamatória pós-prandial das voluntárias que

consumiram uma refeição com alto conteúdo de AGS ou AGMI, acompanhadas ou não da ingestão de suco de laranja (dados não mostrados). Portanto, os dados foram apresentados para o grupo como um todo, sem considerar as classificações descritas acima.

**Tabela 2.** Área abaixo da curva de citocinas plasmáticas nos indivíduos que consumiram uma refeição com alto conteúdo de ácidos graxos saturados ou monoinsaturados acompanhada de suco de laranja, bebida à base de frutose ou água, no intervalo de 5 horas pós-prandiais.

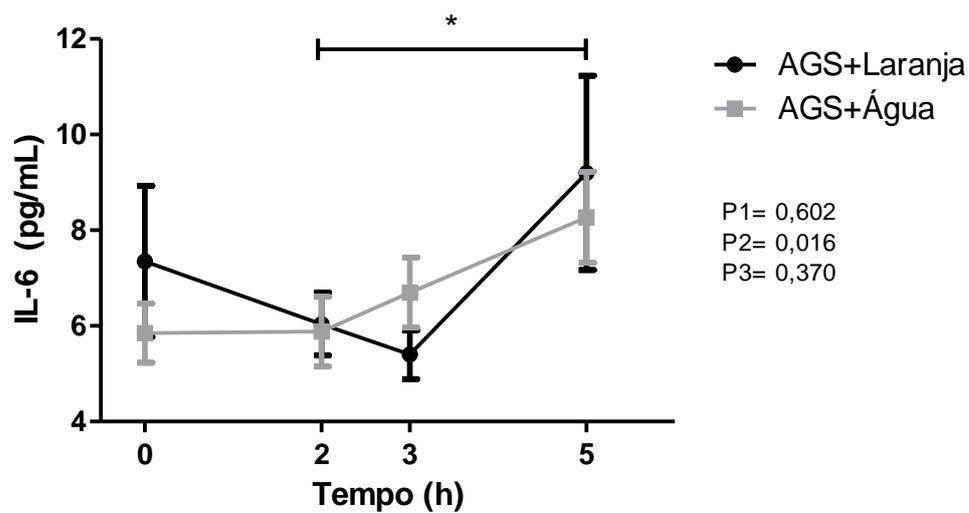
Marcadores/Grupos	AGMI+Laranja	AGMI+Frutose	AGMI+Água	AGS+Laranja	AGS+Água	Valores de p
AUC TNF (pg/ml)	4,9 ± 1,7 <sup>a</sup>	4,8 ± 1,7 <sup>a</sup>	4,8 ± 1,7 <sup>a</sup>	15,1 ± 1,5 <sup>b</sup>	16,8 ± 1,4 <sup>b</sup>	<0,001
AUC IL6 (pg/ml)	10,8 ± 1,9 <sup>a</sup>	10,8 ± 1,8 <sup>a</sup>	10,3 ± 1,9 <sup>a</sup>	24,6 ± 1,6 <sup>b</sup>	27,0 ± 1,5 <sup>b</sup>	<0,001
AUC IL10 (pg/ml)	5,6 ± 1,6 <sup>a</sup>	5,3 ± 1,59 <sup>a</sup>	5,2 ± 1,6 <sup>a</sup>	13,8 ± 1,4 <sup>b</sup>	16,4 ± 1,3 <sup>b</sup>	<0,001
AUC IL17 (pg/ml)	102,6 ± 22,9 <sup>a</sup>	97,1 ± 22,7 <sup>a</sup>	99,3 ± 22,8 <sup>a</sup>	167,3 ± 10,4 <sup>a,b</sup>	216,3 ± 18,7 <sup>b</sup>	<0,001
AUC IFN (pg/ml)	25,5 ± 7,5 <sup>a</sup>	24,5 ± 7,5 <sup>a</sup>	24,6 ± 7,5 <sup>a</sup>	37,7 ± 6,6 <sup>a</sup>	49,5 ± 6,2 <sup>a</sup>	0,037
AUC IL4 (pg/ml)	4,1 ± 1,6 <sup>a</sup>	3,9 ± 1,6 <sup>a</sup>	3,9 ± 1,6 <sup>a</sup>	9,7 ± 1,4 <sup>a,b</sup>	12,0 ± 1,3 <sup>b</sup>	<0,001
AUC IL2 (pg/ml)	4,6 ± 1,1 <sup>a,c</sup>	3,4 ± 1,1 <sup>a</sup>	3,6 ± 1,1 <sup>a</sup>	8,8 ± 1,0 <sup>b,c</sup>	10,4 ± 0,9 <sup>b</sup>	<0,001
AUC PCR (mg/L)	20,6 ± 1,2 <sup>a</sup>	23,7 ± 1,3 <sup>a</sup>	19,7 ± 1,2 <sup>a</sup>	18,2 ± 1,0 <sup>b</sup>	19,7 ± 1,1 <sup>a</sup>	0,024

AGMI: ácidos graxos monoinsaturados; AGMI+Laranja: refeição com alto conteúdo de AGMI acompanhada de suco de laranja; AGMI+Frutose: refeição com alto conteúdo de AGMI acompanhada de bebida à base de frutose; AGMI+Água: refeição com alto conteúdo de AGMI acompanhada de água; AGS: ácidos graxos saturados; AGS+Laranja: refeição com alto conteúdo de AGS acompanhada de suco de laranja; AGS+Água: refeição com alto conteúdo de AGS acompanhada de água; AUC: área abaixo da curva. Dados expressos em média ajustada (pelo valor de citocina basal) ± EP. Letras iguais representam ausência de diferença estatística ( $p > 0,05$ ). Teste estatístico ANCOVA a um fator e Post-Hoc de Bonferroni.



**Gráfico 1.** Variação da concentração plasmática de IL-17A após o consumo de uma refeição com alto conteúdo de ácidos graxos saturados acompanhada de suco de laranja ou água.

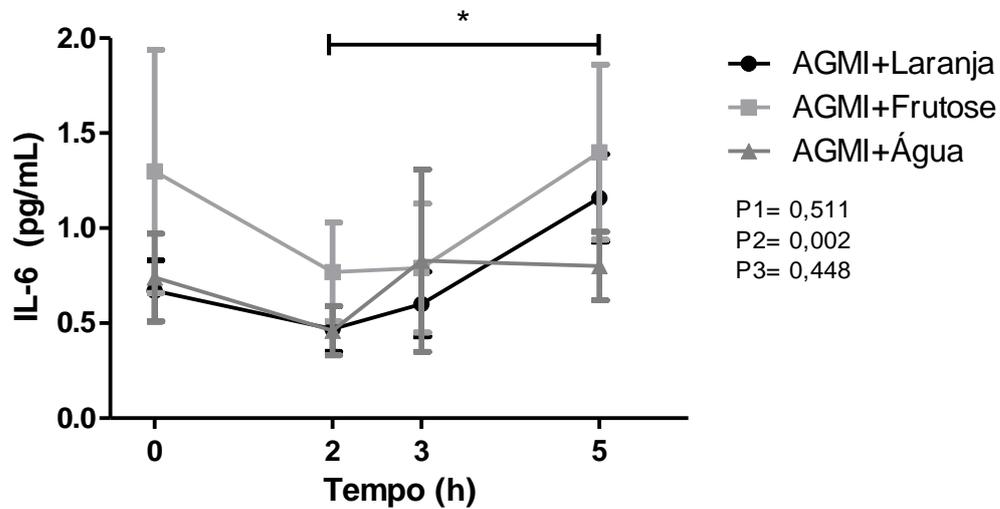
AGS: ácidos graxos saturados; AGS+Laranja: refeição com alto conteúdo de AGS acompanhada de suco de laranja; AGS+Água: refeição com alto conteúdo de AGS acompanhada de água;  $\Delta$ IL-17A = IL-17A(T(h)) – IL-17A(T(0h)); T0: basal (jejum 12 horas). Dados expressos em média  $\pm$  EP. Teste de ANOVA de medidas repetidas dois fatores. P1: efeito da dieta. P2: efeito do tempo. P3: interação dieta\*tempo. \*p=0,04 AGS+Laranja vs. AGS+Água.



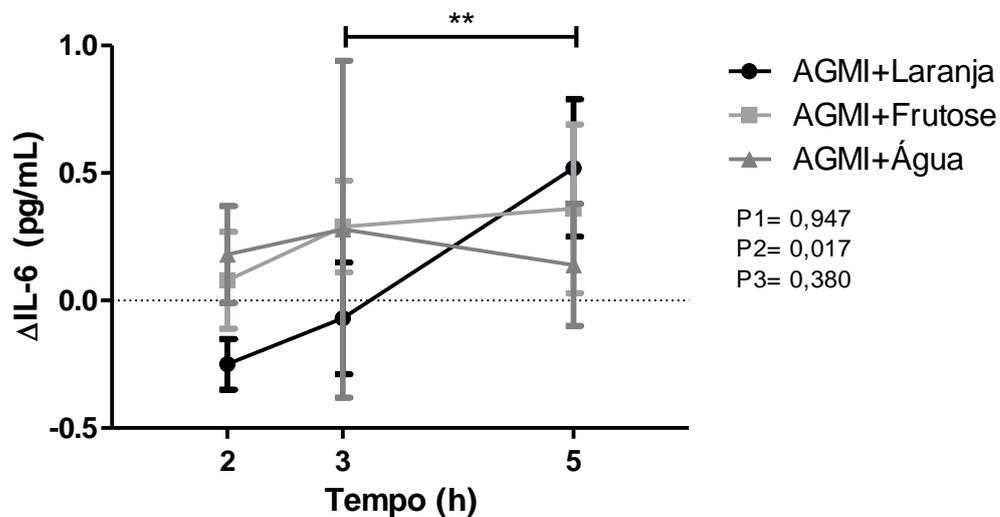
**Gráfico 2.** Concentração plasmática de IL-6 após o consumo de uma refeição com alto conteúdo de ácidos graxos saturados acompanhada de suco de laranja ou água.

AGS: ácidos graxos saturados; AGS+Laranja: refeição com alto conteúdo de AGS acompanhada de suco de laranja; AGS+Água: refeição com alto conteúdo de AGS acompanhada de água. Dados expressos em média  $\pm$  EP. Teste de ANOVA de medidas repetidas dois fatores. P1: efeito da dieta. P2: efeito do tempo. P3: interação dieta\*tempo. \*p=0,049 T2 vs. T5.

(A)



(B)



**Gráfico 3.** IL-6 após o consumo de uma refeição com alto conteúdo de ácidos graxos monoinsaturados acompanhada de suco de laranja, bebida à base de frutose ou água.

(A) Concentração plasmática de IL-6 aumentou significativamente ( $p=0,002$ ) entre os tempos 2h e 5h (ANOVA de medidas repetidas dois fatores seguido pelo posthoc Bonferroni); (B) Variação da concentração plasmática de IL-6 aumentou significativamente ( $p=0,005$ ) entre os tempos 3h e 5h (ANOVA de medidas repetidas dois fatores seguido pelo posthoc Bonferroni). AGMI: ácidos graxos monoinsaturados; AGMI+Laranja: refeição com alto conteúdo de AGMI acompanhada de suco de laranja; AGMI+Frutose: refeição com alto conteúdo de AGMI acompanhada de bebida à base de frutose; AGMI+Água: refeição com alto conteúdo de AGMI acompanhada de água;  $\Delta IL-6 = IL-6(T(h)) - IL-$

6(T(0h)); T0: basal (jejum 12 horas). Dados expressos em média  $\pm$  EP. Teste de ANOVA de medidas repetidas dois fatores. P1: efeito da dieta. P2: efeito do tempo. P3: interação dieta\*tempo. \*p=0,002 2h vs. 5h; \*\*p=0,005 3h vs. 5h.

## 6. DISCUSSÃO

Após o consumo agudo de uma refeição com alto conteúdo de AGS, foram observados maiores valores para AUC ajustada para citocinas TNF, IL-6 e IL-10, comparadas às refeições com alto conteúdo de AGMI, independente do tipo de bebida que acompanhou essas refeições. Ainda, a refeição com alto conteúdo de AGS acompanhada de água, mas não de suco de laranja, apresentou maiores valores de AUC ajustada para citocinas IL-17A, IL-4 e IL-2, em relação às demais refeições com alto conteúdo de AGMI acompanhadas de suco de laranja, bebida à base de frutose ou água. Dessa forma, nós observamos que o consumo de uma refeição com alto conteúdo de AGS favoreceu um perfil mais pró-inflamatório, em relação à uma refeição com alto conteúdo de AGMI. Ainda, o consumo de suco de laranja concomitante com a ingestão de uma refeição com alto conteúdo de AGS pareceu modular os efeitos pró-inflamatórios dessa refeição para um perfil menos inflamatório, inibindo a inflamação subclínica induzida pelo consumo dos AGS. Contudo esse efeito não foi verificado para a AUC ajustada da citocina IL-2, que foi maior para a refeição com alto conteúdo de AGS acompanhada de suco de laranja, comparada às refeições com alto conteúdo de AGMI com bebida à base de frutose e água.

De fato, o consumo de AGS está associado com efeitos nocivos para a saúde humana, especialmente relacionado ao seu efeito sobre a hipercolesterolemia, com impacto importante sobre a LDL (lipoproteína de baixa densidade) (SACKS; KATAN, 2002). Os AGS também podem influenciar os processos pró-aterogênicos e inflamatórios e está associado a concentrações elevadas de PCR (SANTOS et al., 2013; SANTOS; OLIVEIRA; LOPES, 2013), com o aumento da morbimortalidade cardiovascular (ERKKILÄ et al., 2008; HOOPER et al., 2016; SALTER, 2011). Por outro lado, a dieta Mediterrânea, tipicamente com alto conteúdo de AGMI, provenientes principalmente do azeite de oliva, apresenta vários benefícios à saúde, particularmente sobre a morbimortalidade cardiovascular (KONSTANTINIDOU et al., 2010). Os efeitos anti-inflamatórios e a redução do estresse oxidativo, associados ao seu consumo, são atribuídos a proteção observada (MARTÍNEZ-GONZÁLEZ et al., 2015). Dentre esses efeitos podemos citar a redução na concentração da PCR, IL-6, TNF- $\alpha$ , moléculas de adesão endotelial, quimiocinas, e receptores do TNF (HERMSDORFF et al., 2009; URPI-SARDA et al., 2012b).

Estudos de intervenção, com humanos, também corroboram o efeito pró-inflamatório dos AGS em relação ao AGMI. O consumo de uma dieta com alto conteúdo de AGS (35 % energia (E)) aumentou a expressão gênica de TNF- $\alpha$  (3h pós-prandiais), em relação a ingestão dos AGMI (36% E), proveniente principalmente do azeite de oliva extra virgem. Mas, não influenciou a concentração plasmática nos períodos pós-prandiais (3h, 6h e 9h) avaliados (JIMÉNEZ-GÓMEZ et al., 2009). Já em indivíduos com síndrome metabólica, houve aumento pós-prandial da expressão e da concentração plasmática de TNF- $\alpha$ , após 12 semanas de intervenção com dieta com alto conteúdo de AGS (16% E) ou AGMI (20% E). Essa expressão, no entanto, foi maior quando se consumiu uma refeição com alto conteúdo de AGS em relação a dieta com alto conteúdo de AGMI. Tal fato pode estar relacionado com o aumento e redução da expressão do NF- $\kappa$ B e da I $\kappa$ B- $\alpha$  respectivamente, após 4 horas pós-prandiais da refeição com alto conteúdo de AGMI (CRUZ-TENO et al., 2012). Por outro lado, em estudo com idosos que consumiram por um mês de dietas com alto conteúdo de AGS (35% E) ou de AGMI (36%), provenientes do azeite de oliva virgem, ocorreu redução nas concentrações de TNF- $\alpha$ , após 4h pós-prandiais, independente da refeição recebida. No entanto, a dieta AGS induziu uma maior expressão do fator NF- $\kappa$ B, enquanto que a dieta AGMI reduziu a expressão gênica do I $\kappa$ B- $\alpha$  (CAMARGO et al., 2012). Em homens saudáveis, o consumo agudo de uma refeição com alto conteúdo de AGS (35% E), mas não de azeite de oliva extra virgem (38% AGMI), ativou o NF- $\kappa$ B após 3 horas pós-prandiais (BELLIDO et al., 2004).

O consumo de uma refeição com alto conteúdo de gorduras ativa leucócitos, que em condições inflamatórias são recrutadas para o sítio da inflamação em um processo dependente de citocinas que controlam a secreção de selectinas, integrinas, moléculas de adesão nos leucócitos e células endoteliais, e dessa maneira contribui para a disfunção endotelial e progressão da aterosclerose (OOSTROM et al., 2004). A lipemia pós-prandial é descrita como uma das condições que favorecem a inflamação pós-prandial, a qual se associa com a ativação de leucócitos, e regulação positiva de genes inflamatórios nas células endoteliais (ALIPOUR et al., 2008). Contudo, as causas da inflamação pós-prandial ainda não estão bem esclarecidas. Outro mecanismo proposto para explicar a inflamação pós-prandial é a endotoxemia metabólica causada pelo aumento da endotoxina bacteriana (lipopolissacarídeo – LPS), encontrada em grandes quantidades no intestino humano, e que parece ser transportada do intestino para a circulação após o

consumo de uma dieta com alto conteúdo de lipídios, evidenciada pelo aumento da sua concentração circulante (ERRIDGE et al., 2007a). O LPS é um ligante natural do receptor tipo toll 4 (TLR4), e conseqüentemente um potente estimulador da cascata inflamatória que regula a expressão de diversos mediadores inflamatórios por meio da ativação do TLR4 (ROCHA et al., 2016). O consumo de AGS, frente ao consumo de dietas com alto conteúdo de AGMI, parece promover uma maior resposta inflamatória, com o aumento da expressão de vários genes de sinalização e recrutamento de células do sistema imune (como linfócitos, leucócitos e macrófagos) e também da expressão dos receptores TLR (DIJK et al., 2009). De fato, o AGS pode modular a ativação dos receptores TLR2 e TLR4, e promover a expressão de factores de transcrição pró-inflamatórios, tais como o NF- $\kappa$ B e da ciclo-oxigenase (LEE et al., 2003; WONG et al., 2009). Neste sentido, os AGS foram propostos como agonistas não microbianos do TLR na promoção da resposta inflamatória (ROCHA et al., 2016). Os AGS também podem desencadear a secreção de IL-1 $\beta$  através de mecanismos que envolvem a ativação do inflamassomo NLRP3 (domínio família de receptores NOD-like, pyrin contendo 3), enquanto os ácidos graxos insaturados inibem essa ativação (L'HOMME et al., 2013). Além disso, o AGS promove maior lipemia em relação às gorduras insaturadas, o que pode levar a um estado mais pró-inflamatório (BOTHAM; WHEELER-JONES, 2013).

Contudo, o papel dos AGMI sobre a inflamação ainda não está claro. Os benefícios do consumo do azeite de oliva não podem ser atribuídos exclusivamente ao seu elevado conteúdo de AGMI, pois o consumo de azeite, particularmente devido ao elevado teor de polifenóis (328 vs. 55mg/kg) é capaz de suprimir a expressão de vários genes pró-inflamatórios (IFN- $\gamma$ , Rho GTPase-activating protein15 (ARHGAP15), and IL-7R) (KONSTANTINIDOU et al., 2010). Assim, a ingestão compostos fenólicos presentes no azeite de oliva reduzem a resposta inflamatória, possivelmente por reduzir a ativação do NF- $\kappa$ B, devido a menor absorção pós-prandial de LPS (CAMARGO et al., 2014). Dessa forma, os componentes bioativos presentes no azeite (polifenóis e carotenoides) parecem também desempenhar papel importante na inflamação. E o real impacto dos AGMI sobre os benefícios atribuídos ao seu consumo são desconhecidos, devido a presença desses compostos bioativos inerentes na principal e mais estudada fonte desse ácido graxo, que é o azeite de oliva.

Por outro lado, apesar de ser observado um papel mais pró-inflamatório associado ao consumo de AGS, comparado ao AGMI, o consumo de uma refeição com alto conteúdo de AGS também aumentou a AUC ajustada de IL-10. A IL-10 é uma citocina tipicamente anti-inflamatória que é capaz de limitar a resposta inflamatória por inibir a apresentação de antígenos às células T por monócitos e macrófagos, e ainda suprimir a expressão de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 e TNF- $\alpha$  (CHANG et al., 2014; TRIFUNOVIĆ et al., 2015). Dessa forma, os resultados encontrados sugerem um mecanismo de compensação no qual o organismo busca limitar a inflamação subclínica pós-prandial induzida por esse ácido graxo.

De forma inédita, até onde pudemos avaliar, a refeição com alto conteúdo de AGS acompanhada de suco de laranja reduziu a variação da concentração de IL-17A ( $\Delta$ IL-17A), nas 3 horas pós-prandiais, em relação aos valores basais, comparada à mesma refeição acompanhada de água (controle). A IL-17 é uma citocina pró-inflamatória envolvida em diversas doenças inflamatórias, tais como artrite reumatoide, psoríase, doença de Chronn, e esclerose múltipla (MIOSSEC, 2009). Em humanos, a obesidade foi associada à elevadas concentrações de IL-17 (AHMED; GAFFEN, 2010). Além disso, a IL-17 contribuiu para o favorecimento da aterogênese subclínica em pacientes obesos (TARANTINO et al., 2014). Em modelos experimentais, o papel pró-inflamatório e pró-aterogênico da IL-17A, em resposta ao consumo de uma dieta com alto conteúdo de lipídios, já foi evidenciado com o aumento da inflamação sistêmica e vascular, desempenhando importante papel na progressão de lesões ateroscleróticas (CHEN et al., 2010; MADHUR et al., 2011). Dessa forma, os resultados encontrados em nosso estudo sugerem que o consumo do suco de laranja favoreceu a redução da inflamação pós-prandial induzida pelo consumo de uma refeição com alto conteúdo de AGS, e possivelmente contribuiu para redução do risco da aterosclerose subclínica.

O suco de laranja, além de ser excelente fonte de vitamina C, é uma boa fonte de folato e magnésio, e também fornece vitamina B6, tiamina, niacina, riboflavina e vitamina A (RAMPERSAUD; VALIM, 2015), e compostos fenólicos bioativos principalmente na forma de hesperidina e narirutina (metabolizada em nangerina no intestino) (COELHO; HERMSDORFF; BRESSAN, 2013). O seu consumo é recomendado por ser um fonte de calorias saudáveis, e é associado com elevadas ingestões de fibras, vitamina C, folato, potássio, magnésio e vitamina B6 (RAMPERSAUD; VALIM, 2015). Além disso, o

consumo do suco de laranja é associado com a melhora do perfil lipídico e redução do risco cardiovascular (GHANIM et al., 2007). Os compostos bioativos, hesperidina e nangerina, presentes no suco de laranja apresentam efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes, contribuindo para redução da inflamação através da supressão da ativação do NF- $\kappa$ B, com consequente redução da expressão de diversas citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ) e moléculas de adesão celular, além de inibir a produção de espécies reativas do oxigênio, e reduzir o dano ao DNA (COELHO; HERMSDORFF; BRESSAN, 2013).

As calorias do suco de laranja, provém basicamente dos seus carboidratos (sacarose, frutose e glicose) que quando hidrolisados em seus monossacarídeos fornecem glicose e frutose na mesma proporção (GHANIM et al., 2007). E apesar dos efeitos benéficos, o consumo do suco de laranja também tem sido relacionado com maior risco de desenvolvimento de gota, associado ao seu conteúdo de frutose (17%) (CHOI; WILLETT; CURHAN, 2010). A frutose é um açúcar simples altamente lipogênico, com efeitos metabólicos importantes implicados no desenvolvimento da síndrome metabólica, como a resistência à insulina e dislipidemia (DEKKER et al., 2010). Além disso, modelos animais, apontam a frutose como uma potente molécula indutora da inflamação capaz de ativar a inflamação via NF- $\kappa$ B, aumentar a expressão e a síntese de TNF- $\alpha$  e das moléculas de adesão ICAM-1 (DEKKER et al., 2010; GLUSHAKOVA et al., 2008). No entanto, investigações recentes tem demonstrado que o consumo dos açúcares presentes no suco de laranja não parece afetar negativamente a saúde, inclusive alguns benefícios do seu consumo tem sido relatados sobre o risco de síndrome metabólica (RAMPERSAUD; VALIM, 2015).

Ademais, o consumo regular de suco de laranja (480mL) foi capaz de manter inalteradas as concentrações de citocinas pró e anti-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, TNF) bem como na atividade do inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1), em indivíduos saudáveis (DEVARAJ et al., 2011). Resultados similares são relatados em indivíduos normopeso e sobrepeso, que após o consumo de 750mL de suco de laranja, mantiveram inalteradas as concentrações de algumas citocinas pró e anti-inflamatórias (IL-4, IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ). Mas, observaram redução da inflamação, com a redução da concentração de PCR, e também aumento na capacidade de defesa imunológica relacionada com a elevação da concentração de IL-12, após 8 semanas do estudo

(DOURADO; CESAR, 2015). De fato, em estudo *in vivo* o aumento da capacidade efetora de macrófagos, evidenciada pelo aumento de IL-12, em resposta ao consumo de suco de laranja ou solução à base de hesperidina – principal flavonoide da laranja e outras frutas cítricas – foi demonstrado. Além disso, frente a inflamação induzida por LPS o suco de laranja foi capaz de suprimir a secreção de TNF- $\alpha$ . A hesperidina, também reduziu a concentração de TNF- $\alpha$  e de outras citocinas envolvidas no processo inflamatório, como IL-10 e IL-12 (DOURADO et al., 2014).

Em estudo que avaliou o consumo agudo de uma refeição com alto conteúdo de gorduras e carboidratos (33% AGS) ou de uma refeição isocalórica com alto conteúdo de frutas e fibra, contendo entre outros alimentos suco de laranja, manteve as concentrações pós-prandiais de TNF- $\alpha$  inalteradas. Por outro lado, a refeição com alto conteúdo de AGS resultou no aumento da concentração plasmática da proteína ligante de LPS (LBP) e do próprio LPS, às 2 e 3 horas pós-prandiais, respectivamente (GHANIM et al., 2009). Ambos, LPS e LBP, participam da ativação do complexo TLR4, através da apresentação do LPS ao TLR4 pelo LBP mediado pelo receptor CD14 e subsequente ativação da transcrição de fatores pró-inflamatórios como o NF- $\kappa$ B que tem papel crucial na indução de mediadores inflamatórios, com citocinas, quimiocinas e moléculas co-estimulatórias (ROCHA et al., 2016). De fato, a ingestão refeição com alto conteúdo de AGS resultou na ativação da cascata inflamatória induzida pelo LPS, com aumento da expressão de receptores do tipo toll (TLR2 e TL4), e também da expressão do NF- $\kappa$ B. E apesar das concentrações de TNF- $\alpha$  permanecerem constantes, a proteína supressora da sinalização das citocinas (SOCS-3), uma proteína que é induzida em modelos animais por estímulo de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , apresentou aumento significativo às 2 e 3 horas pós-prandiais. Os mesmos resultados não foram encontrados para o consumo da refeição isocalórica com alto conteúdo de frutas e fibra, acompanhada de suco de laranja (GHANIM et al., 2009). Quando avaliado o consumo agudo de 300kcal de suco de laranja, a expressão do NF- $\kappa$ B também permaneceu constante após o período pós-prandial (1h, 2h, e 3h), o mesmo ocorreu para a ingestão de água ou 300kcal de bebida à base de frutose (GHANIM et al., 2007). Já o consumo de 300kcal de gordura (70% AGS) apresentou aumento na concentração de LPS, da expressão da SOCS3, TLR4, NF- $\kappa$ B e de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) após 3h pós-prandiais, mas, sem efeito para o consumo de 300kcal de suco de laranja ou 300mL água (DEOPURKAR et

al., 2010). Da mesma forma, o consumo de 900kcal de uma refeição com alto conteúdo de gorduras e carboidratos (51% AG) acompanhada de água, mas não de 300kcal de suco de laranja, também aumentou a concentração de LPS, da expressão da SOCS3, TLR2, TLR4 (GHANIM et al., 2010b). De forma semelhante, o consumo de uma refeição com alto conteúdo de gordura (59,2% E) aumentou a concentração plasmática de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF- $\alpha$ ) e de moléculas de adesão (ICAM-1 e VCAM-1), em indivíduos saudáveis. Mas, quando essa mesma refeição foi acompanhada do consumo de antioxidantes, vitamina E (800 UI) e ácido ascórbico (1.000 mg), não houve aumento para esses marcadores inflamatórios (NAPPO et al., 2003).

Ainda, em nosso estudo mostramos que o consumo de uma refeição com alto conteúdo de gordura, saturada ou monoinsaturada, acompanhada ou não de suco de laranja, aumentou a concentração pós-prandial de IL-6 plasmática (3h vs. 5h). Em estudo com idosos que investigou a reposta pós-prandial do consumo de dietas ricas em AGS (35% E) ou em AGMI (36% E), do azeite de oliva virgem, após um mês seguindo essa alimentação, encontrou resultado semelhante, com aumento da concentração de IL-6 plasmática (4h pós-prandiais) independente da refeição recebida, mas sem alteração para a expressão gênica dessa citocina (CAMARGO et al., 2012). Já em outro estudo após 12 semanas de intervenção com dieta com alto conteúdo de AGS (16% E) ou AGMI (20% E), observou-se o aumento pós-prandial da concentração de IL-6 plasmática após 4 horas da ingestão de ambas dietas, conjuntamente com o aumento da sua expressão gênica, em indivíduos com síndrome metabólica (CRUZ-TENO et al., 2012). Resultado similar foi encontrado no estudo em que avaliou a concentração plasmática de IL-6 após o consumo agudo de uma refeição com alto conteúdo de AGS de cadeia média (79% E), derivada do óleo de coco, ou de uma refeição com alto conteúdo de AGMI (72% E), proveniente principalmente do óleo de macadâmia, às 3 horas e 30 minutos pós-prandiais, em indivíduos saudáveis ou com risco aumentado para diabetes tipo 2. No mesmo período, houve aumento da expressão gênica das citocinas inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-6R e TNF) no tecido adiposo subcutâneo, dos indivíduos saudáveis, que consumiram a dieta com alto conteúdo de AGS, mas não para aqueles que consumiram a refeição com alto conteúdo de AGMI (PIETRASZEK; GREGERSEN; HERMANSEN, 2011). Já em outro estudo, que avaliou o efeito pós-prandial do consumo de uma dieta com alto conteúdo de AGS (35 % E) ou com alto conteúdo de AGMI (36%) proveniente principalmente do

azeite de oliva extra virgem, mas, que foram consumidas durante o período de um mês, não houve efeito das refeições na concentração de IL-6 plasmática nos períodos pós-prandiais (3h, 6h e 9h) avaliados (JIMÉNEZ-GÓMEZ et al., 2009). De forma semelhante, o consumo de 300kcal de gordura (70% AGS), 300kcal de suco de laranja ou 300mL de água também não alterou as concentrações pós-prandiais (1h, 3h e 5h) de IL-6 plasmática (DEOPURKAR et al., 2010). Um único estudo, com homens saudáveis, avaliou o efeito pós-prandial em um período de 10 horas, sendo observado um aumento da IL-6 entre o jejum (12h) e as 10 horas pós-prandiais, após o consumo de 3,700kcal de gordura (50g/m<sup>2</sup> de superfície corporal). O mesmo resultado foi observado para o consumo de uma refeição mista com gorduras e carboidratos e também para o consumo de água. Os pesquisadores do estudo concluíram que esse aumento, independente da dieta, sugere um ciclo diurno dessa citocina (VAN OOSTROM et al., 2003). Em estudo de revisão, 73% dos 30 estudos com refeições com alto conteúdo de gorduras encontraram um aumento sobre a IL-6, com pico entre 2 e 4 horas pós-prandiais (ERRIDGE et al., 2007b). Os resultados contraditórios encontrados podem estar relacionados o tempo de investigação em alguns estudos pode ter sido insuficiente para detectar diferenças nas concentrações da citocina, pois como observado em alguns estudos, apesar da sua concentração não se alterar, a sua expressão gênica pode se elevar pós-prandialmente. De fato, os processos de transcrição e tradução não ocorrem de forma simultânea (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2002). Ademais, diversos mecanismos de tradução e pós-tradução podem estar envolvidos na produção e secreção de citocinas (KELSO, 1998), e ainda existe fatores de confusão envolvidos como gênero, idade, atividade física, fumo e IMC (HERMSDORFF et al., 2010c).

Em nosso estudo, as concentrações de PCR pós-prandiais permaneceram inalteradas em relação ao tempo avaliado (2h, 3h, 5h), dieta, e interação dieta\*tempo. O consumo de refeição com alto conteúdo de AGS de cadeia média (79% E), proveniente do óleo de coco, ou AGMI (72% E), do óleo de macadâmia, também não alterou a concentração de PCR, às 3 horas e 30 minutos pós-prandiais (PIETRASZEK; GREGERSEN; HERMANSEN, 2011). E a ingestão aguda de uma refeição com alto conteúdo de gorduras e carboidratos (33% AGS) ou de um refeição isocalórica com alto conteúdo de frutas e fibra, contendo entre outros alimentos suco de laranja, também manteve as concentrações pós-prandiais de PCR inalteradas às 1h, 2h, e 3h pós-prandiais

(GHANIM et al., 2009). Já o consumo isolado do suco de laranja (300kcal) reduziu a concentração de PCR plasmática, após 1 hora da sua ingestão, e contribuiu para um menor percentual de mudança da concentração de PCR plasmática, durante 3 horas pós-prandiais, em relação ao consumo de água no mesmo período. Neste mesmo estudo, a ingestão de frutose (300kcal), por sua vez, não alterou a concentração pós-prandial de PCR (GHANIM et al., 2007).

Pequenas elevações na concentração de PCR, em condições de inflamação subclínica ou de baixa intensidade (<10mg/L), como ocorre na obesidade, são consideradas clinicamente significantes (EKLUND, 2009). Contudo, o aumento da concentração de PCR pós-estímulo é de difícil detecção, e quase não é possível detectar um aumento na sua concentração 5 horas após um estímulo, somente por volta de 24 horas após é observado o seu pico de secreção (HERIEKA; ERRIDGE, 2014). Logo, é razoável acreditar que a ausência de modificação na concentração dessa proteína deve-se ao fato do tempo pós-prandial de 5 horas ter sido insuficiente para detecção na sua modificação. Ademais, a PCR é uma proteína de fase aguda comumente utilizada como marcador não específico da inflamação sistêmica (YOUSUF et al., 2013), sendo produzida no fígado, induzida pelas citocinas IL-1, IL-6 e IL-17, em resposta a um agente inflamatório ou dano tecidual (EKLUND, 2009). Em nosso estudo também não foi observado nenhum aumento expressivo na concentração de citocinas pró-inflamatórias no período pós-prandial, tal fato corrobora para fundamentar a inexistência de alteração na concentração da PCR após o consumo das refeições avaliadas. Por outro lado, a AUC ajusta da concentração de PCR foi menor para a refeição de AGS acompanhada de suco de laranja em comparação com a refeição com alto conteúdo de AGMI acompanhada de uma bebida à base de frutose.

O nosso estudo apresenta algumas limitações, como a ausência de uma dieta controle positivo (consumo de uma dieta com alto conteúdo de gorduras saturadas acompanhada de uma bebida à base de frutose), na primeira fase do estudo. Ainda, nós observamos que os valores basais dos marcadores inflamatórios foram diferentes entre os participantes da primeira e segunda fases do estudo, contudo, ao analisar de forma conjunta esses dados, nós tivemos o cuidado de ajustar a média da AUC pelos valores basais dos marcadores. Além disso, nós não conseguimos avaliar o efeito isolado dos nutrientes presentes nas refeições oferecidas, pois elas se consistiram na combinação de

alimentos que além dos nutrientes, são fontes de compostos não nutricionais, como vitaminas, minerais, além dos compostos bioativos.

## 7. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, concluímos que:

1- O consumo agudo de uma refeição com alto conteúdo de AGS, aumentou a AUC ajustada para as citocinas pró-inflamatórias TNF e IL-6 em comparação às refeições com alto conteúdo de AGMI, independente do tipo de bebida que acompanhou essas refeições. Ainda, a refeição com alto conteúdo de AGS acompanhada de água, apresentou maiores valores para AUC ajustada para citocinas IL-17A, IL-4 e IL-2, em relação à refeição com alto conteúdo de AGMI acompanhada ou não da ingestão de suco de laranja. Assim, a refeição com alto conteúdo de AGS apresentou um perfil mais pró-inflamatório, em relação a uma refeição com alto conteúdo de AGMI.

2- Apesar de ser observado um papel pró-inflamatório associado ao consumo de AGS, comparado ao AGMI, o consumo de uma refeição com alto conteúdo de AGS também aumentou a AUC ajustada da citocina anti-inflamatória IL-10. Esse resultado encontrados sugere um mecanismo de compensação no qual o organismo busca limitar a inflamação subclínica pós-prandial induzida pelo consumo agudo de alto conteúdo de AGS.

3- A refeição com alto conteúdo de AGS acompanhada de suco de laranja, por sua vez, reduziu a inflamação pós-prandial, induzida pelo consumo de uma refeição com alto conteúdo de AGS, mediante a redução das concentrações de  $\Delta$ IL-17A. Dessa forma, o consumo de suco de laranja parece modular os efeitos pró-inflamatórios de uma refeição com alto conteúdo de AGS para um perfil menos inflamatório.

4- O consumo de AGS ou AGMI aumentou a contração pós-prandial de IL-6. Esse aumento da resposta inflamatória pós-prandial foi independente do tipo de gordura e do tipo de bebida que acompanhava a refeição (suco de laranja, bebida à base de frutose ou água), sugerindo uma resposta inflamatória fisiológica associada a fase pós-prandial induzida pela disponibilidade de nutrientes.

5- Nosso estudo não foi capaz de identificar diferenças na resposta inflamatória pós-prandial de acordo com estado nutricional das voluntárias (eutrofia vs. sobrepeso) que consumiram uma refeição com alto conteúdo de AGS ou AGMI, acompanhadas ou não da ingestão de suco de laranja. Esses resultados indicam que a

resposta inflamatória pós-prandial pode ser modulada pela dieta, independente do estado nutricional.

Em suma, podemos concluir que mudanças na proporção dos diferentes ácidos graxos (AGS ou AGMI), bem como ingestão de suco de laranja numa refeição é capaz de modular uma resposta inflamatória subclínica pós-prandial, independente do estado nutricional dos indivíduos saudáveis. Estudos em longo prazo são necessários para avaliar os benefícios do seu consumo regular de AGMI e suco de laranja, bem como os mecanismos envolvidos.

## 8. REFERÊNCIAS

- AHMED, M.; GAFFEN, S. L. IL-17 in obesity and adipogenesis. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 21, n. 6, p. 449–453, 2010.
- ALIPOUR, A. et al. Novel aspects of postprandial lipemia in relation to atherosclerosis. **Atherosclerosis Supplements**, v. 9, n. 2, p. 39–44, 2008.
- AMAR, J. et al. Interleukin 6 is associated with subclinical atherosclerosis: a link with soluble intercellular adhesion molecule 1. **Journal of Hypertension**, v. 24, n. 6, p. 1083–1088, jun. 2006.
- BELLIDO, C. et al. Butter and walnuts, but not olive oil, elicit postprandial activation of nuclear transcription factor kappaB in peripheral blood mononuclear cells from healthy men. **The American journal of clinical nutrition**, v. 80, n. 6, p. 1487–1491, 2004.
- BERG, J.; TYMOCZKO, J.; STRYER, L. Eukaryotic Transcription and Translation Are Separated in Space and Time. In: **Biochemistry**. 5th editio ed. New York: W H Freeman, 2002.
- BILLIET, T. et al. Targeting TNF- $\alpha$  for the treatment of inflammatory bowel disease. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 14, n. 1, p. 75–101, 11 jan. 2014.
- BOTHAM, K. M.; WHEELER-JONES, C. P. D. Postprandial lipoproteins and the molecular regulation of vascular homeostasis. **Progress in Lipid Research**, v. 52, n. 4, p. 446–464, 2013.
- BOUGOULIA, M.; TRIANTOS, A.; KOLIAKOS, G. Plasma interleukin-6 levels, glutathione peroxidase and isoprostane in obese women before and after weight loss. Association with cardiovascular risk factors. **Hormones (Athens, Greece)**, v. 5, n. 3, p. 192–199, 2006a.
- BOUGOULIA, M.; TRIANTOS, A.; KOLIAKOS, G. Effect of weight loss with or without orlistat treatment on adipocytokines, inflammation, and oxidative markers in obese women. **Hormones (Athens, Greece)**, v. 5, n. 4, p. 259–269, 2006b.
- BRAY, G. A.; BOUCHARD, C.; JAMES, W. P. T. Definitions and proposed current classifications of obesity. In: BRAY, G. A.; BOUCHARD, C.; JAMES, W. P. T. (Eds.). **Handbook of obesity**. New York: Marcel Dekker, 1998. p. 31–40.
- BRESSAN, J. et al. Impacto hormonal e inflamatório de diferentes composições dietéticas: ênfase em padrões alimentares e fatores dietéticos específicos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, n. 5, p. 572–581, jul. 2009.
- BRESSAN, J.; HERMSDORFF, H. H. M. A epidemia da obesidade: a causa, o tratamento e o ambiente. In: MOREIRA, E. A. M.; CHIARELLO, P. G. (Eds.). **Atenção Nutricional: abordagem dietoterápica em adulto**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 75–97.
- BRYMORA, A. et al. Low-fructose diet lowers blood pressure and inflammation in patients with chronic kidney disease. **Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, v. 27, n. 2, p. 608–612, 2012.
- BUSCEMI, S. et al. Effects of red orange juice intake on endothelial function and inflammatory markers in adult subjects with increased cardiovascular risk. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 95, n. 5, p. 1089–1095, 2012.

- CALDER, P. C. et al. A Consideration of Biomarkers to be Used for Evaluation of Inflammation in Human Nutritional Studies. **British Journal of Nutrition**, v. 109, n. S1, p. S1–S34, 23 jan. 2013.
- CAMARGO, A. et al. Expression of proinflammatory, proatherogenic genes is reduced by the Mediterranean diet in elderly people. **British Journal of Nutrition**, v. 108, n. 3, p. 500–508, 15 ago. 2012.
- CAMARGO, A. et al. Olive oil phenolic compounds decrease the postprandial inflammatory response by reducing postprandial plasma lipopolysaccharide levels. **Food Chemistry**, v. 162, p. 161–171, 2014.
- CARRARO, J. C. C. et al. Interleukin-6 is a better metabolic biomarker than interleukin-18 in young healthy adults. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 71, n. 3, p. 527–535, 27 set. 2015.
- CARRERO, J. J. et al. Cytokines, Atherogenesis, and Hypercatabolism in Chronic Kidney Disease: A Dreadful Triad. **Seminars in Dialysis**, v. 22, n. 4, p. 381–386, jul. 2009.
- CHANG, J. S. et al. Interleukin 10 and clustering of metabolic syndrome components in pediatrics. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 44, n. 4, p. 384–394, 2014.
- CHANG, Y.-H. et al. Regulation of glucose/lipid metabolism and insulin sensitivity by interleukin-4. **International Journal of Obesity**, v. 36, n. 34, p. 993–998, 2012.
- CHEN, S. et al. IL-17A Is Proatherogenic in High-Fat Diet-Induced and Chlamydia pneumoniae Infection-Accelerated Atherosclerosis in Mice. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 9, p. 5619–5627, 1 nov. 2010.
- CHOE, S. S. et al. Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. **Frontiers in Endocrinology**, v. 7, n. April, p. 1–16, 2016.
- CHOI, H. K.; WILLETT, W.; CURHAN, G. Fructose-rich beverages and risk of gout in women. **JAMA : the journal of the American Medical Association**, v. 304, n. 20, p. 2270–2278, 2010.
- CHOI, J.; JOSEPH, L.; PILOTE, L. **Obesity and C-reactive protein in various populations: A systematic review and meta-analysis** *Obesity Reviews*, 2013.
- COCATE, P. G. et al. Fruit and vegetable intake and related nutrients are associated with oxidative stress markers in middle-aged men. **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)**, p. 1–6, 30 out. 2013.
- COELHO, R. C. L. A.; HERMSDORFF, H. H. M.; BRESSAN, J. Anti-inflammatory Properties of Orange Juice: Possible Favorable Molecular and Metabolic Effects. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 68, n. 1, p. 1–10, 2013.
- CRUZ-TENO, C. et al. Dietary fat modifies the postprandial inflammatory state in subjects with metabolic syndrome: the LIPGENE study. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 56, n. 6, p. 854–865, jun. 2012.
- DE VRIES, M. A. et al. The postprandial situation as a pro-inflammatory condition. **Clinica e Investigacion en Arteriosclerosis**, v. 26, n. 4, p. 184–192, 2014.
- DEKKER, M. J. et al. Fructose: a highly lipogenic nutrient implicated in insulin resistance, hepatic steatosis, and the metabolic syndrome. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 299, n. 5, p. E685–E694, 2010.

DEOPURKAR, R. et al. Differential effects of cream, glucose, and orange juice on inflammation, endotoxin, and the expression of toll-like receptor-4 and suppressor of cytokine signaling-3. **Diabetes Care**, v. 33, n. 5, p. 991–997, 2010.

DEVARAJ, S. et al. Effect of orange juice and beverage with phytosterols on cytokines and PAI-1 activity. **Clinical Nutrition**, v. 30, n. 5, p. 668–671, 2011.

DIJK, S. VAN S. J. VAN et al. A saturated fatty acid-rich diet induces an obesity-linked proinflammatory gene expression profile in adipose tissue of subjects at risk of metabolic syndrome. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 90, n. 6, p. 1656–1664, 1 dez. 2009.

DOURADO, G. K. Z. S. et al. Orange juice and hesperidin promote differential innate immune response in macrophages ex vivo. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 83, n. 3, p. 162–167, 2014.

DOURADO, G. K. Z. S.; CESAR, T. B. Investigation of cytokines, oxidative stress, metabolic, and inflammatory biomarkers after orange juice consumption by normal and overweight subjects. **Food & Nutrition Research**, v. 59, p. 1–8, 20 out. 2015.

EKLUND, C. M. Proinflammatory cytokines in CRP baseline regulation. **Advances in clinical chemistry**, v. 48, n. 9, p. 111–36, 2009.

ERKKILÄ, A. et al. Dietary fatty acids and cardiovascular disease: an epidemiological approach. **Progress in lipid research**, v. 47, n. 3, p. 172–87, maio 2008.

ERRIDGE, C. et al. A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: Evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 86, n. 5, p. 1286–1292, 2007a.

ERRIDGE, C. et al. A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: Evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 86, n. 5, p. 1286–1292, 2007b.

ESTRUCH, R. et al. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. **The New England journal of medicine**, v. 368, n. 14, p. 1279–90, 2013.

EXLEY, M. A. et al. Interplay between the immune system and adipose tissue in obesity. **Journal of Endocrinology**, v. 223, n. 2, p. R41–R48, 2014.

FATTORE, E.; FANELLI, R. Palm oil and palmitic acid: a review on cardiovascular effects and carcinogenicity. **International journal of food sciences and nutrition**, v. 64, n. August, p. 648–59, 2013.

GATHIRUA-MWANGI, W. G.; ZHANG, J. Dietary factors and risk for advanced prostate cancer. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 23, n. 2, p. 96–109, mar. 2014.

GHANIM, H. et al. Orange juice or fructose intake does not induce oxidative and inflammatory response. **Diabetes Care**, v. 30, n. 6, p. 1406–1411, 2007.

GHANIM, H. et al. Increase in plasma endotoxin concentrations and the expression of toll-like receptors and suppressor of cytokine signaling-3 in mononuclear cells after a high-fat, high-carbohydrate meal: Implications for insulin resistance. **Diabetes Care**, v. 32, n. 12, p. 2281–2287, 2009.

GHANIM, H. et al. Orange juice neutralizes the proinflammatory effect of a high-fat, high-carbohydrate meal and prevents endotoxin increase and toll-like receptor

expression. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 91, n. 4, p. 940–949, 2010a.

GHANIM, H. et al. Orange juice neutralizes the proinflammatory effect of a high-fat, high-carbohydrate meal and prevents endotoxin increase and toll-like receptor expression. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 91, n. 4, p. 940–949, 2010b.

GLUSHAKOVA, O. et al. Fructose induces the inflammatory molecule ICAM-1 in endothelial cells. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 19, n. 9, p. 1712–1720, 2008.

GONZÁLEZ-GALLEGO, J. et al. Fruit polyphenols, immunity and inflammation. **The British journal of nutrition**, v. 104 Suppl, p. S15–S27, 2010.

GREGOR, M. F.; HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammatory mechanisms in obesity. **Annual review of immunology**, v. 29, p. 415–45, jan. 2011.

HERIEKA, M.; ERRIDGE, C. High-fat meal induced postprandial inflammation. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 58, n. 1, p. 136–146, 2014.

HERMSDORFF, H. H. M. et al. Discriminated benefits of a Mediterranean dietary pattern within a hypocaloric diet program on plasma RBP4 concentrations and other inflammatory markers in obese subjects. **Endocrine**, v. 36, n. 3, p. 445–451, 9 dez. 2009.

HERMSDORFF, H. H. M. et al. Fruit and vegetable consumption and proinflammatory gene expression from peripheral blood mononuclear cells in young adults: a translational study. **Nutrition & metabolism**, v. 7, p. 42, 2010a.

HERMSDORFF, H. H. M. et al. Fruit and vegetable consumption and proinflammatory gene expression from peripheral blood mononuclear cells in young adults: a translational study. **Nutrition & Metabolism**, v. 7, n. 1, p. 42, 2010b.

HERMSDORFF, H. H. M. et al. Association of Body Fat Distribution with Proinflammatory Gene Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Young Adult Subjects. **OMICS: A Journal of Integrative Biology**, v. 14, n. 3, p. 297–307, jun. 2010c.

HERMSDORFF, H. H. M. et al. Central adiposity rather than total adiposity measurements are specifically involved in the inflammatory status from healthy young adults. **Inflammation**, v. 34, n. 3, p. 161–170, 2011a.

HERMSDORFF, H. H. M. et al. A legume-based hypocaloric diet reduces proinflammatory status and improves metabolic features in overweight/obese subjects. **European Journal of Nutrition**, v. 50, n. 1, p. 61–69, 2011b.

HERMSDORFF, H. H. M. et al. A legume-based hypocaloric diet reduces proinflammatory status and improves metabolic features in overweight/obese subjects. **European Journal of Nutrition**, v. 50, n. 1, p. 61–69, 25 fev. 2011c.

HERMSDORFF, H. H. M. et al. Central Adiposity Rather Than Total Adiposity Measurements Are Specifically Involved in the Inflammatory Status from Healthy Young Adults. **Inflammation**, v. 34, n. 3, p. 161–170, 14 jun. 2011d.

HERMSDORFF, H. H. M. et al. Vitamin C and fibre consumption from fruits and vegetables improves oxidative stress markers in healthy young adults. **British Journal of Nutrition**, v. 107, n. 8, p. 1119–1127, 2012.

HOOPER, L. et al. Reduced or modified dietary fat for preventing cardiovascular disease. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 134, n. 2, p. 182–183, abr. 2016.

- JIMÉNEZ-GÓMEZ, Y. et al. Olive oil and walnut breakfasts reduce the postprandial inflammatory response in mononuclear cells compared with a butter breakfast in healthy men. **Atherosclerosis**, v. 204, n. 2, p. e70–e76, jun. 2009.
- JUNG, U.; CHOI, M.-S. Obesity and Its Metabolic Complications: The Role of Adipokines and the Relationship between Obesity, Inflammation, Insulin Resistance, Dyslipidemia and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 4, p. 6184–6223, 2014.
- KAPTOGE, S. et al. Inflammatory cytokines and risk of coronary heart disease: new prospective study and updated meta-analysis. **European Heart Journal**, v. 35, n. 9, p. 578–589, 1 mar. 2014.
- KELLY, R. B. Diet and exercise in the management of hyperlipidemia. **American Family Physician**, v. 81, n. 9, p. 1097–1102, 2010.
- KELSO, A. Cytokines : Principles and prospects. p. 300–317, 1998.
- KONSTANTINIDOU, V. et al. In vivo nutrigenomic effects of virgin olive oil polyphenols within the frame of the Mediterranean diet: a randomized controlled trial. **The FASEB Journal**, v. 24, n. 7, p. 2546–2557, 1 jul. 2010.
- KVIETYS, P. R.; GRANGER, D. N. Role of reactive oxygen and nitrogen species in the vascular responses to inflammation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, n. 3, p. 556–592, fev. 2012.
- L'HOMME, L. et al. Unsaturated fatty acids prevent activation of NLRP3 inflammasome in human monocytes/macrophages. **The Journal of Lipid Research**, v. 54, n. 11, p. 2998–3008, 1 nov. 2013.
- LEE, J. Y. et al. Reciprocal modulation of toll-like receptor-4 signaling pathways involving MyD88 and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT by saturated and polyunsaturated fatty acids. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 39, p. 37041–37051, 2003.
- LIANG, H.-E. et al. Divergent expression patterns of IL-4 and IL-13 define unique functions in allergic immunity. **Nature Immunology**, v. 13, n. 1, p. 58–66, 2011.
- LIAO, W.; LIN, J.-X.; LEONARD, W. J. IL-2 family cytokines: new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation. **Current opinion in immunology**, v. 23, n. 5, p. 598–604, out. 2011.
- LIAO, W.; LIN, J.-X.; LEONARD, W. J. Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy. **Immunity**, v. 38, n. 1, p. 13–25, 24 jan. 2013.
- LOPES, L. L.; PELUZIO, M. DO C. G.; HERMSDORFF, H. H. M. Ingestão de ácidos graxos monoinsaturados e metabolismo lipídico. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 15, n. 1, p. 52–60, mar. 2016.
- LUCAS, R. et al. Cytokine profiling of young overweight and obese female African American adults with prediabetes. **Cytokine**, v. 64, n. 1, p. 310–315, 2013.
- MADHUR, M. S. et al. Role of interleukin 17 in inflammation, atherosclerosis, and vascular function in apolipoprotein e-deficient mice. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 31, n. 7, p. 1565–1572, 2011.
- MAKKI, K.; FROGUEL, P.; WOLOWCZUK, I. Adipose Tissue in Obesity-Related Inflammation and Insulin Resistance: Cells, Cytokines, and Chemokines. **ISRN**

**Inflammation**, v. 2013, p. 1–12, 2013.

MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, M. A. et al. Benefits of the Mediterranean Diet: Insights from the PREDIMED Study. **Progress in Cardiovascular Diseases**, 2015.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428–435, 2008.

MILENKOVIC, D. et al. Hesperidin displays relevant role in the nutrigenomic effect of orange juice on blood leukocytes in human volunteers: A randomized controlled Cross-Over study. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, p. 1–9, 2011.

MIOSSEC, P. IL-17 and Th17 cells in human inflammatory diseases. **Microbes and Infection**, v. 11, n. 5, p. 625–630, 2009.

MIURA, K. et al. Relationship of dietary monounsaturated fatty acids to blood pressure: the International Study of Macro/Micronutrients and Blood Pressure. **Journal of hypertension**, v. 31, n. 6, p. 1144–50, 2013.

NAPPO, F. et al. Postprandial endothelial activation in healthy subjects and in type 2 diabetic patients: role of fat and carbohydrate meals. **J Am Coll Cardiol.**, v. 39, n. 7, p. 1145–1150, 2003.

NCD RISK FACTOR COLLABORATION (NCD-RISC). Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. **Lancet (London, England)**, v. 387, n. 10026, p. 1377–96, 2 abr. 2016.

NGUYEN, D. P.; LI, J.; TEWARI, A. K. Inflammation and prostate cancer: The role of interleukin 6 (IL-6). **BJU International**, v. 113, n. 6, p. 986–992, 2014.

NHANES. **Anthropometry Procedures Manual**. [s.l: s.n.].

O'NEIL, C. E. et al. 100% orange juice consumption is associated with better diet quality, improved nutrient adequacy, decreased risk for obesity, and improved biomarkers of health in adults: National Health and Nutrition Examination Survey, 2003-2006. **Nutrition journal**, v. 11, p. 107, 2012.

O'SULLIVAN, T. A. et al. Food sources of saturated fat and the association with mortality: A meta-analysis. **American Journal of Public Health**, v. 103, n. 9, p. 31–42, 2013.

OOSTROM, A. J. H. H. M. VAN et al. Activation of leukocytes by postprandial lipemia in healthy volunteers. **Atherosclerosis**, v. 177, n. 1, p. 175–182, 2004.

PARK, H. S.; PARK, J. Y.; YU, R. Relationship of obesity and visceral adiposity with serum concentrations of CRP, TNF- $\alpha$  and IL-6. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 69, n. 1, p. 29–35, 2005.

PIETRASZEK, A.; GREGERSEN, S.; HERMANSEN, K. Acute effects of dietary fat on inflammatory markers and gene expression in first-degree relatives of type 2 diabetes patients. **Review of Diabetic Studies**, v. 8, p. 477–489, 2011.

POLLARD, K. M. et al. Interferon- $\gamma$  and systemic autoimmunity. **Discovery medicine**, v. 16, n. 87, p. 123–131, 2013.

POPPITT, S. D. et al. Postprandial response of adiponectin, interleukin-6, tumor necrosis factor- $\alpha$ , and C-reactive protein to a high-fat dietary load. **Nutrition**, v. 24, n. 4, p. 322–

329, 2008.

RAMPERSAUD, G. C.; VALIM, M. F. 100% Citrus Juice: Nutritional Contribution, Dietary Benefits, and Association with Anthropometric Measures. **Critical reviews in food science and nutrition**, n. May 2015, p. 37–41, 2015.

ROCHA, D. M. et al. Saturated fatty acids trigger TLR4-mediated inflammatory response. **Atherosclerosis**, v. 244, p. 211–215, jan. 2016.

ROMEO, J. et al. Changes in cardiometabolic risk factors, appetite-controlling hormones and cytokines after a treatment program in overweight adolescents: Preliminary findings from the EVASYON study. **Pediatric Diabetes**, v. 12, n. 4 PART 2, p. 372–380, 2011.

SACKS, F. M.; KATAN, M. Randomized clinical trials on the effects of dietary fat and carbohydrate on plasma lipoproteins and cardiovascular disease. **The American journal of medicine**, v. 113 Suppl, n. 2, p. 13S–24S, 2002.

SALTER, A. M. Dietary fatty acids and cardiovascular disease. **Animal**, p. 1–9, 2011.

SANTOS, S. et al. Saturated fatty acids intake in relation to C-reactive protein, adiponectin, and leptin: a population-based study. **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)**, v. 29, n. 6, p. 892–7, jun. 2013.

SANTOS, S.; OLIVEIRA, A.; LOPES, C. Systematic review of saturated fatty acids on inflammation and circulating levels of adipokines. **Nutrition research (New York, N.Y.)**, v. 33, n. 9, p. 687–95, set. 2013.

SCHMIDT, F. M. et al. Inflammatory Cytokines in General and Central Obesity and Modulating Effects of Physical Activity. **Plos One**, v. 10, n. 3, p. e0121971, 2015.

SHARMA, R.; FU, S. M.; JU, S.-T. IL-2: a two-faced master regulator of autoimmunity. **Journal of autoimmunity**, v. 36, n. 2, p. 91–7, mar. 2011.

SHARMAN, M. J.; VOLEK, J. S. Weight loss leads to reductions in inflammatory biomarkers after a very-low-carbohydrate diet and a low-fat diet in overweight men. **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 107, n. 4, p. 365–9, 2004.

SHURETY, W. et al. Endocytosis of uncleaved tumor necrosis factor-alpha in macrophages. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 81, n. 1, p. 107–117, 2001.

SILBERNAGEL, G. et al. Plasminogen activator inhibitor-1, monocyte chemoattractant protein-1, e-selectin and C-reactive protein levels in response to 4-week very-high-fructose or -glucose diets. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, n. 1, p. 97–100, 2013.

SILVA, H. A. DA et al. Relation between uric acid and metabolic syndrome in subjects with cardiometabolic risk. **Einstein (São Paulo)**, v. 13, n. ahead, p. 00–00, 2015.

SOLÁ, R. et al. Effect of a traditional Mediterranean diet on apolipoproteins B, A-I, and their ratio: a randomized, controlled trial. **Atherosclerosis**, v. 218, n. 1, p. 174–80, set. 2011.

STEVENS, G. A et al. National, regional, and global trends in adult overweight and obesity prevalences. **Population health metrics**, v. 10, n. 1, p. 22, jan. 2012.

SURENDAR, J. et al. Increased levels of both Th1 and Th2 cytokines in subjects with metabolic syndrome (CURES-103). **Diabetes technology & therapeutics**, v. 13, n. 4, p.

477–482, 2011.

TANAKA, T.; KISHIMOTO, T. The biology and medical implications of interleukin-6. **Cancer immunology research**, v. 2, n. 4, p. 288–94, 2014.

TARANTINO, G. et al. Is serum Interleukin-17 associated with early atherosclerosis in obese patients? **Journal of translational medicine**, v. 12, p. 214, 2014.

TENG, K.-T. et al. Modulation of obesity-induced inflammation by dietary fats: mechanisms and clinical evidence. **Nutrition journal**, v. 13, n. 1, p. 12, 2014.

TOLEDO, E. et al. Effect of the Mediterranean diet on blood pressure in the PREDIMED trial: results from a randomized controlled trial. **BMC medicine**, v. 11, p. 207, jan. 2013.

TRIFUNOVIĆ, J. et al. Pathologic patterns of interleukin 10 expression – A review. **Biochemia Medica**, p. 36–48, 2015.

TSAO, C.-H. et al. Interleukin-4 regulates lipid metabolism by inhibiting adipogenesis and promoting lipolysis. **Journal of lipid research**, v. 55, n. 3, p. 385–97, 2014.

URPI-SARDA, M. et al. The Mediterranean diet pattern and its main components are associated with lower plasma concentrations of tumor necrosis factor receptor 60 in patients at high risk for cardiovascular disease. **The Journal of nutrition**, v. 142, n. 6, p. 1019–25, 2012a.

URPI-SARDA, M. et al. Virgin olive oil and nuts as key foods of the Mediterranean diet effects on inflammatory biomarkers related to atherosclerosis. **Pharmacological Research**, v. 65, n. 6, p. 577–583, 2012b.

VAN EXEL, E. et al. Low production capacity of interleukin-10 associates with the metabolic syndrome and type 2 diabetes: The Leiden 85-plus study. **Diabetes**, v. 51, n. 4, p. 1088–1092, 2002.

VAN OOSTROM, A. J. H. H. M. et al. Postprandial recruitment of neutrophils may contribute to endothelial dysfunction. **Journal of lipid research**, v. 44, n. 3, p. 576–83, 2003.

VIA, M. A.; MECHANICK, J. I. Obesity as a Disease. **Current Obesity Reports**, v. 3, n. 3, p. 291–297, 1 jun. 2014.

VOEHRINGER, D. et al. Type 2 immunity is controlled by IL-4/IL-13 expression in hematopoietic non-eosinophil cells of the innate immune system. **The Journal of experimental medicine**, v. 203, n. 6, p. 1435–1446, 2006.

VOLOSHYNA, I.; LITTLEFIELD, M. J.; REISS, A. B. Atherosclerosis and interferon- $\gamma$ : New insights and therapeutic targets. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 24, n. 1, p. 45–51, jan. 2014.

WANG, Y. et al. Impact of orange juice consumption on macronutrient and energy intakes and body composition in the US population. **Public Health Nutrition**, v. 15, n. 12, p. 1–8, 2012.

WHO. **BMI classification.** Disponível em:  
<[http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro\\_3.html](http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html)>.

WHO. **Global status report on noncommunicable diseases 2014.** [s.l.: s.n.]. Disponível em:  
<[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/148114/1/9789241564854\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/148114/1/9789241564854_eng.pdf?ua=1)>.

- WHO. **Obesity and overweight.** Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>. Acesso em: 11 abr. 2015.
- WIDMER, R. J. et al. The Mediterranean Diet, its Components, and Cardiovascular Disease. **The American Journal of Medicine**, v. 128, n. 3, p. 229–238, 2015.
- WILLETT, W. C.; HU, F. B.; PH, D. Changes in Diet and Lifestyle and Long- Term Weight Gain in Women and Men. 2011.
- WINDGASSEN, E. B. et al. C-Reactive Protein and High-Sensitivity C-Reactive Protein : An Update for Clinicians. v. 123, n. 1, p. 114–119, 2011.
- WONG, S. W. et al. Fatty Acids Modulate Toll-like Receptor 4 Activation through Regulation of Receptor Dimerization and Recruitment into Lipid Rafts in a Reactive Oxygen Species-dependent Manner. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 40, p. 27384–27392, 2 out. 2009.
- YANG, Y. et al. TNF-alpha polymorphisms and breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 129, n. 2, p. 513–519, 2011.
- YAO, X. et al. Targeting interleukin-6 in inflammatory autoimmune diseases and cancers. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 141, n. 2, p. 125–129, 2014.
- YOUSUF, O. et al. High-sensitivity C-reactive protein and cardiovascular disease: A resolute belief or an elusive link? **Journal of the American College of Cardiology**, v. 62, n. 5, p. 397–408, 2013.

## 9. ANEXOS

### 9.1 Anexo A: Termo de Consentimento Livre Esclarecido



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO E SAÚDE**



#### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO**

Convidamos você a participar do estudo denominado “MARCADORES METABÓLICOS, INFLAMATÓRIOS, GENÉTICOS E DO APETITE EM RESPOSTA AO CONSUMO DE ÁCIDOS GRAXOS MONOINSATURADOS E FRUTOSE”, cujo objetivo é conhecer a resposta metabólica, inflamatória e da saciedade frente a diferentes componentes da dieta.

Para tal, você deverá comparecer por quatro vezes no Laboratório de Metabolismo Energético e Composição Corporal (LAMECC), no Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa. Na primeira visita, será feita uma entrevista para completar um questionário e será aferida a sua pressão arterial. Caso tenha, você deverá apresentar exames laboratoriais recentes (<3 meses) de colesterol total, triglicérides e glicemia de jejum. Caso não disponha desses exames, os mesmos poderão ser solicitados sem nenhum custo. Na segunda, terceira e quarta visitas, será oferecido a você um café da manhã, que deverá ser consumido no LAMECC. Ao chegar serão realizadas medidas de peso, altura, perímetro da cintura e bioimpedância para avaliar sua composição corporal e será medida a pressão arterial. Será coletado sangue em jejum e 3 vezes após o consumo do café da manhã. Você preencherá um questionário a cada 30 minutos, até completar 5 horas após o consumo do café da manhã. Também haverá coleta de urina ao longo de cada visita (após cada coleta de sangue).

Quanto aos riscos do estudo, a extração de sangue pode ser dolorosa e causar hematomas (roxo) no local da punção (picada) na dobra do cotovelo, como qualquer outra coleta de sangue que você possa ter feito no passado. As outras medidas não causam risco em potencial, pois são técnicas não invasivas. Para minimizar qualquer risco e/ou desconforto, a coleta de sangue e demais medições serão realizadas por profissionais treinados, em ambiente tranquilo e adequado, utilizando-se de técnicas padronizadas e preconizadas na literatura científica.

Você receberá um relatório dos resultados da avaliação nutricional e dos exames bioquímicos realizados com as devidas orientações nutricionais e, ou, encaminhamento para seu médico, caso necessário.

As amostras e questionários coletados no presente estudo serão armazenados para análises relativas a este projeto e ainda, poderão ser utilizados em outras pesquisas similares a esta. Os resultados desse estudo e de outros futuros serão apresentados, comunicados e/ou publicados no meio científico, mas sempre preservando sua confidencialidade e privacidade.

Você não terá nenhum gasto por sua participação nesse estudo, ao mesmo tempo em que não receberá nenhum tipo de remuneração. Você poderá se recusar a participar ou sair do estudo a qualquer momento depois de dar o seu consentimento, e esta atitude não lhe trará prejuízos no futuro. Em qualquer momento, você poderá fazer perguntas sobre o estudo ou esclarecer dúvidas. Você poderá entrar em contato com Lílian Lelis Lopes ou Daniela Mayumi U. P. Rocha ou Helen Hermana M Hermsdorff para esta finalidade através dos telefones: (31-3899-3388 / 31-3899-1269 / 31-9272-6284).

Ao assinar este documento, confirmo que me foi explicado o objetivo deste estudo, os procedimentos aos quais serei submetido, os riscos e os benefícios potenciais que eu possa experimentar, e os possíveis destinos dos resultados que serão obtidos neste estudo. As perguntas que foram feitas foram satisfatoriamente respondidas, li e compreendi este termo de consentimento, ficando em meu poder uma cópia do mesmo. Ainda assim, em caso de dúvidas não esclarecidas de maneira adequada pelo pesquisador responsável, de discordância com procedimentos ou irregularidade de natureza ética posso buscar auxílio junto ao **Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Viçosa** localizado no campus Viçosa, prédio Arthur Bernardes, sala 04, **Telefone: (31) 3899-2492, e-mail: cep@ufv.br**. Este termo está de acordo com a Resolução 466 do Conselho Nacional de Saúde, de 12 de dezembro de 2012.

Portanto, assino e dou meu consentimento para participar deste estudo.

Viçosa, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2014.

**Identificação do sujeito da pesquisa (voluntário)**

Nome: \_\_\_\_\_

Telefone \_\_\_\_\_ Celular: \_\_\_\_\_ e-mail: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Voluntário

\_\_\_\_\_  
Pesquisador

\_\_\_\_\_  
Profª. Dra. Helen Hermana M. Hermsdorff  
Coordenadora do Projeto DNS/UFV- 3899-1269

## 9.2 Anexo B: História Clínica e Hábitos de Vida



Universidade Federal de Viçosa – UFV  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Departamento de Nutrição e Saúde  
Av. P.H. Rolfs S/N - Campus Universitário. Viçosa, MG.  
CEP.: 36570.000 Tel.: 031 3899-2542 Fax: 031 3899-2545



### HISTORIA CLÍNICA E HÁBITOS PESSOAIS

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

<b>INICIAIS:</b> _____	<b>ID RECRUTAMENTO:</b> _____	<b>ID ESTUDO:</b> _____
Data de nascimento: ___/___/___	Sexo: ( ) masculino	( ) feminino
Idade: _____		
Escolaridade: _____		
Ocupação: _____		
Tabagismo: ( ) fumante ( ) não fumante ( ) ex-fumante		
Etilismo: ( ) não bebe ( ) <2x/semana ( ) >2x/semana		
Alteração peso últimos 03 meses: ( ) Sim ( ) Não Se sim, _____ kg		
História pessoal de: ( ) HAS		
( ) DM		
( ) Dislipidemia		
( ) Doenças da tireóide		
( ) Outras doenças: _____		
Medicação em uso (medicamento, dose, duração do uso): _____		
História pregressa: _____		
História familiar de: ( ) HAS		
( ) DM		
( ) Dislipidemia		
( ) Doenças da tireoide		
( ) Outras doenças: _____		
* Para preenchimento da história familiar, considerar pais e irmãos do voluntário.		
História social: _____		
História dietética:		
Alergia a algum alimento: ( ) Sim ( ) Não Se sim, qual? _____		
Vegetariano: ( ) Sim ( ) Não		
Observações: _____		
Algum hábito alimentar específico? ( ) Sim ( ) Não		
Observações: _____		
<b>Exame físico:</b>		
Peso: _____ kg	Altura: _____ m	IMC: _____ kg/m <sup>2</sup>
PA: _____ mmHg		
Exames bioquímicos:		
Glicemia de jejum: _____ mg/dl	Data: ___/___/___	
Colesterol total: _____ mg/dl	Data: ___/___/___	
Triglicerídeos: _____ mg/dl	Data: ___/___/___	

### 9.3 Anexo C: Questionário Internacional de Atividade Física



Universidade Federal de Viçosa – UFV  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Departamento de Nutrição e Saúde  
Av. P.H. Rolfs S/N - Campus Universitário. Viçosa, MG.  
CEP.: 36570.000 Tel.: 031 3899-2542 Fax: 031 3899-2545



#### QUESTIONÁRIO INTERNACIONAL DE ATIVIDADE FÍSICA (IPAQ) – VERSÃO CURTA

Nome: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Idade : \_\_\_\_ Sexo: F ( ) M ( )

Nós estamos interessados em saber que tipos de atividade física as pessoas fazem como parte do seu dia a dia. As perguntas estão relacionadas ao tempo que você gasta fazendo atividade física na ÚLTIMA semana. As perguntas incluem as atividades que você faz no trabalho, para ir de um lugar a outro, por lazer, por esporte, por exercício ou como parte das suas atividades em casa ou no jardim. Suas respostas são MUITO importantes. Por favor, responda cada questão mesmo que considere que não seja ativo. Obrigado pela sua participação!

Para responder as questões lembre que:

- atividades físicas VIGOROSAS são aquelas que precisam de um grande esforço físico e que fazem respirar MUITO mais forte que o normal
- atividades físicas MODERADAS são aquelas que precisam de algum esforço físico e que fazem respirar UM POUCO mais forte que o normal

Para responder as perguntas pense somente nas atividades que você realiza por pelo menos 10 minutos contínuos de cada vez.

1a Em quantos dias da última semana você CAMINHOU por pelo menos 10 minutos contínuos em casa ou no trabalho, como forma de transporte para ir de um lugar para outro, por lazer, por prazer ou como forma de exercício?

Dias \_\_\_\_ por SEMANA ( ) Nenhum

1b Nos dias em que você caminhou por pelo menos 10 minutos contínuos quanto tempo no total você gastou caminhando por dia?

Horas: \_\_\_\_ Minutos: \_\_\_\_

2a. Em quantos dias da última semana, você realizou atividades MODERADAS por pelo menos 10 minutos contínuos, como por exemplo, pedalar leve na bicicleta, nadar, dançar, fazer ginástica aeróbica leve, jogar vôlei recreativo, carregar pesos leves, fazer serviços domésticos na casa, no quintal ou no jardim como varrer, aspirar, cuidar do jardim, ou qualquer atividade que fez aumentar moderadamente sua respiração ou batimentos do coração (POR FAVOR NÃO INCLUA CAMINHADA)

Dias \_\_\_\_\_ por SEMANA ( ) Nenhum

2b. Nos dias em que você fez essas atividades moderadas por pelo menos 10 minutos contínuos, quanto tempo no total você gastou fazendo essas atividades por dia? Horas: \_\_\_\_\_ Minutos: \_\_\_\_\_

3a Em quantos dias da última semana, você realizou atividades VIGOROSAS por pelo menos 10 minutos contínuos, como por exemplo correr, fazer ginástica aeróbica, jogar futebol, pedalar rápido na bicicleta, jogar basquete, fazer serviços domésticos pesados em casa, no quintal ou cavoucar no jardim, carregar pesos elevados ou qualquer atividade que fez aumentar MUITO sua respiração ou batimentos do coração. Dias \_\_\_\_\_ por SEMANA ( ) Nenhum

3b Nos dias em que você fez essas atividades vigorosas por pelo menos 10 minutos contínuos quanto tempo no total você gastou fazendo essas atividades por dia?

Horas: \_\_\_\_\_ Minutos: \_\_\_\_\_

Estas últimas questões são sobre o tempo que você permanece sentado todo dia, no trabalho, na escola ou faculdade, em casa e durante seu tempo livre. Isto inclui o tempo sentado estudando, sentado enquanto descansa, fazendo lição de casa visitando um amigo, lendo, sentado ou deitado assistindo TV. Não inclua o tempo gasto sentado durante o transporte em ônibus, trem, metrô ou carro.

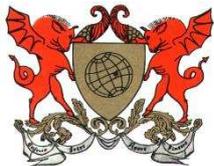
4a. Quanto tempo no total você gasta sentado durante um dia de semana?

\_\_\_\_\_ horas \_\_\_\_\_ minutos

4b. Quanto tempo no total você gasta sentado durante em um dia de final de semana?

\_\_\_\_\_ horas \_\_\_\_\_ minutos

#### 9.4 Anexo D: Folha de Instruções para Participação no Estudo



Universidade Federal de Viçosa – UFV  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Departamento de Nutrição e Saúde  
Av. P.H. Rolfs S/N - Campus Universitário. Viçosa, MG.  
CEP.: 36570.000 Tel.: 031 3899-2542 Fax: 031 3899-2545



### INSTRUÇÕES PARA A SEMANA ANTERIOR AO ESTUDO

ENTRE OS DIAS ...../...../..... E ...../...../.....

Seguir a “dieta branca” que será entregue e explicada a você, lembrando de restringir o consumo de alimentos ricos em antioxidantes nos três dias anteriores à visita, como: todas as frutas e sucos de frutas; hortaliças (batata e mandioca podem ser consumidas), café; castanhas (nozes, amêndoas, castanha de caju); qualquer tipo de suplemento vitamínico, mineral ou fitoterápico; alimentos enriquecidos com ômega-3.

NO DIA ...../...../....., ANTERIOR À PRÓXIMA VISITA

- Jantar aproximadamente às ..... h

PARA O DIA DA VISITA: ...../...../.....

- Comparecer no Laboratório de Metabolismo Energético e Composição Corporal às 7:00h.
- Estar em jejum de 12h.
- Vestir roupas leves.
- Não realizar exercícios físicos intensos no dia anterior à visita.

## 9.5 Anexo E: Dieta branca (2 dias)



Universidade Federal de Viçosa – UFV  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Departamento de Nutrição e Saúde  
Av. P.H. Rolfs S/N - Campus Universitário. Viçosa, MG.  
CEP.: 36570.000 Tel.: 031 3899-2542 Fax: 031 3899-2545



Para a realização de sua participação como voluntária no projeto **“MARCADORES METABÓLICOS, INFLAMATÓRIOS, GENÉTICOS E DO APETITE EM RESPOSTA AO CONSUMO DE ÁCIDOS GRAXOS MONOINSATURADOS E FRUTOSE”** será necessário que se siga uma “dieta branca”, durante os dois dias (48 horas) antes da coleta de sangue, para não interferir nos resultados finais do estudo.

Essa “dieta branca” é pobre carotenóides e polifenóis. Desse modo, não será permitido o consumo, nos dois dias anteriores ao estudo, dos seguintes alimentos: café, verduras de cores fortes (cenoura, beterraba, brócolis, abóbora, tomate, couve, alface), achocolatado, chás todos os tipos de frutas, linhaça, manteiga, molho de tomate, mostarda, carne de boi, pão integral, cerveja.

Por outro lado, será permitido o consumo de carnes brancas, como frango sem pele, peito de peru, ovos e lombo de porco, queijos, batata, arroz, inhame, mandioca, macarrão, margarina, maionese, azeite de oliva, óleo de girassol, torradas, molho branco, iogurte natural ou coco (não pode conter pedaços de frutas).

Para facilitar o seguimento de tal “dieta branca”, você receberá um plano alimentar para cada dia, adequado às suas necessidades nutricionais e aos alimentos que podem ser consumidos e suas quantidades. Em caso de que não consuma algum alimento incluído na dieta, o responsável será capaz de substituí-lo por outro.

### Notas importantes

- Beba bastante água durante o dia, entre 6 a 8 copos por dia.
- A colação, o lanche e a ceia podem ser trocados entre si durante o mesmo dia.
- É muito importante que respeite as quantidades dos alimentos incluídos no plano alimentar, principalmente aqueles ricos em lipídios.

*Em caso de dúvidas sobre o seguimento da dieta ou alimentos, você poderá entrar em contato com Lílian Lelis Lopes através dos telefones (31-8515-2919-oi/31-9272-6284- TIM).*

Dia 1- DATA: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

<b>Refeição</b>	<b>Alimento</b>	<b>Quantidade Medida caseira e g/ml</b>
<b>Desjejum</b>	Leite Semi- Desnatado Pão Francês Margarina Torrada	<p><b>Será calculado para cada alimento as quantidades em g/ml e medidas caseiras de acordo com a necessidade energética de cada voluntária</b></p>
<b>Colação</b>	Biscoito água e sal(cream crackers)	
<b>Almoço</b>	Couve-Flor Cozida Arroz Cozido Bife de Frango Purê de Batata  Água	
<b>Lanche da Tarde</b>	Pão de Queijo	
<b>Jantar</b>	Pão de Forma (normal, sem grãos). Queijo Mussarela <b><u>OU</u></b> Peito de Peru Margarina <b><u>OU</u></b> Maionese	
<b>Ceia</b>	Biscoito água e sal (cream crackers) Iogurte Natural Açúcar	

Dia 2- DATA: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

<b>Refeição</b>	<b>Alimento</b>	<b>Quantidade Medida caseira e g/ml</b>
<b>Desjejum</b>	Leite Semi-Desnatado Pão Francês Requeijão Queijo Minas	<b>Será calculado para cada alimento as quantidades em g/ml e medidas caseiras de acordo com a necessidade energética de cada voluntária</b>
<b>Colação</b>	Pão de batata	
<b>Almoço</b>	Batata Cozida Peixe Grelhado Macarrão ao Alho e Óleo  Água	
<b>Lanche da Tarde</b>	Biscoito água e sal Iogurte Natural Açúcar	
<b>Jantar</b>	Sopa de Inhame com Peito de Frango Desfiado	
<b>Ceia</b>	Iogurte Natural Açúcar	

**9.6 Anexo F: Caderno de Registro de Dados (CRD)**

# **CADERNO DE REGISTRO DE DADOS**

*Projeto Suco de Laranja*

ID do paciente:
Iniciais:
ID Recrutamento:

**Instruções para o preenchimento do caderno de coleta de dados:**

- Cada registro deverá ser datado e assinado pelo pesquisador autorizado.
- O pesquisador deverá completar todas e cada uma das quadrículas. Caso não se dispore de algum dado que é solicitado, deverá colocar ND (não disponível), NR (não realizado) ou DE (desconhecido), de acordo com o que corresponda.
- Utilize caneta de tinta preta ou azul para o preenchimento.
- As datas serão registradas no seguinte formato: DD-MM-AAAA
- Os erros devem ser riscados com uma linha horizontal, escrevendo ao lado da correção. Não utilize nenhum tipo de corretivo líquido ou em fita.
- As datas que não estiverem de acordo com a sequência esperada deverão ser comprovadas e corrigidas, caso se tratar de um erro de transcrição.
- Os resultados incomuns ou valores laboratoriais que excedam os intervalos fixados deverão ser verificados e seu significado será anotado ao lado do dado.

### **Compromisso do pesquisador**

Eu, \_\_\_\_\_  
(nome e sobrenome do pesquisador), certifico que as informações contidas neste caderno de coleta de dados são um registro completo e preciso dos dados correspondentes a este paciente, que o estudo foi realizado de acordo com as diretrizes emitidas pelo protocolo e com os princípios éticos da Declaração de Helsinki (52<sup>nd</sup> WMA Assembleia Geral, em Edimburgo, Escócia, Outubro de 2000) e que se obteve o consentimento do paciente para participar deste estudo.

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

## Cronograma de visitas

PARÂMETRO	INCLUSÃO	VISITA 1	VISITA 2	VISITA 3
Cumprimento dos critérios de inclusão	X			
Consentimento informado	X			
História clínica	X			
Exame físico	X	X	X	X
Avaliação da atividade física	X			
Registro alimentar	X			
Peso	X	X	X	X
Altura	X	X	X	X
IMC	X	X	X	X
Perímetro da cintura		X	X	X
Pressão arterial	X	X	X	X
Bioimpedância	X			X
Refeição teste		X	X	X
Coleta de sangue		X	X	X
Coleta de urina		X	X	X
VAS/Palatibilidade		X	X	X

O X indica quando será realizado o teste com o paciente.

## Período de inclusão

### Critérios de inclusão

<input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO	Sexo feminino
<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Idade entre 20 e 40 anos
<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Não está em período gestacional, menopausa ou lactação
<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Ausência de processo infeccioso
<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Ausência de doenças inflamatórias, hormonais, cardíaca respiratória, renal, hepática ou gastrointestinal que afete digestão e absorção de nutrientes
<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Ausência de uso de medicamentos que possam afetar metabolismo energético, glicídico ou lipídico
<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Não fumante
<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Não tem antecedentes de alcoolismo ou dependência de drogas
<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Peso estável nos últimos 3 meses
<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Não é atleta
<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	CT<240, TG<150, GJ<100, PA<130x85

Para que o voluntário possa ser incluído no estudo, todas as respostas aos critérios de inclusão devem ser "SIM".

Assinatura do consentimento livre informado (duas vias):  Sim  Não

Imprescindível assinar o consentimento informado para continuar o estudo.

Entrega dos registros alimentares e orientação para preenchimento:  Sim  Não

Preenchimento do IPAQ:  Sim  Não

Resultado do IPAQ:  muito ativo  irregularmente ativo  sedentário

#### Para a próxima visita:

<input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO	DATA DA PRÓXIMA VISITA: ___/___/___
<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Pedir ao paciente para vir em jejum de 12 horas, entregar e repassar as demais orientações para a próxima visita

Observações:

---



**BIA**

<b>% gordura corporal</b>	
<b>% massa magra</b>	
<b>Gasto energético total</b>	
<b>Taxa de metabolismo basal</b>	

Coleta de sangue T0	( ) Sim	( ) Não	Hora: _____
Coleta de urina T0	( ) Sim	( ) Não	Hora: _____
VAS T0	( ) Sim	( ) Não	Hora: _____
Início refeição	( ) Sim	( ) Não	Hora: _____
Término refeição	( ) Sim	( ) Não	Hora: _____
VAS T1	( ) Sim	( ) Não	Hora: _____
Coleta de sangue T2	( ) Sim	( ) Não	Hora: _____
Coleta de urina T2	( ) Sim	( ) Não	Hora: _____
VAS T2	( ) Sim	( ) Não	Hora: _____
Coleta de sangue T3	( ) Sim	( ) Não	Hora: _____
Coleta de urina T2	( ) Sim	( ) Não	Hora: _____
VAS T3	( ) Sim	( ) Não	Hora: _____
VAS T4	( ) Sim	( ) Não	Hora: _____
Coleta de sangue T5	( ) Sim	( ) Não	Hora: _____
Coleta de urina T5	( ) Sim	( ) Não	Hora: _____
VAS T5	( ) Sim	( ) Não	Hora: _____

Observações:

---

---

---



**BIA**

<b>% gordura corporal</b>	
<b>% massa magra</b>	
<b>Gasto energético total</b>	
<b>Taxa de metabolismo basal</b>	

Coleta de sangue T0	( ) Sim	( ) Não	Hora: _____
Coleta de urina T0	( ) Sim	( ) Não	Hora: _____
VAS T0	( ) Sim	( ) Não	Hora: _____
Início refeição	( ) Sim	( ) Não	Hora: _____
Término refeição	( ) Sim	( ) Não	Hora: _____
VAS T1	( ) Sim	( ) Não	Hora: _____
Coleta de sangue T2	( ) Sim	( ) Não	Hora: _____
Coleta de urina T2	( ) Sim	( ) Não	Hora: _____
VAS T2	( ) Sim	( ) Não	Hora: _____
Coleta de sangue T3	( ) Sim	( ) Não	Hora: _____
Coleta de urina T2	( ) Sim	( ) Não	Hora: _____
VAS T3	( ) Sim	( ) Não	Hora: _____
VAS T4	( ) Sim	( ) Não	Hora: _____
Coleta de sangue T5	( ) Sim	( ) Não	Hora: _____
Coleta de urina T5	( ) Sim	( ) Não	Hora: _____
VAS T5	( ) Sim	( ) Não	Hora: _____

Observações:

---

---

---



**BIA**

<b>% gordura corporal</b>	
<b>% massa magra</b>	
<b>Gasto energético total</b>	
<b>Taxa de metabolismo basal</b>	

Coleta de sangue T0	( ) Sim	( ) Não	Hora: _____
Coleta de urina T0	( ) Sim	( ) Não	Hora: _____
VAS T0	( ) Sim	( ) Não	Hora: _____
Início refeição	( ) Sim	( ) Não	Hora: _____
Término refeição	( ) Sim	( ) Não	Hora: _____
VAS T1	( ) Sim	( ) Não	Hora: _____
Coleta de sangue T2	( ) Sim	( ) Não	Hora: _____
Coleta de urina T2	( ) Sim	( ) Não	Hora: _____
VAS T2	( ) Sim	( ) Não	Hora: _____
Coleta de sangue T3	( ) Sim	( ) Não	Hora: _____
Coleta de urina T2	( ) Sim	( ) Não	Hora: _____
VAS T3	( ) Sim	( ) Não	Hora: _____
VAS T4	( ) Sim	( ) Não	Hora: _____
Coleta de sangue T5	( ) Sim	( ) Não	Hora: _____
Coleta de urina T5	( ) Sim	( ) Não	Hora: _____
VAS T5	( ) Sim	( ) Não	Hora: _____

Observações:

---

---

---

## 9.7 Anexo G: Composição centesimal dos Muffins de AGS usados no estudo

### MUFFIN BACON E QUEIJO

Alimentos	Peso (g)	Ref.	Carb (g)	Fibra (g)	Prot (g)	Lip (g)	Colesterol (mg)	Sat (mg)	Mono (mg)	Poli (mg)
Bacon	71,6	Philippi	0	0	0	70,59044	72,0296	32,06964	30,0004	5,41296
Farinha de Trigo	44	Taco	33,044	1,012	4,312	0,616	0	0,132	0,088	0,176
Leite 3,5% Gordura - Padrão	44	Philippi	2,0548	0	1,452	1,4608	5,984	0,9416	0,3784	0,0616
Queijo, Mozzarella	36	Taco	1,08	0	8,136	9,072	28,8	5,112	2,16	0,18
Ovo de Galinha	10,46	Taco	0,16736	0	1,3598	0,93094	37,2376	0,27196	0,37656	0,12552
Iogurte Natural Integral	9	Taco	0,171	0	0,369	0,27	1,26	0,162	0,081	0,009
Manteiga com Sal	7	Taco	0,007	0	0,028	5,768	14,07	3,444	1,428	0,084
Açúcar Cristal	4	Taco	3,984	0	0,012	0	0	0	0	0
Fermento Químico (Pó)	1,2	Taco	0	0	0	0	0	0	0	0
Sal	0,48	Taco	0,21072	0	0,0024	0,00048	0	0	0	0
<b>Total (g)</b>	-	-	40,71888	1,012	15,6712	88,70866	159,3812	42,1332	34,51236	6,04908
<b>kcal</b>	-	-	162,87552	-	62,6848	798,37794	-	379,1988	310,61124	54,44172
<b>% kcal</b>	-	-	15,906772	-	6,1219316	77,971297	-	37,033366	30,33495789	5,31689479
<b>Total (kcal)</b>	1023,93826									

Gorduras	%
Totais	100
Sat	47,496152
Mono	38,9052884
Poli	6,81904112

## 9.8 Anexo H: Composição centesimal dos Muffins de AGMI usados no estudo

### MUFFIN AZEITE E CASTANHAS

Alimentos	Peso (g)	Ref.	Carb (g)	Fibra (g)	Prot (g)	Lip (g)	Colesterol (mg)	Sat (mg)	Mono (mg)	Poli (mg)
Azeite de Oliva ExtraVirgem	52,5	Taco	0	0	0	52,5	0	7,8225	39,6375	4,9875
Água (Dissolver o Leite)	50	-	0	0	0	0	0	0	0	0
Castanha de Caju	35	Taco	10,185	1,295	6,475	16,205	0	2,695	9,275	2,835
Farinha de Trigo	15	Taco	11,265	0,345	1,47	0,21	0	0,045	0,03	0,06
Amido de Milho	30	Taco	26,13	0,21	0,18	0	0	0	0	0
Ovo de Galinha	10	Taco	0,16	0	1,3	0,89	35,6	0,26	0,36	0,12
Leite Desnatado (Pó)	5	Taco	2,65	0	1,735	0,045	1,25	0,03	0,01	0
òleo de canola	20	Taco	0	0	0	20	0	1,58	12,44	5,68
Sal	1	Taco	0	0	0	0	0	0	0	0
Fermento Químico (Pó)	0,6	Taco	0,2634	0	0,003	0,0006	0	0	0	0
<b>Total (g)</b>	-	-	50,6534	1,85	11,163	89,8506	36,85	12,4325	61,7525	13,6825
<b>kcal</b>	-	-	202,6136	-	44,652	808,6554	-	111,8925	555,7725	123,1425
<b>% kcal</b>	-	-	19,188329	-	4,2287254	76,582945	-	10,596673	52,63390917	11,662094
<b>Total (kcal)</b>	1055,921									

Gorduras	%
Totais	100
Sat	13,8368581
Mono	68,7279773
Poli	10,8640315

## 9.9 Anexo I: Aprovações do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA  
**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS**  
*Campus Universitário - Viçosa, MG - 36570-000 - Telefone: (31) 3899-1269*

---

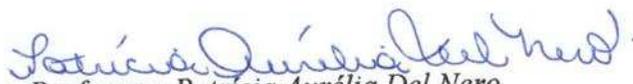
Of. Ref. Nº 184/2011/Comitê de Ética

Viçosa, 16 de dezembro de 2011.

Prezada Professora:

Cientificamos V. S<sup>a</sup>. de que o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, em sua 9<sup>a</sup> Reunião de 2011, realizada nesta data, analisou e aprovou, sob o aspecto ético, o projeto intitulado *Resposta inflamatória frente ao consumo de componentes dietéticos específicos: um estudo nutrigenômico*.

Atenciosamente,

  
Professora Patrícia Aurélio Del Nero  
Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos  
Presidente

À Professora  
Helen Hermana Miranda Hermsdorff  
Departamento de Nutrição e Saúde

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Marcadores metabólicos, inflamatórios, genéticos e do apetite em resposta ao consumo de ácidos graxos monoinsaturados e frutose

**Pesquisador:** HELEN HERMANA MIRANDA HERMSDORFF

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 26469014.0.0000.5153

**Instituição Proponente:** Departamento de Nutrição e Saúde

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 542.585

**Data da Relatoria:** 04/02/2014

**Apresentação do Projeto:**

A obesidade está comumente associada a múltiplas condições adversas que aumentam o risco de doenças cardiovasculares, síndrome metabólica e ainda está associada à inflamação. Sendo assim, a investigação de marcadores inflamatórios se torna de extrema importância para avaliar essa relação da inflamação com as doenças crônicas e a ingestão de alimentos com potencial anti-inflamatório é de grande relevância. Neste contexto, estudos pós-prandiais tem sua relevância em demonstrar o efeito fisiológico de nutrientes específicos após sua ingestão. A ingestão de ácidos graxos monoinsaturados (AGMI) podem exercer efeito benéfico na manutenção da saúde pela diminuição da colesterolemia sem diminuir os níveis de HDL-C e provocar oxidação lipídica. Adicionado à ingestão de frutas e sucos de frutas, como o suco de laranja, levam a uma proteção do organismo contra agentes inflamatórios e pró-oxidantes. Neste contexto, este estudo visa identificar se o estado nutricional (eutrofia frente ao sobrepeso e obesidade) pode influenciar na resposta pós-prandial em relação ao estado inflamatório. Diante do exposto, Avaliar a resposta pósprandial

**Endereço:** Universidade Federal de Viçosa, prédio Arthur Bernardes, piso inferior  
**Bairro:** campi Viçosa **CEP:** 36.570-000  
**UF:** MG **Município:** VICOSA  
**Telefone:** (31)3899-2492 **Fax:** (31)3899-2492 **E-mail:** cep@ufv.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
VIÇOSA - UFV



Continuação do Parecer: 542.585

metabólica e inflamatória, bem como o estado de fome/ saciedade, depois de consumir uma refeição rica em ácidos graxos

monoinsaturados, quando essa refeição é acompanhada do consumo de suco de laranja, de água e de uma bebida a base de frutose, em mulheres

adultas eutróficas, com peso normal ou com sobrepeso/ obesidade.

**Objetivo da Pesquisa:**

Avaliar a resposta pós-prandial metabólica e inflamatória, bem como o estado de fome/ saciedade, depois de consumir uma refeição rica em ácidos

graxos monoinsaturados, quando essa refeição é acompanhada do consumo de suco de laranja, de água e de uma bebida a base de frutose, em

mulheres adultas eutróficas, com peso normal ou com sobrepeso/ obesidade.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Adequadamente descritos

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Atende aos requisitos do CEP

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Atende aos requisitos do CEP

**Recomendações:**

nenhuma

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

nenhuma

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O CEP/UFV em sua reunião realizada no dia 12 de fevereiro do corrente ano, discutiu, analisou e decidiu APROVAR o referido projeto de pesquisa em pauta.

Fica a pesquisadora notificada a apresentar o Relatório final por ocasião do encerramento da pesquisa.

Após a aprovação do relatório final, favor apresentar, via notificação, o Comunicado de

**Endereço:** Universidade Federal de Viçosa, prédio Arthur Bernardes, piso inferior  
**Bairro:** campi Viçosa **CEP:** 36.570-000  
**UF:** MG **Município:** VICOSA  
**Telefone:** (31)3899-2492 **Fax:** (31)3899-2492 **E-mail:** cep@ufv.br

## 10. APÊNDICES

### 10.1 Apêndice A: Artigo de Revisão (publicado em janeiro de 2016 na revista *Atherosclerosis*)

*Atherosclerosis* 244 (2016) 211–215



Review article

#### Saturated fatty acids trigger TLR4-mediated inflammatory response



D.M. Rocha<sup>a</sup>, A.P. Caldas<sup>a</sup>, L.L. Oliveira<sup>b</sup>, J. Bressan<sup>a</sup>, H.H. Hermsdorff<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Nutrition and Health, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brazil

<sup>b</sup> Department of General Biology, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brazil

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 20 August 2015

Received in revised form

16 October 2015

Accepted 16 November 2015

Available online 2 December 2015

##### Keywords:

SFA

Lauric acid

TLR4 ligands

CD14

CD36

Inflammation

#### ABSTRACT

Toll-like receptors (TLR) mediate infection-induced inflammation and sterile inflammation by endogenous molecules. Among the TLR family, TLR4 is the best understood. However, while its downstream signaling pathways have been well defined, not all ligands of TLR4 are currently known. Current evidence suggests that saturated fatty acids (SFA) act as non-microbial TLR4 agonists, and trigger its inflammatory response. Thus, our present review provides a new perspective on the potential mechanism by which SFAs could modulate TLR4-induced inflammatory responses: (1) SFAs can be recognized by CD14-TLR4-MD2 complex and trigger inflammatory pathways, similar to lipopolysaccharide (LPS). (2) SFAs lead to modification of gut microbiota with an overproduction of LPS after a high-fat intake, enhancing this natural TLR4 ligand. (3) In addition, this metabolic endotoxemia leads to an oxidative stress thereby producing atherogenic lipids – oxLDL and oxidized phospholipids – which trigger CD36-TLR4-TLR6 inflammatory response. (4) Also, the high SFA consumption increases the lipemia and the mmLDL and oxLDL formation through oxidative modifications of LDL. The mmLDL, unlike oxLDL, is involved in activation of the CD14-TLR4-MD2 inflammatory pathway. Those molecules can induce TLR4 inflammatory response by MyD88-dependent and/or MyD88-independent pathways that, in turn, promotes the expression of proinflammatory transcript factors such as factor nuclear kappa B (NF-κB), which plays a crucial role in the induction of inflammatory mediators (cytokines, chemokines, or costimulatory molecules) implicated in the development and progression of many chronic diseases.

© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

#### 1. Introduction

The microbial recognition process is mediated by pattern recognition receptors (PRRs) which are linked to the innate immune system, and are mostly expressed in macrophages and

dendritic cells, but they are also present in nonimmune cells [1,2]. The major PRRs include toll-like receptors (TLRs) and C-type lectin receptors. The TLRs are transmembrane proteins expressed on cell surfaces which recognize mainly microbial membrane components. They are the best characterized PRRs and are linked to

**Abbreviations used:** AKT, PKB – protein kinase B; ASC, apopto-sis-associated speck-like protein containing a CARD; CD14, cluster of differentiation 14; CD36, cluster of differentiation 36; COX2, ciclo-oxigenase-2; DAMP, danger-associated molecular pattern; Gro 1, Cxcl1 – chemokine (C-X-C Motif) ligand 1; IFN, type 1 interferon; IKK, IκB kinase; IL, interleukin; IRAK, IL-1R-associated kinase; IRF3, interferon regulating factor 3; IκB, inhibitor of NF-κB; LBP, LPS-binding protein; LDL, low-density lipoprotein; LPS, lipopolysaccharides; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MCP1, monocyte chemoattractant protein 1; MD2, myeloid differential protein-2; MIP, macrophage inflammatory protein; mmLDL, minimally modified low-density lipoprotein; MyD88, myeloid differentiating primary response gene 88; NF-κB, factor nuclear kappa B; NLRP3, NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3; oxLDL, oxidize low density lipoprotein; oxPL, oxidize phospholipids; PAMP, pathogen-associated molecular pattern; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; PRR, pattern recognition receptors; PUFA, polyunsaturated fatty acid; RANTES, regulated on activation, normal T cell expressed and secreted; RIP1, receptor-interacting protein 1; ROS, reactive oxygen species; SFA, saturated fatty acid; TAB1, TGF-beta activated kinase 1/ MAP3K7 binding protein 1; TAK1, transforming growth factor-β-activate kinase; TBK1, TRAF family member-associated NF-κB activator (TANK) binding kinase-1; TIR, toll-interleukin receptor; TIRAP, TIR domain-containing adaptor protein; TLR, toll-like receptor; TNF, tumor necrosis factor; TRAF, TNF-receptor associated factor; TRAM, TRIF related adaptor molecule; TRIF, TIR domain-containing adaptor-inducing IFN-β; VCAM1, vascular cell adhesion molecule-1.

\* Corresponding author. Department of Nutrition and Health, Universidade Federal de Viçosa, Av. P.H. Rolfs s/n, Campus Universitário, 36570-900, Viçosa - Minas Gerais, Brazil.

E-mail addresses: [daniela.rocha@ufv.br](mailto:daniela.rocha@ufv.br) (D.M. Rocha), [paulacaldas06@hotmail.com](mailto:paulacaldas06@hotmail.com) (A.P. Caldas), [leandro.jicursi@ufv.br](mailto:leandro.jicursi@ufv.br) (L.L. Oliveira), [jbrm@ufv.br](mailto:jbrm@ufv.br) (J. Bressan), [helenhermana@ufv.br](mailto:helenhermana@ufv.br) (H.H. Hermsdorff).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.11.015>

0021-9150/© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

bacterial and viral infection response [2,3].

Among TLRs, TLR4 is unique due to its ability to activate both MyD88-dependent and MyD88-independent pathways expressing predominantly inflammatory molecules and type I interferons (IFNs), respectively. Also, TLR4 is the only known member of the TLR family that engages all four toll-interleukin receptor (TIR) domain-containing adaptor proteins to signaling the inflammatory response [3,4].

Different sources of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) derived from bacterial, viral and fungus pathogens activate the TLR signaling [5]. The LPS of Gram-negative bacterial cell walls are the major PAMP, and a natural TLR4 ligand [5]. Also, TLR4 are activated by endogenous danger-associated molecular patterns (DAMPs) released as a consequence of injury and inflammation, such as oxidized low density lipoprotein (oxLDL) and oxidized phospholipids (oxPL) [5,6]. This sterile inflammatory, likewise microbial induced inflammation, can recruit neutrophils and macrophages leading to production of pro-inflammatory cytokines and chemokines, mainly tumor necrosis factor (TNF) and interleukin (IL)-1 [7].

Other possible nonmicrobial agonists for TLR4 include saturated fatty acids (SFA), but little has been explored on this subject. In fact, evidence suggests that SFA and LPS share the same inflammatory signaling pathway as TLR4, thus promoting expression of pro-inflammatory transcript factors, such as factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) and cyclooxygenase 2 (COX2) [8].

In order to improve our understanding on the inflammatory process mediated by SFA, we present a new perspective on the potential mechanism by which SFAs could act as TLR4-activating promoters and trigger pro-inflammatory responses involved in the development and progression of many chronic diseases and metabolic disorders, including cancer, cardiovascular diseases, metabolic syndrome and obesity-induced insulin resistance.

## 2. SFA trigger TLR4 inflammatory pathways

SFA particularly lauric acid (C12:0), similarly to LPS, modulate the activation of TLR4 [8–10]. In fact, the LPS is recognized by an accessory protein cluster of differentiation 14 (CD14) which is a glycoprotein, either glycosylphosphatidylinositol present in two forms: membrane bounded – at the outer leaflet of the plasma membrane – or soluble in blood [1,11]. The CD14 is best characterized for its capability to interact with LPS-binding protein (LBP) and transfer LPS to the TLR4 accessory molecule myeloid differential protein-2 (MD2). The TLR4-MD2 forms a dimer in the plasma membrane lipid [1,6]. Upon LPS recognition, the CD14-TLR4-MD2 complex engages TIRAP-MyD88 adaptors and leads to MyD88-dependent response, subsequently the CD14-TLR4-MD2 complex is endocytosed and recruits TRAM-TRIF adaptors which elicits MyD88-independent response [1,3], as we will describe below. Lee et al. (2003) suggest that both CD14 and MD2 are required for TLR4 activation by a lauric acid like LPS, signaling the inflammatory pathway of CD14-TLR4-MD2 complex [8].

Gut microbiota is a huge reservoir of LPS, which under normal conditions causes no harm in the intestinal lumen. However, a high-fat diet has been shown to induce gut microbiota alterations, raising the proportion of Gram-negative bacteria with an over-expansion of LPS, and increasing the intestinal permeability. Thus, this process promotes a bacterial translocation of Gram-negative bacteria, and endotoxin-produced bacteria from intestinal mucosa to the blood stream. This metabolic endotoxemia caused by LPS can activate the TLR4 mediated by LBP, CD14 and MD2, which leads to a MyD88-dependent and MyD88-independent response [12].

Besides the LPS, which is a classical PAMP, DAMPs derived from gut microbiota can also activate the TLR4 inflammatory pathway.

Those DMAPs, such as oxLDL and oxPL, can be formed from an overproduction of LPS by inflammatory response and oxidative stress [6].

The oxLDL is known as a specific ligand of cluster of differentiation 36 (CD36) [13]. The CD36 is a glycosylated protein member of the class B scavenger receptor family, which plays an important role in glucose and fatty acid metabolism [13]. This scavenger receptor is found on the surface of diverse cell types and is also involved in TLR-dependent inflammatory response induced by various ligands such as lipid-associated products of microbial or endogenous origin [1,13].

oxLDL is sequestered by CD36 and induces intracellular CD36-TLR4-TLR6 heteromerization [14]. The CD36-TLR4-TLR6 signaling propagates by both MyD88 and TRIF adaptors, inducing pro-inflammatory mediators through MyD88-dependent and MyD88-independent pathways in absence of MD2 and CD14 that are essential cofactors for recognition of LPS by the TLR4 complex [14]. Furthermore, the CD36-TLR4-TLR6 complex acting via NF- $\kappa$ B and reactive oxygen species (ROS) primes the NLRP3 (NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3) inflammasome in response to oxLDL. Also, oxLDL recognition and endocytosis by CD36 results in the formation of intracellular cholesterol crystals that activates NLRP3 via lysosomal destabilization and stimulates IL-1 $\beta$  and IL-18 formation [2,15]. Moreover, oxPL has been proposed as a -TLR4 agonist, which activates MyD88-independent pathways and induces IL-6 production [16], but to date, little has been explored about this subject.

Furthermore, SFA cause a more pronounced lipemia than mono and polyunsaturated fatty acids (PUFA) [17]. Also, after consumption of a high-fat meal, the lipid peroxidation by ROS results in a minimally modified low-density lipoprotein (mmLDL) formation and the generation of extensive amounts of oxLDL [18]. The mmLDL represents an early product of progressive LDL oxidation, formed before the oxLDL [19]. Both are known as pro-inflammatory and pro-atherogenic lipoproteins [11,20]. In addition, occurs a local production of oxPL [16].

Although the polyunsaturated fatty acids (PUFA) are more prone to oxidation and oxLDL synthesis due to their high degree of unsaturation [21], experimental studies have shown that n-3 PUFA inhibit the TLR4-induced signaling pathways and target gene expression [8,10]. This fact seems to be related to the anti-inflammatory effects of PUFA mediated by the G protein-coupled receptor 120 (GPR120). The stimulation of GPR120 with n-3 PUFA inhibit TLR4 signaling probably by its association with  $\beta$ -arrestin2. This complex is internalized, and  $\beta$ -arrestin2 binds to TAB1 (TGF-beta-activated kinase 1/MAP3K7 binding protein 1), resulting in inhibition of TAK1 (transforming growth factor- $\beta$ -activate kinase) phosphorylation and activation and, consequently, the inactivation of the TLR4 signaling [22]. In addition, n3 PUFA disrupts the translocation of TLR4 into lipid raft, preventing its activation [9].

Like oxLDL, the mmLDL is an endogenous TLR4 ligand which is not recognized by scavenger receptors but binds to a CD14 receptor, and like LPS, stimulates the classic TLR4 response through a CD14-TLR4-MD2 complex and induces the activating protein-1 (AP1) and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) activation [1,19]. Notable, unlike oxLDL, the mmLDL is not internalized [18]. Moreover, the increased exposure of mmLDL can enhance sterile inflammation by increased uptake of oxLDL, probably mediated by a higher expression of CD36 [11].

## 3. TLR4 activation

Specifically, TLR4 engages all four toll-interleukin receptor (TIR) adaptors proteins to signing the chain reaction needed to activate intracellular signaling inflammatory response, unlike other TLRs

family members [4]. The four TIR domain-containing adaptors are MyD88, TIRAP, TRAM and TRIF. These adaptors initiate a chain of phosphorylation and ubiquitination reaction, and the adaptor “choice” determines the transcriptional response [3]. The MyD88 is an adaptor protein recruited by TIRAP and is involved in the expression of pro-inflammatory molecules, which is a MyD88-dependent response. Whereas, in the MyD88-independent pathway, TRIF recruited by TRAM elicits a type I interferon response, and also mediates the production of pro-inflammatory molecules in a delayed signaling through endocytosis mechanisms (late signaling) [1,23].

Furthermore, in response to oxLDL, CD36 induces intracellular CD36-TLR4-TLR6 heteromerization [15], and both MyD88 and TRIF adaptors induce pro-inflammatory mediators through MyD88-dependent and MyD88-independent pathways [14].

### 3.1. MyD88-dependent pathway

TLR4 ligands, such as LPS endotoxin and SFA, with the help of CD14 and MD2, promote CD14-TLR4-MD2 activation and induce TLR4 dimerization, which in turn recruit TIRAP-MyD88 adaptors to TIR domains [1,6]. The TIRAP-MyD88 signaling pathway is induced from the plasma membrane [3], initiating the MyD88-dependent downstream signaling. MyD88 recruits IL-1R-associated kinase-4 (IRAK4) that, in turn, recruits, activates and degrades IRAK1. The IRAK1 then associates with TNF-receptor associated factor-6 (TRAF6), thereby activating TAK1 that activates the I $\kappa$ B kinase (IKK) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways [4]. The activation of the IKK complex (IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ , IKK $\gamma$ ) leads to phosphorylation of the N-terminal of I $\kappa$ B proteins and, consequently, activation of NF- $\kappa$ B, thereby stimulating the transcription of COX2, TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , IL6, IL8, IL12, IFN- $\gamma$ , MIP1- $\alpha$ , MIP1- $\beta$ , MIP-2, MCP1, VCAM1, RANTES [1,18,24,25]. Moreover, the MAPK leads to increased transcription factor AP1 which plays a crucial role in the induction of inflammatory-response genes including COX2 [8,26,27].

### 3.2. MyD88-independent pathway

A second set of TIR domain adaptors, TRIF and TRAM, is involved in a MyD88-independent pathway. These adaptors activate the expression of interferon regulating factor 3 (IRF3) by TRAF3 which associates with TBK1 (TRAF family member-associated NF- $\kappa$ B activator (TANK) binding kinase-1) and IKKi (also known as IKKe) mediate the dimerization and translocation of IRF3, and thereby stimulates the production of IFN [4]. The TRAM-TRIF pathway is induced from an intracellular compartment (endosome), a requisite step in TLR4 signaling and production of IFN [3].

Kagan et al. (2008) propose that the CD14-TLR4-MD2 complex is activated in plasma membrane and initiates TLR4 signals through TIRAP-MyD88 and TRAM-TRIF, sequentially. During endocytosis, TIRAP-MyD88 complex is released from the invaginating membrane and allows the TRAM-TRIF adaptors to engage the TIR domain of TLR4 on early endosomes, leading to induction of the IFN expression from endosomal compartment [3].

Also, TRIF-TRAM adaptors participate in a late-phase activation of NF- $\kappa$ B and MAPK signaling. This delayed MyD88-independent activation of NF- $\kappa$ B and MAPK involves the TRIF adaptor that, in turn, recruits TRAF6 and receptor-interacting protein 1 (RIP1), thus facilitating TAK1 activation, and results in a robust NF- $\kappa$ B activation [4,23].

TLR4 agonists can also modulate TLR4 downstream signaling involving PI3K and AKT (also known as protein kinase B (PKB)) which, in turn, can activate NF- $\kappa$ B [8]. The AKT activation mechanism remains controversial, but it seems to be dependent on the

presence of MyD88 and/or TRIF adaptor proteins [28].

### 3.3. CD36

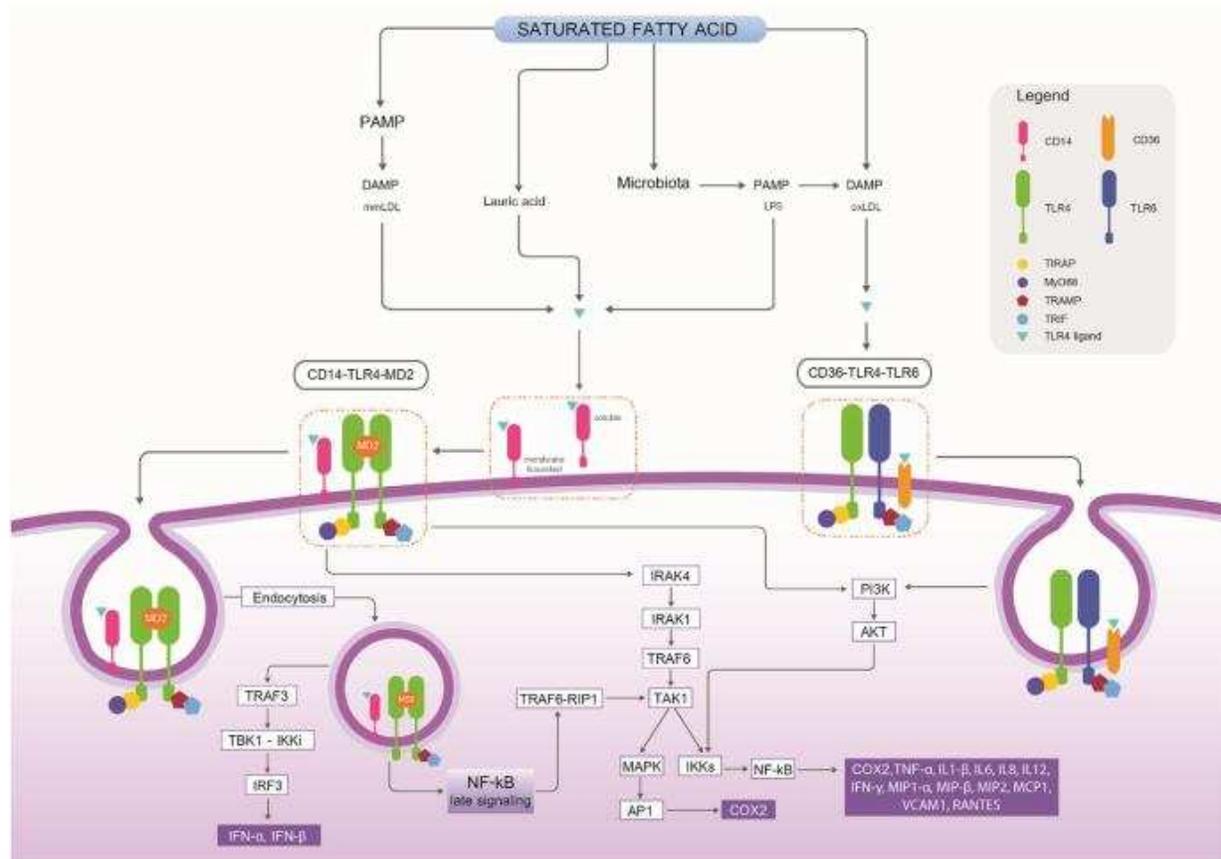
OxLDL recognition by CD36 induces intracellular CD36-TLR4-TLR6 heteromerization, independent of MD2 and CD14 that are well known components of the TLR4 complex [3]. The CD36-TLR4-TLR6 signaling leads to the expression of MyD88-dependent response upregulating the expression of Gro 1, MIP-1 and MIP-2; and also MyD88-independent genes, inducing the RANTES (Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted) transcription in response to oxLDL. Thus, engaging both adaptor pathways [3] which mediate the PI3K/AKT pathway activation, will result in activation of IKK and NF- $\kappa$ B [18].

In addition, the oxLDL uptake by CD36 and its subsequent nucleation into cholesterol crystals inside the cell cause lysosomal destabilization and NLRP3 activation. The NLRP3 assembles with the adaptor protein apopto-sis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC) and caspase-1 into a multiprotein complex – inflammasome – which cleaves the inactive precursors to the active forms of IL1- $\beta$  and IL18 [2,15]. OxLDL also primes the NLRP3 inflammasome through a mechanism that involves the up regulation of NF- $\kappa$ B expression [15].

## 4. Concluding remarks

While the downstream signaling pathways have been well defined, not all ligands of TLR4 are currently known. Thus, we propose a link of SFA to innate inflammatory response through TLR4 (Fig. 1). As we have shown SFA could be recognized by the CD14-TLR4-MD2 complex, and trigger TLR4 inflammatory pathways. In addition, the SFA can lead to a gut microbiota modification and an overexpansion of LPS in the blood stream. This metabolic endotoxemia could activate the TLR4 complex mediated by LBP, CD14 and MD2. Besides, DAMPs – including oxLDL and oxPL – derived from gut microbiota, formed from an overproduction of LPS, and also produced after the consumption of a high-fat meal, can activate the TLR4 inflammatory pathways. OxLDL, recognized by CD36, induces the CD36-TLR4-TLR6 complex that leads to an inflammatory response-independent MD2 and CD14, known components of the TLR4 homodimeric complex. Another atherogenic lipid, such as mmLDL, results of LDL oxidative modifications by ROS produced after a high-fat intake, is also able to induce the CD14-TLR4-MD2 complex. Those microbial – LPS – and non-microbial patterns – mmLDL, oxLDL, oxPL and SFA – that can trigger inflammation and regulate inflammatory pathways through TLR4 activation involving a MyD88-dependent and/or a MyD88-independent response that, in turn, leads to the expression of several inflammatory mediators (cytokines, chemokines or costimulatory molecules), as described.

Overall, the present review indicates a relationship between SFA and TLR4 associated with a subclinical inflammation. Increasing evidence has established a link between chronic inflammation and many chronic diseases and metabolic disorders, including cancer, cardiovascular diseases, metabolic syndrome and obesity-induced insulin resistance [29–32]. Therefore, the present review indicates that a reduction of potential TLR4 ligands may have positive impact on the prevention and treatment of such disorders. In addition, reduction in the SFA intake would be interesting when exploiting the TLR4 as an important control point in the inflammatory response, which may be useful in the future development of new therapeutic approaches to prevent and treat subclinical inflammation. However, more clinical studies are required in order to validate the proposed mechanisms, and a deeper knowledge of lipid metabolism is needed for a better understanding of its



**Fig. 1. Activation of pro-inflammatory mediators by saturated fatty acids through TLR4.** The saturated fatty acids (SFA) act as non-microbial TLR4 agonists or indirectly promote the TLR4 activation, triggering its inflammatory response: 1) Similarly to LPS, the SFA can be recognized by CD14-TLR4-MD2 complex and trigger inflammatory pathways; 2) Also SFA leads to gut microbiota modification with an LPS overproduction after a high-fat intake, enhancing this natural TLR4 ligand; 3) In addition, this metabolic endotoxaemia leads to an oxidative stress thereby producing atherogenic lipids – oxLDL and oxidized phospholipid – which trigger CD36-TLR4-TLR6 inflammatory response; 4) And the high-SFA consumption increases the lipemia and the mLDL and oxLDL formation through oxidative modifications of LDL. The mLDL, unlike oxLDL, is involved in activation of the CD14-TLR4-MD2 inflammatory pathway. All these molecules can induce TLR4 inflammatory pathways by MyD88-dependent and/or MyD88-independent mechanisms that in turn promotes the expression of pro-inflammatory transcription factors such as NF-κB (factor nuclear kappa B), which plays a crucial role in the induction of inflammatory mediators (cytokines, chemokines or co-stimulatory molecules) implicated in the development and progression of many chronic diseases.

relationship with inflammation and the development and progression of chronic diseases.

## References

- [1] M. Di Gioia, I. Zanoni, Toll-like receptor co-receptors as master regulators of the immune response, *Mol. Immunol.* 63 (2) (2014) 143–152 [Internet]. Elsevier Ltd. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2014.05.008>.
- [2] C. Jin, R.A. Flavell, Innate sensors of pathogen and stress: linking inflammation to obesity, *J. Allergy Clin. Immunol.* 132 (2) (2013) 287–294 [Internet]. Elsevier Ltd. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2013.06.022>.
- [3] J.C. Kagan, T. Su, T. Horng, A. Chow, S. Akira, R. Medzhitov, TRAM couples endocytosis of toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta, *Nat. Immunol.* 9 (4) (2008) 361–368.
- [4] Y.-C. Lu, W.-C. Yeh, P.S. Ohashi, LPS/TLR4 signal transduction pathway, *Cytokine* 42 (2) (2008) 145–151.
- [5] V. Calabrese, R. Cighetti, F. Peri, Molecular simplification of lipid A structure: TLR4-modulating cationic and anionic amphiphiles, *Mol. Immunol.* 63 (2) (2014) 153–161 [Internet]. Elsevier Ltd. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2014.05.011>.
- [6] K. Lucas, M. Maes, Role of the toll like receptor (TLR) radical cycle in chronic inflammation: possible treatments targeting the TLR4 pathway, *Mol. Neurobiol.* 48 (1) (2013) 190–204.
- [7] G.Y. Chen, G. Nuñez, Sterile inflammation: sensing and reacting to damage, *Nat. Rev. Immunol.* 10 (12) (2010) 826–837 [Internet]. Nature Publishing Group. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri2873>.
- [8] J.Y. Lee, J. Ye, Z. Gao, H.S. Youn, W.H. Lee, L. Zhao, et al., Reciprocal modulation of toll-like receptor-4 signaling pathways involving MyD88 and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT by saturated and polyunsaturated fatty acids, *J. Biol. Chem.* 278 (39) (2003) 37041–37051.
- [9] S.W. Wong, M.J. Kwon, A.M.K. Choi, H.P. Kim, K. Nakahira, D.H. Hwang, Fatty acids modulate toll-like receptor 4 activation through regulation of receptor dimerization and recruitment into lipid rafts in a reactive oxygen species-dependent manner, *J. Biol. Chem.* 284 (40) (2009) 27384–27392.
- [10] J.Y. Lee, A. Plakidas, W.H. Lee, A. Heikkinen, P. Chanmugam, G. Bray, et al., Differential modulation of toll-like receptors by fatty acids: preferential inhibition by n-3 polyunsaturated fatty acids, *J. Lipid Res.* 44 (3) (2003) 479–486.
- [11] Y.I. Miller, S. Viriyakosol, C.J. Binder, J.R. Feramisco, T.N. Kirkland, J.L. Witztum, Minimally modified LDL binds to CD14, induces macrophage spreading via TLR4/MD-2, and inhibits phagocytosis of apoptotic cells, *J. Biol. Chem.* 278 (3) (2003) 1561–1568.
- [12] A.P.B. Moreira, T.F.S. Teixeira, A.B. Ferreira, M. do Carmo Gouveia Peluzio, R. de Cássia Gonçalves Afenias, Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia, *Br. J. Nutr.* 108 (05) (2012 Sep) 801–809.
- [13] L.S. Gutierrez, Z. Lopez-Dee, K. Pidcock, Thrombospondin-1: multiple paths to inflammation, *Mediat. Inflamm.* 2011 (2011).
- [14] C.R. Stewart, L.M. Stuart, K. Wilkinson, J.M. van Gils, J. Deng, A. Halle, et al., CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a toll-like receptor 4 and 6 heterodimer, *Nat. Immunol.* 11 (2) (2010) 155–161 [Internet]. Nature Publishing Group. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri2873>.

- 1038/ni.1836.
- [15] C. Oury, CD36: linking lipids to the NLRP3 inflammasome, atherogenesis and atherothrombosis, *Cell Mol. Immunol.* 11 (1) (2014) 8–10 [Internet]. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4002147&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [16] Y. Imai, K. Kuba, G.G. Neely, R. Yaghubian-Malhami, T. Perkmann, G. van Loo, et al., Identification of oxidative stress and toll-like receptor 4 signaling as a key pathway of acute lung injury, *Cell* 133 (2) (2008) 235–249.
- [17] K.M. Botham, C.P.D. Wheeler-Jones, Postprandial lipoproteins and the molecular regulation of vascular homeostasis, *Prog. Lipid Res.* 52 (4) (2013) 446–464. Elsevier Ltd.
- [18] M.A. De Vries, B. Klop, S.A. Eskes, T.L.J.M. van der Loos, F.J.M. Klessens-Godfroy, J. Wiebolt, et al., The postprandial situation as a pro-inflammatory condition, *Clin Investig Arterioscler.* 26 (4) (2014) 184–192.
- [19] A. Boullier, Y. Li, O. Quehenberger, W. Palinski, I. Tabas, J.L. Witztum, et al., Minimally oxidized LDL offsets the apoptotic effects of extensively oxidized LDL and free cholesterol in macrophages, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26 (5) (2006) 1169–1176.
- [20] H.H.M. Hermsdorff, B. Puchau, A.C.P. Volp, K.B. Barbosa, J. Bressan, M.A. Zulet, et al., Dietary total antioxidant capacity is inversely related to central adiposity as well as to metabolic and oxidative stress markers in healthy young adults, *Nutr. Metab. (Lond)* 8 (1) (2011) 59. BioMed Central Ltd.
- [21] B.B. Albert, D. Cameron-Smith, P.L. Hofman, W.S. Cutfield, Oxidation of marine omega-3 supplements and human health, *Biomed. Res. Int.* 2013 (2013).
- [22] D.Y. Oh, S. Talukdar, E.J. Bae, T. Imamura, H. Morinaga, W. Fan, et al., GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects, *Cell* 142 (5) (2010) 687–698 [Internet]. Elsevier Ltd. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.07.041>.
- [23] T. Kawai, S. Akira, Signaling to NF- $\kappa$ B by toll-like receptors, *Trends Mol. Med.* 13 (11) (2007) 460–469.
- [24] M. Kanehisa, S. Goto, Kyoto encyclopedia of genes and genomes, *Nucleic Acids Res.* 28 (1) (2000) 27–30 [Internet]. Available from: <http://www.genome.jp/kegg/>.
- [25] M. Kanehisa, S. Goto, Y. Sato, M. Kawashima, M. Furumichi, M. Tanabe, Data information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG, *Nucleic Acids Res.* 42 (D1) (2014) 199–205.
- [26] S.K. Manna, B.B. Aggarwal, Wortmannin inhibits activation of nuclear transcription factors NF- $\kappa$ B and activated protein-1 induced by lipopolysaccharide and phorbol ester, *FEBS Lett.* 473 (1) (2000) 113–118.
- [27] D. Hwang, Modulation of the expression of cyclooxygenase-2 by fatty acids mediated through toll-like receptor 4-derived signaling pathways, *FASEB J.* 15 (14) (2001) 2556–2564.
- [28] C.P. Bauerfeld, R. Rastogi, G. Pirokkaite, I. Lee, M. Hüttemann, *NIH Public Access* 188 (6) (2013) 2847–2857.
- [29] M. Murakami, T. Hirano, The molecular mechanisms of chronic inflammation development, *Front. Immunol.* 3 (NOV) (2012) 1–2.
- [30] H.H.M. Hermsdorff, B. Puchau, M.A. Zulet, J.A. Martínez, Association of body fat distribution with proinflammatory gene expression in peripheral blood mononuclear cells from young adult subjects, *OMICS* 14 (3) (2010) 297–307.
- [31] Y.V. Bobryshev, E.R. Andreeva, I.A. Mikhailova, I.V. Andrianova, M.M. Moisenovich, S. Khapchaev, et al., Correlation between lipid deposition immune-inflammatory cell content and MHC class II expression in diffuse intimal thickening of the human aorta, *Atherosclerosis* 219 (1) (2011) 171–183. Elsevier Ireland Ltd.
- [32] W.K. Den Dekker, C. Cheng, G. Pasterkamp, H.J. Duckers, Toll like receptor 4 in atherosclerosis and plaque destabilization, *Atherosclerosis* 209 (2) (2010) 314–320. Elsevier Ireland Ltd.

**10.2 Apêndice B: Artigo de Revisão (aceito para publicação na revista São Paulo Medical Journal em 07 de Julho de 2016)**

**SPMJ-2016-0086**

DOI: 10.1590/1516-3180.2016.0091310516

**NARRATIVE REVIEW**

**The role of dietary fatty acid intake in inflammatory gene expression: a critical review**

O papel da ingestão dos ácidos graxos da dieta na expressão de genes inflamatórios: uma revisão crítica

Daniela Mayumi Usuda Prado Rocha<sup>I</sup>, Josefina Bressan<sup>II</sup>, Helen Hermana Miranda Hermsdorff<sup>III</sup>

Department of Nutrition and Health, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG, Brazil

<sup>I</sup>R.D, MSc. Department of Nutrition and Health, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG, Brazil.

<sup>II</sup>R.D., MSc, PhD. Titular Professor, Department of Nutrition and Health, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG, Brazil.

<sup>III</sup>R.D., MSc, PhD. Assistant Professor, Department of Nutrition and Health, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG, Brazil.

**KEY WORDS:**

Dietary fats.

Fatty acids.

Gene expression.

Inflammation.

Dietary fats, unsaturated.

**ABSTRACT**

**CONTEXT AND OBJECTIVE:** Diet is an important modifiable factor involved in obesity-induced inflammation. We reviewed clinical trials that assessed the effect of consumption of different fatty acids on the expression of inflammation-related genes, such as cytokines, adipokines, chemokines and transcription factors.

**DESIGN AND SETTING:** Narrative review study conducted at a research center.

**METHODS:** This was a review on the effect of fat intake on inflammatory gene expression in humans.

**RESULTS:** Consumption of saturated fatty acids (SFAs) was related to upregulation of postprandial genes associated with pro-inflammatory pathways in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), in comparison with monounsaturated fatty acid (MUFA) or polyunsaturated fatty acid (PUFA) intake. In addition, acute intake of a high-SFA meal also induced a postprandial pro-inflammatory response for several inflammatory genes in subcutaneous adipose tissue. Both high-MUFA and high-PUFA diet showed anti-inflammatory profiles, or at least a less pronounced pro-inflammatory response than did SFA consumption. However, the results concerning the best substitute for SFAs were divergent because of the large variability in doses of MUFA (20% to 72% of energy intake) and n3 PUFA (0.4 g to 23.7% of energy intake) used in interventions.

**CONCLUSIONS:** The lipid profile of the diet can modulate the genes relating to postprandial and long-term inflammation in PBMCs and adipose tissue. Identifying the optimal fat profile for inflammatory control may be a promising approach for treating chronic diseases such as obesity.

## **PALAVRAS-CHAVE:**

Gorduras na dieta.

Ácidos graxos.

Expressão gênica.

Inflamação.

Gorduras insaturadas na dieta.

## **RESUMO**

**CONTEXTO E OBJETIVO:** A dieta é um importante fator modificável envolvido na inflamação induzida pela obesidade. Nós revisamos ensaios clínicos que avaliaram o efeito do consumo de diferentes ácidos graxos sobre a expressão de genes relacionados com a inflamação, tais como citocinas, adipocitocinas, quimiocinas e fatores de transcrição.

**TIPO DE ESTUDO E LOCAL:** Estudo de revisão narrativa realizado em centro de pesquisa.

**MÉTODOS:** Revisão do efeito da ingestão de gordura sobre a expressão de genes envolvidos com inflamação em seres humanos.

**RESULTADOS:** O consumo do ácido graxo saturado (AGS) foi relacionado com a regulação favorável de genes pós-prandiais associados com vias pró-inflamatórias nas células mononucleares de sangue periférico (CMSP), comparado com a ingestão do ácido graxo monoinsaturado (AGMI) ou do ácido graxo poli-insaturado (AGPI). Além disso, o consumo agudo de uma dieta com alto conteúdo de AGS também induziu uma resposta pró-inflamatória pós-prandial para vários genes da inflamação no tecido adiposo subcutâneo. Ambas dietas com alto conteúdo de AGMI e AGPI apresentaram perfil anti-inflamatório ou, pelo menos, menor resposta pró-inflamatória em relação ao consumo de AGS. Contudo, os resultados são controversos acerca do melhor substituto para o AGS, devido à grande variabilidade na dose de AGMI (20% a 72% da ingestão energética) e AGPI n3 (0,4 g para 23,7% da ingestão energética) utilizados nos estudos de intervenção.

**CONCLUSÕES:** O perfil lipídico da dieta pode modular os genes relacionados com inflamação pós-prandial e a longo prazo em CMSP e no tecido adiposo. Identificar o perfil lipídico ideal no controle inflamatório pode ser uma abordagem promissora para o tratamento de doenças crônicas como a obesidade.

## INTRODUCTION

Inflammation is a physiological response triggered by infection and injury that has the purposes of eliminating irritating agent and accelerating tissue regeneration.<sup>1,2</sup> In this process, several inflammatory mediators are released, including cell adhesion molecules, cytokines, chemokines and other inflammatory agents (e.g. nitrogen and reactive oxygen species).<sup>3</sup> In order to maintain the homeostatic balance, a controlled inflammatory response is required. On the other hand, excessive or inappropriate inflammation leads to a pathological inflammatory status.<sup>1</sup> Increasing evidence has suggested that a deregulated inflammatory response plays a pivotal role in the onset and progression of atherosclerosis.<sup>4</sup>

Moreover, excessive adiposity and adiposity-related metabolic diseases (metabolic syndrome, diabetes and atherosclerosis) are attributed to a chronic state of low-grade inflammation. Therefore, diet-induced weight loss is an important factor for reducing pro-inflammatory markers.<sup>5-7</sup> In fact, besides lipid storage, fat cells are capable of producing and secreting chemoattractants such as monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and pro-inflammatory mediators such as interleukins (IL), for instance IL-1 $\beta$ , IL-6 and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , during adipose tissue expansion, thereby resulting in inflammatory and metabolic deregulation.<sup>8</sup>

Many environmental factors can contribute towards obesity and thus interfere with inflammatory expression, including diet.<sup>9</sup> Nutritional interventions can modulate inflammation, as demonstrated in studies based on a hypocaloric diet or on high consumption of fruits and vegetables. Both interventions have been shown to reduce the expression and synthesis of pro-inflammatory cytokines (IL-6 and TNF- $\alpha$ ) and decrease other inflammatory markers such as C-reactive protein (CRP).<sup>10-12</sup> In addition, previous studies have confirmed that high-fat meals reduce leptin concentrations and increase the activation of inflammatory markers such as IL-6 during the postprandial phase.<sup>13,14</sup>

In fact, fatty acids can directly or indirectly modify immune and inflammatory responses. Current evidence suggests that a family of receptors involved in innate immunity, known as Toll-like receptors (TLRs), is connected with the inflammatory response relating to saturated fatty acid (SFA) intake. In this regard, it has been proposed that SFAs are nonmicrobial TLR agonists that promote inflammatory activation.<sup>15</sup> Studies have shown that the SFA lauric acid stimulates pro-

inflammatory expression by TLR2 and TLR4, thereby mediating nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) and cyclooxygenase-2 activation and expression. In contrast, consumption of fish oil rich in n3 polyunsaturated fatty acid (PUFA) inhibits the TLR4-induced signaling pathways and target gene expression.<sup>16,17</sup> Moreover, SFA intake is known to cause lipemia that is more pronounced than the lipemia due to monounsaturated fatty acids (MUFA) and PUFA, which can lead to a higher pro-inflammatory state associated with SFA consumption.<sup>18</sup> Additionally, SFA palmitate and stearate acids can trigger IL-1 $\beta$  secretion through mechanisms involving NLRP3 (NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3) inflammasome activation.<sup>19</sup>

Recently, it was proposed that GPR120 (G protein-coupled receptor 120) mediates the anti-inflammatory effects of n3 PUFA.<sup>20,21</sup> Dietary n3 PUFA has been correlated with inhibition of TLR-induced signaling pathways and target gene expression, probably through disruption of translocation of TLR4 into a lipid raft.<sup>16,17</sup> In combination, these mechanisms can potentially inhibit the signaling pathways that lead to NF- $\kappa$ B activation, thus resulting in downregulation of pro-inflammatory responses through n3 PUFA intake.

## **OBJECTIVE**

Given the above, we aimed to summarize and discuss recent evidence about the effect of consumption of different fatty acids in humans, on inflammation-related gene expression, as evaluated through clinical studies.

## **METHODS**

This was a narrative review of the English-language literature on the effects of fat intake on inflammatory gene expression in humans. It evaluated studies indexed in the Cochrane Library, LILACS and PubMed databases between the time of database inception and March 2016 (**Table 1**). We included original studies that reported on clinical trials on men or women (not pregnant, not in lactation and not in the postmenopausal period) who were not athletes, not undergoing hormonal treatment, not dependent on alcohol or drugs and not suffering from chronic illnesses (such as hepatic, renal, thyroid or cardiac dysfunction) or acute inflammatory processes. Since the objective

was to evaluate the effect of fatty acid consumption among humans, only clinical trials were included, given that these are considered to be the mainstay design for causal inferences.

All the papers were checked according to their titles and abstracts (screening). Full papers were obtained from journals available on the CAPES Foundation (Ministry of Education, Brazil) website. Unavailable articles were requested from their authors. Articles presenting potentially relevant studies were read and analyzed to assess the inclusion criteria.

We excluded articles that consisted of *in vitro* or animal studies, articles in which the participants' characteristics did not match those mentioned above, poster session abstracts, review articles and other reasons (non-standard dietary interventions; studies on drug therapy; studies without any analysis on inflammation; dietary trial interventions on fatty acid intake along with vitamin or mineral supplementation; studies on heated oils; or studies without any clear differentiation between the total polyunsaturated, monounsaturated and saturated fatty acid content used to compare the interventions). The flowchart for the study selection process is described in **Figure 1**. Other papers were used for contextualization and discussion.

## RESULTS

We identified 14 studies that investigated the effect of fatty acid intake on inflammatory gene expression (**Table 2**). Six of these studies had a postprandial design in which an acute inflammatory response to a high-fat meal consumed on a single day was evaluated<sup>22,23</sup> or consisted of a postprandial fat challenge, reflecting fat composition similar to that of a dietary intervention conducted for at least four weeks afterwards.<sup>24-27</sup> Postprandial is a term that was introduced in 1997 and refers to “the time frame after a meal or food intake”.<sup>28</sup> Seven studies assessed the inflammatory response after long-term consumption (minimum of 8 weeks).<sup>29-35</sup> Lastly, one study determined both the postprandial and the long-term response to the same dietary intervention.<sup>36</sup> In order to assist comparisons between the studies, dietary interventions were compared according to fat content source (SFA, MUFA or PUFA) and its respective proportion of total energy intake (E%).

Inflammatory genes were analyzed in duodenal tissue, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), subcutaneous or visceral adipose tissue, skeletal muscle and whole blood, mostly using

the polymerase chain reaction (PCR), or using a microarray analysis methodology. The main inflammatory genes screened were those that promote expression of adipokines, chemokines, cytokines and transcription factors. Hence, before discussing the role of fatty acid intake in inflammatory gene expression, we firstly contextualize the main markers that have been found in various studies.

### **Adipokines**

Adipose tissue is an active organ involved not only in energy storage control, but also in regulation of complex metabolic and endocrine functions. In this context, adipose tissue releases cytokines and other bioactive mediators. Adiponectin and leptin are known as true adipokines, and are the major adipocyte proteins produced mainly by adipose tissue.<sup>37,38</sup> In particular, adiponectin is an anti-inflammatory cytokine that might be able to induce production of other anti-inflammatory cytokines such as IL-10 and IL-1 receptor antagonist (IL-1RA). At the same time, it may suppress pro-inflammatory cytokine production of interferon (IFN)- $\gamma$ <sup>37</sup> and may also have a negative correlation with CRP, the systemic inflammatory marker.<sup>39</sup> Moreover, adiponectin can exhibit atheroprotective effects, through attenuating chronic inflammation in vascular walls.<sup>40</sup> On the other hand, leptin correlates directly with body fat mass and adipocyte size, and has a role as a pro-inflammatory cytokine. Leptin stimulates production of several inflammatory mediators such as IL-1, IL-6, IL-12 and TNF.<sup>37</sup> In addition, leptin has been correlated with several obesity-associated diseases such as cardiovascular diseases and diabetes.<sup>41</sup>

### **Chemokines**

Chemokines form a family of small proteins that are secreted in response to signals such as pro-inflammatory cytokines. They play an important role in selectively inducing chemotaxis and chemokinesis of leukocytes.<sup>42</sup> MCP-1, also referred to as chemokine ligand 2 (CCL2), is a potent chemoattractant of monocytes and macrophages to inflammation areas, expressed mainly by inflammatory cells and endothelial cells.<sup>43,44</sup> Macrophage inflammatory protein 1 (MIP-1), or

chemokine ligand 3 (CCL3), is another potent chemoattractant of immune cells, particularly macrophages, to inflammatory sites.<sup>43</sup>

Leukocyte extravasation into tissues requires not only chemokines but also matrix-degrading enzymes, in particular matrix metalloproteinases (MMPs). MMP-9, for instance, performs an important role in immune cell functioning and in pathophysiological conditions that involve inflammatory processes. In addition, MMP-9 levels increase in cases of cardiovascular diseases, including hypertension, atherosclerosis and myocardial infarction.<sup>45,46</sup>

## **Cytokines**

Cytokines are proteins that act as intracellular mediators. They play an important role in cell communication and regulation of the immune system. Unlike classical hormones, they are produced by different tissues and cell types rather than by specialized glands. They bind to their cognate receptors on target cells and activate or inhibit cellular functions in a paracrine or autocrine manner.<sup>47,48</sup>

IL-1 was the first interleukin to be identified. It is produced by numerous innate immune cells including monocytes, macrophages and dendritic cells.<sup>49</sup> IL-1 is a key pro-inflammatory mediator involved in hosting responses to pathogens and inflammation. Its synthesis is induced by other inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-2.<sup>50</sup> IL-1 also induces production of pro-inflammatory cytokines, including IL-6.<sup>51</sup> Growing evidence links this cytokine to chronic diseases such as type 2 diabetes and obesity. Furthermore, IL-1 is also related to atherosclerosis development.<sup>52</sup>

IL-6 is known as an inflammatory cytokine secreted mainly (10-35%) by adipose tissue, and also by skeletal muscle and liver.<sup>53</sup> It is an acute-response mediator and consequently increases the plasma concentrations of acute-phase proteins, such as CRP and serum amyloid A.<sup>54</sup> Greater IL-6 concentration is correlated with elevated cardiovascular risk. This can be explained by its correlations with increased adiposity, expressed in terms of body mass index, waist circumference, visceral fat, total body fat and increased risk of insulin resistance.<sup>2,6,55</sup> Furthermore, high consumption of fruit and vegetables followed by good adherence to a calorie-restricted diet based

on a Mediterranean dietary pattern can reduce expression and synthesis of this inflammatory marker, as described previously.<sup>10,12</sup>

IL-8 is a pro-inflammatory cytokine produced mainly by monocytes and macrophages. It is responsible for bringing immune cells to sites of inflammation and retaining them there. In addition, IL-8 promotes activation of monocytes and neutrophils. It has been shown to have a potential role in cardiovascular diseases, in particular atherosclerosis.<sup>56</sup>

TNF- $\alpha$ , also known as cachectin, is a strong pro-inflammatory cytokine produced mainly by monocytes and macrophages, via activation of MAPK (mitogen-activated protein kinase) and NF- $\kappa$ B signaling pathways. This process results in release of inflammatory genes and other inflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$  and IL-6.<sup>57,58</sup> TNF- $\alpha$  has also been implicated in increased cardiovascular risk, and it is central to the pathophysiology of cancer and chronic inflammatory conditions, including inflammatory bowel diseases, rheumatoid arthritis and psoriasis.<sup>57,59,60</sup> Similarly to IL-6, a reduced-calorie diet and consumption of fruits and vegetables can reduce synthesis and expression of TNF- $\alpha$ .<sup>10,12</sup>

### **Transcription factors**

Nuclear p65 protein is a subunit of NF- $\kappa$ B transcription complex, which plays a crucial role in inflammatory and immune responses. NF- $\kappa$ B is a homo or heterodimer composed of Rel proteins: p65 (RelA), p50 (NFKB1), p52 (NFKB2), c-Rel and RelB.<sup>61</sup> NF- $\kappa$ B is classically activated by pro-inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$  and alternatively by cytokines such as lymphotoxin  $\beta$ . An atypical pathway triggered by DNA damage<sup>62</sup> may also do the activation. Altered NF- $\kappa$ B activation has been demonstrated in tumor development and chronic inflammatory diseases.<sup>62</sup> Interestingly, high intake of fruits and vegetables is inversely associated with mRNA p65 expression in PBMCs of healthy adults.<sup>10</sup>

NF- $\kappa$ B signaling is controlled through NF- $\kappa$ B inhibitors (I $\kappa$ B). This is a family of proteins that can bind NF- $\kappa$ B dimers in the cytoplasm and nucleus, thereby inhibiting the NF- $\kappa$ B transcriptional response.<sup>63</sup> Certain stimuli result in phosphorylation, and subsequent proteasome-mediated degradation of I $\kappa$ B proteins allows the unbound NF- $\kappa$ B dimers to translocate to the nucleus, thereby regulating the expression of target genes.<sup>62</sup>

## **Fatty acid intake in inflammatory gene expression**

According to the studies reviewed here, postprandial period resulted in a pro-inflammatory response regarding PBMC gene expression, linked to SFA consumption. In healthy subjects, SFA intake (35 E%) from animal sources resulted in an increased postprandial pro-inflammatory response in PBMCs for TNF- $\alpha$  expression, in comparison with MUFA (36 E%) and n3 PUFA (4 E%) breakfasts consisting mainly of extra-virgin olive oil and fats of vegetable origin (walnuts), respectively. In addition, mRNA IL-6 postprandial expression was higher after the high-SFA meal than after the n3 PUFA meal. However, the increased gene expression did not change the concentration of the inflammatory cytokines.<sup>24</sup> Thus, the length of postprandial assessment time may have been sufficient to detect differences in expression but not in translation of cytokines in PBMCs. These differences between inflammatory gene response and synthesis/secretion of inflammatory markers may have been due to transcriptional and translational process that do not occur simultaneously.<sup>64</sup> Moreover, several translational and post-translational regulatory mechanisms, including miRNA, may be involved and thus may affect the production and release of cytokines,<sup>65</sup> which may also not occur concurrently in the cell and extracellular tissues. In addition, discrepancies can be found between cytokine concentrations and their mRNA expression, probably due to potential confounding factors such as gender, physical activity, smoking and body mass index.<sup>5</sup> However, PBMCs are widely used for determining inflammatory gene expression, given the fact that they are accessible cells. Furthermore, their use is cost-effective and they provide a less invasive alternative to biopsy measurements.<sup>66</sup>

Elderly subjects exhibited a pro-inflammatory response in PBMCs relating to high SFA consumption (35 E%), with higher postprandial inflammatory expression of p65 and MCP-1 genes, compared with MUFA (36 E%) mainly from virgin olive oil. They also presented higher mRNA p65, in comparison with an intervention comprising PUFA (4 E%) from plant origin (walnuts). Additionally, SFA showed downregulated expression of anti-inflammatory genes (IkB $\alpha$ ), compared with MUFA, and increased plasma concentration of MCP-1 pro-inflammatory cytokines.<sup>26</sup>

In metabolic syndrome patients, SFA consumption (38 E%) was associated with upregulation of pro-inflammatory genes (MMP-9 and TNF- $\alpha$ ) and downregulation of anti-

inflammatory genes (I $\kappa$ B $\alpha$ ) in a postprandial state, compared with MUFA (43 E%), in PBMCs. Moreover, higher MCP-1 plasma concentration was observed in SFA consumption, compared with MUFA and n3 PUFA (1.24 g). Regardless of the type of ingested fat (SFA, MUFA or n3 PUFA), the postprandial state was associated with increased expression of IL-6, MMP-9 and TNF- $\alpha$  pro-inflammatory genes, as well as higher IL-6 plasma concentrations,<sup>27</sup> thus suggesting that a greater inflammatory response would be expected in these subjects. In fact, non-dietary factors, such as obesity and type 2 diabetes, can increase the extent of fatty acid postprandial inflammatory response.<sup>67</sup> However, the source of fats was not mentioned in the study and it is known that dietary fat sources differ in more aspects than only their fatty acid profiles.

In this regard, olive oil is well known for its potential health-promoting properties, which are due to the presence of high levels of MUFA and other valuable minor components such as phenolics, phytosterols, tocopherols, carotenoids, chlorophyll and squalene.<sup>68</sup> These natural compounds with antioxidant and other potentially important types of bioactivity have a beneficial impact on inflammatory markers.<sup>67</sup> Thus, they represent an important confounding factor in assessing the effect of dietary fat intake on the inflammatory response.

Controversially, high-SFA acute intake (46.5 E%) mainly from plant origin (palm oil) was associated with reduced postprandial inflammatory response regarding PBMC gene expression (MCP-1 and IL-8), compared with MUFA (72 E%) from high-oleic acid sunflower oil and n3 PUFA (23.7 E%) from fish oil interventions.<sup>22</sup> Palm oil use is subject to debate with regard to potential unhealthy effects, because of its high palmitic acid content. An increased inflammatory response (IL-6) relating to a palmitic oil-enriched diet in mice and a similar effect from palmitic acid *in vitro* was shown in one study. However, apart from SFAs, which are mostly from palmitic acid, this plant oil contains oleic and linoleic acids, which are MUFA and PUFA, respectively.<sup>69</sup> Unlike in other studies, a much higher amount of MUFA was used, in comparison with the SFA intervention. In addition, n3 PUFA intake was greater than in other studies.

However, in a long-term dietary trial on the inflammatory response in PBMCs, gene expression remained unchanged after eight weeks of intervention with SFAs (19 E%), among abdominally obese patients.<sup>30</sup> This result may be related to the lower amount of fat provided, in comparison with other interventions. Moreover, presence of the obese phenotype was correlated with a previous abnormal inflammatory profile.<sup>30</sup>

On the other hand, in subcutaneous adipose tissue among abdominally overweight subjects, investigation of a long-term SFA diet (19 E%) regarding the inflammatory response showed that upregulation of genes mainly relating to immune and inflammatory pathways occurred. At the same time, downregulation of anti-inflammatory genes and reduction of plasma adiponectin concentration were also observed.<sup>33</sup> Among healthy subjects, an acute dietary intervention that was high in medium-chain SFAs (79 E%), i.e. rich in coconut oil, induced a postprandial pro-inflammatory response relating to several inflammatory genes in subcutaneous adipose tissue (CD16a, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-6R and TNF- $\alpha$ ) and muscle tissue (MCP-1, IL-6R, CD16a, LEP, TLR4 and TNF- $\alpha$ ). Additionally, plasma IL-6 concentration increased in response to medium-chain SFA consumption.<sup>23</sup> In this regard, SFA appears to be able to modulate gene expression in important sources of inflammatory markers, such as PBMCs and adipose tissue.

Regarding the effect of MUFA consumption on inflammatory gene expression in subcutaneous adipose tissue, acute MUFA intake (72 E%) containing macadamia nut oil induced a postprandial anti-inflammatory response (ADIPOQ) in healthy subjects. However, it also increased the pro-inflammatory gene expression (TNFRSF1A), but in a less pronounced manner than did SFA (79 E%) derived from coconut oil intake.<sup>23</sup> Moreover, a long-term MUFA (20 E%) dietary intervention, mainly in the form of refined olive oil, among abdominally obese subjects for eight weeks, also resulted in downregulation or unchanged expression of pro-inflammatory genes in subcutaneous adipose tissue, compared with a SFA diet (19%).<sup>33</sup> These results indicate that MUFA can also exert a pro-inflammatory response, but only weakly, compared with SFA consumption. In fact, unlike SFAs, unsaturated fatty acids such as oleate acid were unable to activate the NLRP3 inflammasome and thereby stimulate IL-1 $\beta$  production.<sup>19</sup> However, other mechanisms may be involved in the inflammatory response mediated by MUFA intake, which can elicit a pro or anti-inflammatory response.

Among subjects at higher risk of type 2 diabetes, an acute postprandial intervention of MUFA breakfast (72 E%) containing macadamia nut oil showed that several inflammatory genes were upregulated in subcutaneous adipose tissue (MCP-1, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-6R, TNF- $\alpha$  and TNFRSF1A). However, healthy subjects showed upregulation of proinflammatory genes (TNFRSF1A) but also of anti-inflammatory ones such as ADIPOQ.<sup>23</sup> Metabolic syndrome patients also showed an increased postprandial response of inflammatory genes (p65, MCP-1, IL-6 and IL-

1 $\beta$ ) and anti-inflammatory genes (I $\kappa$ B $\alpha$ ) in subcutaneous adipose tissue, regardless of the quality of dietary fat (SFA from animal fat, 38 E%; MUFA mainly from olive oil, 43 E%; or n3 PUFA, 1.24 g).<sup>25</sup> These results suggest that pro-inflammatory expression of adipose tissue would be expected among obesity-related diseases. This has been correlated with overproduction of pro-inflammatory adipocytokines. As mentioned earlier, obesity and type 2 diabetes can elicit a pronounced postprandial inflammatory response.<sup>67</sup>

Furthermore, the major characteristic of the Mediterranean diet is a high amount of MUFA (around 20 E%), mainly from olive oil intake.<sup>70</sup> The Mediterranean dietary pattern has been correlated with reduced cardiovascular morbidity and mortality.<sup>70,71</sup> This diet has been encouraged because of its relationship with an improved cardiovascular profile, including its favorable effect on blood pressure, insulin sensitivity, lipid profiles, lipoprotein particles, oxidative stress, carotid atherosclerosis and inflammation.<sup>11,72</sup> In a study investigating the effect of consumption of a diet rich in extra-virgin olive oil (MUFA; 21 E%) containing additional Mediterranean components (i.e. fatty fish, unrefined grain products, nuts, legumes and red wine), no effect was found on PBMC inflammatory genes. The same result was obtained from a MUFA intervention (20 E%) consisting of refined olive oil added to a Western-type diet. The Mediterranean diet reduced the plasma concentrations of pro-inflammatory proteins (IL-1 $\beta$  and MIP-1 $\alpha$ ) after an eight-week intervention, but this change did not significantly differ from interventions consisting of MUFA (20 E%) or SFA (19 E%).<sup>30</sup> Higher fruit and vegetable consumption has been correlated with lower plasma concentration of CRP and downregulation of pro-inflammatory genes (ICAM-1, IL1-R1, IL-6, TNF- $\alpha$  and NF- $\kappa$ B1) in PBMCs.<sup>10</sup>

In addition to high MUFA content, olive oil contains other minor biologically active components (e.g. polyphenols and carotenoids),<sup>68</sup> which have been shown to downregulate human genes (IFN- $\gamma$ , Rho GTPase-activating protein 15 (ARHGAP15) and IL-7R) relating to the inflammatory process.<sup>73</sup> Thus, essential nutrients such as folate, vitamin C and magnesium, and other bioactive compounds (e.g. flavonoids and carotenoids) that can be found in a Mediterranean dietary pattern, along with olive oil, could be responsible for its anti-inflammatory properties, in addition to the MUFA content. Thus, the factors mentioned may not accurately reveal the role of MUFA diets in relation to the inflammatory response.

Polyunsaturated fatty acids (PUFA) such n-3 and n-6 fatty acids are essential nutrients for health. Recent studies have identified potential benefits from n3 PUFA consumption for a wide range of conditions, including enhancement of the lipid profile<sup>74</sup> and reduction of coronary heart disease events<sup>75</sup> and breast cancer risk.<sup>76</sup> Among severely obese patients ( $\geq 40 \text{ kg/m}^2$ ) who were scheduled to undergo elective bariatric surgery, n3 PUFA supplementation (3.36 g/day) over an eight-week period showed downregulation of chemokine promoter genes (MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , HIF1A and CD40) and a tendency towards reducing IL-6 and increasing anti-inflammatory gene expression of adiponectin in subcutaneous tissue, but not in visceral adipose tissue, in comparison with the control group.<sup>31</sup> Additionally, dyslipidemic subjects exhibited higher numbers of downregulated pro-inflammatory genes after long-term supplementation with n3 PUFA (2.7 g/day) consisting of fish oil, over a 12-week period, in contrast with subjects with normal lipid levels. Moreover, n3 PUFA showed immune-modulatory and anti-inflammatory capability, through downregulating several pro-inflammatory genes and giving rise to balanced up and downregulation of anti-inflammatory genes, particularly regarding dyslipidemic subjects.<sup>36</sup> Among elderly individuals, long-term n3 PUFA supplementation via fish oil (26 weeks) showed downregulation of inflammatory pathways in PBMC gene profiles, through 1.8 g/day of EPA/DHA.<sup>29</sup>

Thus, consumption of n3 PUFA seems to improve the inflammatory condition associated with metabolic disorders, in relation to obesity, including insulin resistance and hyperinsulinemia. However, consumption of 1.8 g/day of n3 PUFA via fish oil capsules did not affect inflammatory genes in PBMCs or inflammatory markers (CRP, IL-6 and TNF- $\alpha$ ) in insulin-resistant subjects with a mean body mass index of  $29.9 \text{ kg/m}^2$  (standard error of the mean, SEM,  $0.9 \text{ kg/m}^2$ ), after eight weeks of supplementation.<sup>34</sup> In fact, studies have shown divergences regarding the beneficial effects relating to n3 PUFA consumption among individuals with type 2 diabetes mellitus, probably due to the genetic background associated with ethnicity, considering that Asian individuals appear to benefit from supplementation, unlike those of Western origin.<sup>21,77,78</sup> Furthermore, n3 PUFA intake (3.5 E%) of plant origin (2.1 E%) and marine origin (1.4 E%) over a 14-week period did not affect the adipose tissue inflammation in overweight to moderately obese subjects ( $28\text{-}33 \text{ kg/m}^2$ ).<sup>32</sup> In duodenal tissue, Labonté et al. evaluated the inflammatory response among obese patients with type 2 diabetes following a n3 PUFA intervention (3 g/day) from fish oil for eight weeks. The results failed to demonstrate any significant effect from n3 PUFA supplementation on the gene

expression of pro-inflammatory cytokines in duodenal cells.<sup>35</sup> These authors suggested that the lack of effect was attributable to the low expression of those markers and therefore that they were unlikely to be further modified. However, their study focused on a small number of markers (IL-6, IL-18 and TNF- $\alpha$ ) and did not assess any anti-inflammatory markers.

## **FINAL CONSIDERATIONS**

In summary, the studies reviewed here indicate that MUFA intake and n3 PUFA intake exhibit anti-inflammatory profiles or at least a less pronounced pro-inflammatory response, particularly in comparison with SFA consumption. However, some conflicting results have been described in comparing the inflammatory effects between them. The variability in doses of MUFA (20 E% to 72 E%) and n3 PUFA (0.4 g to 23.7 E%) that were used in interventions may have led to these conflicting results. In addition, the variability in intestinal microbiota among individuals seems to be involved in this postprandial inflammatory response. In this regard, the adaptation of gut microbiota over time may be relevant, especially in comparing acute and long-term effects, but this remains to be determined.

Some other limitations that complicate direct comparisons between the studies deserve further attention. There are differences between the specific populations investigated (i.e. in relation to age, sex, genotype, presence of low-grade inflammation and health status). Methodological factors such as study design, dietary intervention (types of oils, percentage fat and dietary components) and intervention period also differed between the studies reviewed here. Moreover, inflammatory responses were assessed in different tissues (adipose tissue, duodenal tissue, muscle, PBMCs and whole blood), and the inflammatory markers that were screened also differed between the studies. Nevertheless, there is a lack of consensus regarding which biomarker is best for determining inflammation in human nutritional studies.<sup>79</sup> In this regard, a combination of multiple inflammatory markers appears to be more informative,<sup>79</sup> but intervention studies have generally focused on a small number of biomarkers instead of several, such as in analyses using microarray methodology. Little emphasis has been placed on anti-inflammatory markers. Thus, regarding the best choice for SFA replacement, limited evidence can support MUFA or PUFA as

a better substitute. Identifying the optimal fat profile for inflammatory control may be a promising approach for treating chronic diseases.

## **CONCLUSIONS**

The evidence indicates that inflammatory gene expression is regulated by the type of fat consumed. In this regard, saturated fatty acid (SFA) consumption has been correlated with a pro-inflammatory response upregulating several genes relating to inflammatory pathways, such as CD16A, MCP-1, MMP-9, IL-1, IL-6, TNF $\alpha$  and p65, in PBMCs and adipose tissue. On the other hand, monounsaturated fatty acid (MUFA) and polyunsaturated fatty acid (PUFA) consumption exhibit an anti-inflammatory profile and a less pronounced pro-inflammatory response, particularly in comparison with SFAs. Thus, partial replacement of SFA with MUFA or PUFA could be a workable nutritional strategy. However, the evidence for indicating the best unsaturated fatty acid for replacing SFAs remains limited. Identifying the optimal fat profile for inflammatory control may be a promising approach for treating chronic diseases. A larger number of studies is necessary in order to elucidate the beneficial inflammatory modulation induced by consumption of these unsaturated fats.

## **REFERENCES**

1. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008;454(7203):428-35.
2. Carraro JC, Hermsdorff HH, Puchau B, et al. Interleukin-6 is a better metabolic biomarker than interleukin-18 in young healthy adults. *J Physiol Biochem*. 2015;71(3):527-35.
3. Kvietys PR, Granger DN. Role of reactive oxygen and nitrogen species in the vascular responses to inflammation. *Free Radic Biol Med*. 2012;52(3):556-92.
4. Siegel D, Devaraj S, Mitra A, et al. Inflammation, atherosclerosis, and psoriasis. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2013;44(2):194-204.

5. Hermsdorff HH, Puchau B, Zulet MA, Martínez JA. Association of body fat distribution with proinflammatory gene expression in peripheral blood mononuclear cells from young adult subjects. *OMICS*. 2010;14(3):297-307.
6. Hermsdorff HH, Zulet MA, Puchau B, Martínez JA. Central adiposity rather than total adiposity measurements are specifically involved in the inflammatory status from healthy young adults. *Inflammation*. 2011;34(3):161-70.
7. Herieka M, Erridge C. High-fat meal induced postprandial inflammation. *Mol Nutr Food Res*. 2014;58(1):136-46.
8. McArdle MA, Finucane OM, Connaughton RM, McMorrow AM, Roche HM. Mechanisms of obesity-induced inflammation and insulin resistance: insights into the emerging role of nutritional strategies. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013;4:52.
9. Navarro E, Funtikova AN, Fíto M, Schröder H. Can metabolically healthy obesity be explained by diet, genetics, and inflammation? *Mol Nutr Food Res*. 2015;59(1):75-93.
10. Hermsdorff HH, Zulet MA, Puchau B, Martínez JA. Fruit and vegetable consumption and proinflammatory gene expression from peripheral blood mononuclear cells in young adults: a translational study. *Nutr Metab (Lond)*. 2010;7:42.
11. Hermsdorff HH, Zulet MÁ, Abete I, Martínez JA. Discriminated benefits of a Mediterranean dietary pattern within a hypocaloric diet program on plasma RBP4 concentrations and other inflammatory markers in obese subjects. *Endocrine*. 2009;36(3):445-51.
12. Hermsdorff HH, Zulet MÁ, Abete I, Martínez JA. A legume-based hypocaloric diet reduces proinflammatory status and improves metabolic features in overweight/obese subjects. *Eur J Nutr*. 2011;50(1):61-9.

13. Poppitt SD, Keogh GF, Lithander FE, et al. Postprandial response of adiponectin, interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha, and C-reactive protein to a high-fat dietary load. *Nutrition*. 2008;24(4):322-9.
14. Poppitt SD, Leahy FE, Keogh GF, et al. Effect of high-fat meals and fatty acid saturation on postprandial levels of the hormones ghrelin and leptin in healthy men. *Eur J Clin Nutr*. 2006;60(1):77-84.
15. Rocha DM, Caldas AP, Oliveira LL, Bressan J, Hermsdorff HH. Saturated fatty acids trigger TLR4-mediated inflammatory response. *Atherosclerosis*. 2016;244:211-5.
16. Lee JY, Plakidas A, Lee WH, et al. Differential modulation of Toll-like receptors by fatty acids: preferential inhibition by n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Lipid Res*. 2003;44(3):479-86.
17. Wong SW, Kwon MJ, Choi AM, et al. Fatty acids modulate Toll-like receptor 4 activation through regulation of receptor dimerization and recruitment into lipid rafts in a reactive oxygen species-dependent manner. *J Biol Chem*. 2009;284(40):27384-92.
18. Botham KM, Wheeler-Jones CP. Postprandial lipoproteins and the molecular regulation of vascular homeostasis. *Prog Lipid Res*. 2013;52(4):446-64.
19. L'homme L, Esser N, Riva L, et al. Unsaturated fatty acids prevent activation of NLRP3 inflammasome in human monocytes/macrophages. *J Lipid Res*. 2013;54(11):2998-3008.
20. Oh DY, Talukdar S, Bae EJ, et al. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell*. 2010;142(5):687-98.

21. Coelho OG, da Silva BP, Rocha DM, Lopes LL, Alfenas RC. Polyunsaturated fatty acids and type 2 diabetes: impact on the glycemic control mechanism. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2016. [Epub ahead of print].
22. van Dijk SJ, Mensink M, Esser D, et al. Responses to high-fat challenges varying in fat type in subjects with different metabolic risk phenotypes: a randomized trial. *PLoS One*. 2012;7(7):e41388.
23. Pietraszek A, Gregersen S, Hermansen K. Acute effects of dietary fat on inflammatory markers and gene expression in first-degree relatives of type 2 diabetes patients. *Rev Diabet Stud*. 2011;8(4):477-89.
24. Jiménez-Gómez Y, López-Miranda J, Blanco-Colio LM, et al. Olive oil and walnut breakfasts reduce the postprandial inflammatory response in mononuclear cells compared with a butter breakfast in healthy men. *Atherosclerosis*. 2009;204(2):e70-6.
25. Meneses ME, Camargo A, Perez-Martinez P, et al. Postprandial inflammatory response in adipose tissue of patients with metabolic syndrome after the intake of different dietary models. *Mol Nutr Food Res*. 2011;55(12):1759-70.
26. Camargo A, Delgado-Lista J, Garcia-Rios A, et al. Expression of proinflammatory, proatherogenic genes is reduced by the Mediterranean diet in elderly people. *Br J Nutr*. 2012;108(3):500-8.
27. Cruz-Teno C, Pérez-Martínez P, Delgado-Lista J, et al. Dietary fat modifies the postprandial inflammatory state in subjects with metabolic syndrome: the LIPGENE study. *Mol Nutr Food Res*. 2012;56(6):854-65.
28. Medical subject headings (MeSH). Postprandial period. MEDLINE/PubMed. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68019518>. Accessed in 2016 (Sep 6).

29. Bouwens M, van de Rest O, Dellschaft N, et al. Fish-oil supplementation induces antiinflammatory gene expression profiles in human blood mononuclear cells. *Am J Clin Nutr.* 2009;90(2):415-24.
30. van Dijk SJ, Feskens EJ, Bos MB, et al. Consumption of a high monounsaturated fat diet reduces oxidative phosphorylation gene expression in peripheral blood mononuclear cells of abdominally overweight men and women. *J Nutr.* 2012;142(7):1219-25.
31. Itariu BK, Zeyda M, Hochbrugger EE, et al. Long-chain n-3 PUFAs reduce adipose tissue and systemic inflammation in severely obese nondiabetic patients: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr.* 2012;96(5):1137-49.
32. Kratz M, Kuzma JN, Hagman DK, et al. n3 PUFAs do not affect adipose tissue inflammation in overweight to moderately obese men and women. *J Nutr.* 2013;143(8):1340-7.
33. van Dijk SJ, Feskens EJ, Bos MB, et al. A saturated fatty acid-rich diet induces an obesity-linked proinflammatory gene expression profile in adipose tissue of subjects at risk of metabolic syndrome. *Am J Clin Nutr.* 2009;90(6):1656-64.
34. Rudkowska I, Ponton A, Jacques H, et al. Effects of a supplementation of n-3 polyunsaturated fatty acids with or without fish gelatin on gene expression in peripheral blood mononuclear cells in obese, insulin-resistant subjects. *J Nutrigenet Nutrigenomics.* 2011;4(4):192-202.
35. Labonté MÈ, Couture P, Tremblay AJ, et al. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid supplementation and inflammatory gene expression in the duodenum of obese patients with type 2 diabetes. *Nutr J.* 2013;12(1):98.

36. Schmidt S, Stahl F, Mutz KO, et al. Different gene expression profiles in normo- and dyslipidemic men after fish oil supplementation: results from a randomized controlled trial. *Lipids Health Dis.* 2012;11:105.
37. Carbone F, La Rocca C, Matarese G. Immunological functions of leptin and adiponectin. *Biochimie.* 2012;94(10):2082-8.
38. Yadav A, Kataria MA, Saini V, Yadav A. Role of leptin and adiponectin in insulin resistance. *Clin Chim Acta.* 2013;417:80-4.
39. Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, et al. Reciprocal association of C-reactive protein with adiponectin in blood stream and adipose tissue. *Circulation.* 2003;107(5):671-4.
40. Ekmekci H, Ekmekci OB. The role of adiponectin in atherosclerosis and thrombosis. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2006;12(2):163-8.
41. Paz-Filho G, Mastronardi C, Franco CB, et al. Leptina: mecanismos moleculares, efeitos pró-inflamatórios sistêmicos e implicações clínicas [Leptin: molecular mechanisms, systemic pro-inflammatory effects, and clinical implications]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2012;56(9):597-607.
42. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res.* 2009;29(6):313-26.
43. Melgarejo E, Medina MA, Sánchez-Jiménez F, Urdiales JL. Monocyte chemoattractant protein-1: a key mediator in inflammatory processes. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41(5):998-1001.
44. Kolattukudy PE, Niu J. Inflammation, endoplasmic reticulum stress, autophagy, and the monocyte chemoattractant protein-1/CCR2 pathway. *Circ Res.* 2012;110(1):174-89.

45. Robinson SC, Scott KA, Balkwill FR. Chemokine stimulation of monocyte matrix metalloproteinase-9 requires endogenous TNF-alpha. *Eur J Immunol*. 2002;32(2):404-12.
46. Yabluchanskiy A, Ma Y, Iyer RP, Hall ME, Lindsey ML. Matrix metalloproteinase-9: Many shades of function in cardiovascular disease. *Physiology (Bethesda)*. 2013;28(6):391-403.
47. Stow JL, Low PC, Offenhäuser C, Sangermani D. Cytokine secretion in macrophages and other cells: pathways and mediators. *Immunobiology*. 2009;214(7):601-12.
48. Cytokines. PubMed - MeSH Database. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68016207>. Accessed in 2016 (Sep 6).
49. Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity*. 2013;39(6):1003-18.
50. Danis VA, Kulesz AJ, Nelson DS, Brooks PM. Cytokine regulation of human monocyte interleukin-1 (IL-1) production in vitro. Enhancement of IL-1 production by interferon (IFN) gamma, tumour necrosis factor-alpha, IL-2 and IL-1, and inhibition by IFN-alpha. *Clin Exp Immunol*. 1990;80(3):435-43.
51. Sironi M, Breviario F, Proserpio P, et al. IL-1 stimulates IL-6 production in endothelial cells. *J Immunol*. 1989;142(2):549-53.
52. Sheedy FJ, Moore KJ. IL-1 signaling in atherosclerosis: sibling rivalry. *Nat Immunol*. 2013;14(10):1030-2.
53. Carrero JJ, Park SH, Axelsson J, Lindholm B, Stenvinkel P. Cytokines, atherogenesis, and hypercatabolism in chronic kidney disease: a dreadful triad. *Semin Dial*. 2009;22(4):381-6.

54. Tanaka T, Kishimoto T. The biology and medical implications of interleukin-6. *Cancer Immunol Res.* 2014;2(4):288-94.
55. Park HS, Park JY, Yu R. Relationship of obesity and visceral adiposity with serum concentrations of CRP, TNF-alpha and IL-6. *Diabetes Res Clin Pract.* 2005;69(1):29-35.
56. Apostolakis S, Vogiatzi K, Amanatidou V, Spandidos DA. Interleukin 8 and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res.* 2009;84(3):353-60.
57. Billiet T, Rutgeerts P, Ferrante M, Van Assche G, Vermeire S. Targeting TNF- $\alpha$  for the treatment of inflammatory bowel disease. *Expert Opin Biol Ther.* 2014;14(1):75-101.
58. Shurety W, Pagan JK, Prins JB, Stow JL. Endocytosis of uncleaved tumor necrosis factor-alpha in macrophages. *Lab Invest.* 2001;81(1):107-17.
59. Kaptoge S, Seshasai SR, Gao P, et al. Inflammatory cytokines and risk of coronary heart disease: new prospective study and updated meta-analysis. *Eur Heart J.* 2014;35(9):578-89.
60. Yang Y, Feng R, Bi S, Xu Y. TNF-alpha polymorphisms and breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;129(2):513-9.
61. Valovka T, Hottiger MO. p65 controls NF- $\kappa$ B activity by regulating cellular localization of I $\kappa$ B $\beta$ . *Biochem J.* 2011;434(2):253-63.
62. Viatour P, Merville MP, Bours V, Chariot A. Phosphorylation of NF-kappaB and IkappaB proteins: implications in cancer and inflammation. *Trends Biochem Sci.* 2005;30(1):43-52.
63. Hayden MS, Ghosh S. Regulation of NF- $\kappa$ B by TNF family cytokines. *Semin Immunol.* 2014;26(3):253-66.

64. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. RNA synthesis and splicing. In: Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L, editors. *Biochemistry*. 5<sup>th</sup> ed. New York: WH Freeman and Company; 2002.
65. Kelso A. Cytokines : principles and prospects. *Immunol Cell Biol*. 1998;76:(4)300-17.
66. Mesko B, Poliska S, Szegedi A, et al. Peripheral blood gene expression patterns discriminate among chronic inflammatory diseases and healthy controls and identify novel targets. *BMC Med Genomics*. 2010;3:15.
67. Calder PC, Ahluwalia N, Brouns F, et al. Dietary factors and low-grade inflammation in relation to overweight and obesity. *Br J Nutr*. 2011;106 Suppl 3:S5-78.
68. Ghanbari R, Anwar F, Alkharfy KM, Gilani AH, Saari N. Valuable nutrients and functional bioactives in different parts of olive (*Olea europaea* L.) -a review. *Int J Mol Sci*. 2012;13(12):3291-340.
69. Mancini A, Imperlini E, Nigro E, et al. Biological and Nutritional Properties of Palm Oil and Palmitic Acid: Effects on Health. *Molecules*. 2015;20(9):17339-61.
70. Widmer RJ, Flammer AJ, Lerman LO, Lerman A. The Mediterranean diet, its components, and cardiovascular disease. *Am J Med*. 2015;128(3):229-38.
71. Estruch R, Ros E, Salas-Salvadó J, et al. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *N Engl J Med*. 2013;368(14):1279-90.
72. Martínez-González MA., Salas-Salvadó J, Estruch R, et al. Benefits of the Mediterranean Diet: Insights From the PREDIMED Study. *Prog Cardiovasc Dis*. 2015;58(1):50-60.

73. Konstantinidou V, Covas MI, Muñoz-Aguayo D, et al. In vivo nutrigenomic effects of virgin olive oil polyphenols within the frame of the Mediterranean diet: a randomized controlled trial. *FASEB J.* 2010;24(7):2546-57.
74. Schwab U, Lauritzen L, Tholstrup T, et al. Effect of the amount and type of dietary fat on cardiometabolic risk factors and risk of developing type 2 diabetes, cardiovascular diseases, and cancer: a systematic review. *Food Nutr Res.* 2014;58.
75. Mozaffarian D, Micha R, Wallace S. Effects on coronary heart disease of increasing polyunsaturated fat in place of saturated fat: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS Med.* 2010;7(3):e1000252.
76. Zheng JS, Hu XJ, Zhao YM, Yang J, Li D. Intake of fish and marine n-3 polyunsaturated fatty acids and risk of breast cancer: meta-analysis of data from 21 independent prospective cohort studies. *BMJ.* 2013;346:f3706.
77. Li D. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and non-communicable diseases: meta-analysis based systematic review. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2015;24(1):10-5.
78. Wu JH, Micha R, Imamura F, et al. Omega-3 fatty acids and incident type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Br J Nutr.* 2012;107 Suppl 2:S214-27.
79. Calder PC, Ahluwalia N, Albers R, et al. A consideration of biomarkers to be used for evaluation of inflammation in human nutritional studies. *Br J Nutr.* 2013;109 Suppl:S1-34.

**Sources of funding:** Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) (CDS-APQ-00474-12) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (474679/2013-6). Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) Foundation provided a research grant to DMUP Rocha. HHM Hermsdorff and J Bressan are CNPq fellows.

**Conflicts of interest:** None

**Date of first submission:** June 1, 2016

**Last received:** July 3, 2016

**Accepted:** July 7, 2016

**Address for correspondence:**

Helen Hermana Miranda Hermsdorff

Departamento de Nutrição e Saúde, Universidade Federal de Viçosa (UFV)

Av. P. H. Rolfs, s/nº

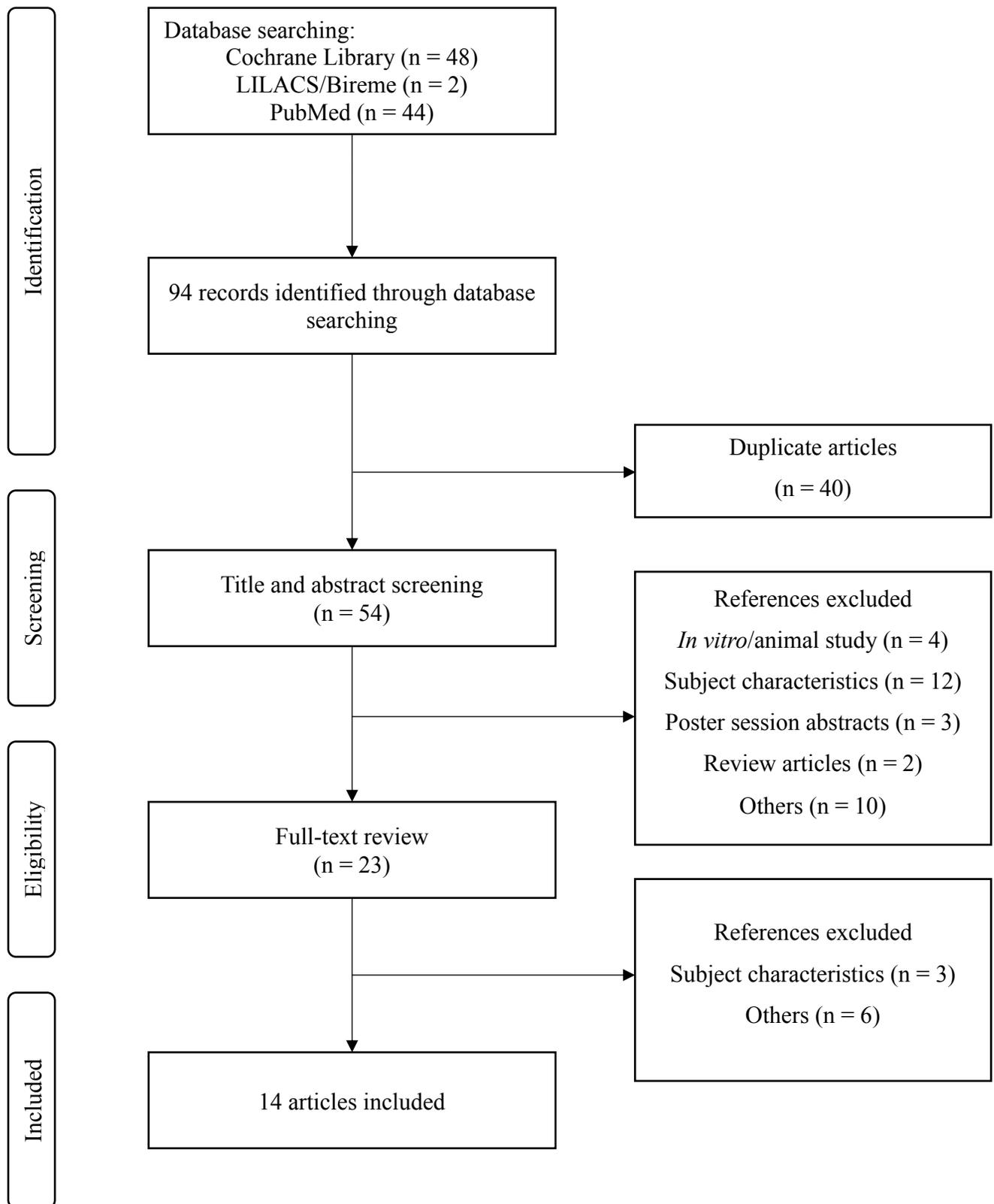
Campus Universitário — Viçosa (MG) — Brasil

CEP 36570-900

Tel. (+55 31) 3899-1269

Fax: (+55 31) 3899-2541

E-mail: helenhermana@ufv.br



**Figure 1.** Literature search process.

We excluded references if they consisted of an in vitro or animal study; because of some characteristics of the participants (pregnancy, lactation, menopause, athlete, hormonal treatment, alcohol or drug dependence, chronic illness such as hepatic, renal, thyroid or cardiac dysfunction, or acute inflammation process); or if they were poster session abstracts, review articles or other types (non-standard dietary interventions; studies on drug therapy; studies without analysis on inflammation; dietary trial intervention with fatty acid intake along with vitamin or mineral supplementation; studies on heated oils; or studies without a clear difference between the total polyunsaturated, monounsaturated and saturated fatty acid content that was used to compare the interventions).

**Table 1.** Database search results

Database	Search	Filters		Results
Cochrane Library	("gene expression" OR "RNA" OR "mRNA" OR "gene") AND (("saturated fatty acid" OR "saturated fatty acids" OR "SFA" OR "SFAs") OR ("monounsaturated fatty acid" OR "monounsaturated fatty acids" OR "MUFA" OR "MUFAs") OR ("polyunsaturated fatty acid" OR "polyunsaturated fatty acids" OR "PUFA" OR "PUFAs")) AND ("inflammation" OR "inflammatory" OR "proinflammatory")	Title, abstract, keywords in trials	48 articles	2 animal/ <i>in vitro</i> studies 3 poster session abstracts 43 clinical trials
LILACS	("gene expression" OR "RNA" OR "mRNA" OR "gene") AND (("saturated fatty acid" OR "saturated fatty acids" OR "SFA" OR "SFAs") OR ("monounsaturated fatty acid" OR "monounsaturated fatty acids" OR "MUFA" OR "MUFAs") OR ("polyunsaturated fatty acid" OR "polyunsaturated fatty acids" OR "PUFA" OR "PUFAs")) AND ("inflammation" OR "inflammatory" OR "proinflammatory")	No filter	2 articles	2 reviews
PubMed	("gene expression" OR "RNA" OR "mRNA" OR "gene") AND (("saturated fatty acid" OR "saturated fatty acids" OR "SFA" OR "SFAs") OR ("monounsaturated fatty acid" OR "monounsaturated fatty acids" OR "MUFA" OR "MUFAs") OR ("polyunsaturated fatty acid" OR "polyunsaturated fatty acids" OR "PUFA" OR "PUFAs")) AND ("inflammation" OR "inflammatory" OR "proinflammatory")	Title/abstract in clinical trials on humans	44 articles	4 animal/ <i>in vitro</i> studies 40 clinical trials

**Table 2.** Summary of the studies selected

Year, authors	Subjects	Study design	Dietary intervention	Duration	Postprandial intervention	Inflammatory gene markers
2009, Bouwens et al. <sup>29</sup>	n = 111 M/F: 66/45 Age: 66-80 years	Clinical trial, randomized, double-blind, controlled, parallel	3 groups (N/A E% from fat): - High n3 PUFA (EPA/DHA): 1.8 g/day - Control (sunflower oil): 4.0 g/day	26 weeks	-	RNA microarray analysis (encoding 17,699 genes) in PBMCs, measured in fasting period at baseline and after the intervention period.
2009, van Dijk et al. <sup>33</sup>	n = 20 M/F: 10/10 Mean age: 45-60 years	Clinical trial, parallel	2 groups (N/A E% from fat): - SFA: 19 E% - MUFA: 20 E%	8 weeks	-	RNA microarray analysis (encoding 17,699 genes) in SAT, measured in fasting period at baseline and after the intervention period.
2009, Jiménez-Gómez et al. <sup>24</sup>	n = 20 M/F: 20/0 Mean age: N/A	Clinical trial, randomized, crossover, postprandial	3 groups: High fat (38 E% from fat): - SFA: 22 E% - MUFA: 24 E% Low fat (< 30% E% from fat): - n3 PUFA (ALA): 2 E%	4 weeks	Breakfast (60 E% from fat): - SFA: 35 E% - MUFA: 36 E% - n3 PUFA (ALA): 4 E%	TNF- $\alpha$ , IL-6 and MCP-1 in PBMCs, measured in fasting period and 3, 6 and 9 h after the breakfast.
2011, Meneses et al. <sup>25</sup>	n = 39 M/F: 14/25 Mean age: ~ 57 years	Clinical trial, randomized, controlled, parallel, postprandial	4 groups: High fat (38 E% from fat): - SFA: 16 E% - MUFA: 20 E% Low fat (28 E% from fat): - LFHCC n3: supplement with 1.24 g/day of n3 PUFA - LFHCC: 1.2 g/day supplement of control (sunflower oil)	12 weeks	Breakfast (65 E% from fat): - SFA: 38 E% - MUFA: 43 E% - LFHCC n3: supplement with 1.24 g of n3 PUFA - LFHCC: supplement with placebo capsules	p65, I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ 2, IL-6, MCP-1 and IL-1 $\beta$ in SAT, measured in fasting period and 4 h after the breakfast.
2011, Pietraszek et al. <sup>23</sup>	n = 34 M/F: 11/23 Mean age: ~ 50 years	Clinical trial, randomized, crossover, postprandial	Standard diet: 24 E% from fat	1 day	Breakfast (87 E% from fat): - SFA: 79 E% <sup>§</sup> - MUFA: 72 E%	ADIPOR1, ADIPOR2, MCP-1, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-6R, CD16A, LEP, LEPR, RBP4, TLR4, TNF- $\alpha$ AND TNFRSF1A in muscle and SAT, measured in fasting period and 3 h 30 min after the breakfast. Also,

Year, authors	Subjects	Study design	Dietary intervention	Duration	Postprandial intervention	Inflammatory gene markers
						ADIPQ was determined in SAT.
<b>2011, Rudkowska et al.<sup>34</sup></b>	n = 16 M/F: 7/9 Mean age: 57 years	Clinical trial, randomized, crossover	2 groups: - n3 PUFA: 1.8 g/day - n3 PUFA FP: 1.8 g/day + fish protein	8 weeks	-	RNA microarray analysis (encoding 37,804 genes) in PBMCs, measured at baseline and after the intervention period.
<b>2012, Camargo et al.<sup>26</sup></b>	n = 20 M/F: 10/10 Mean age: 67 years	Clinical trial, randomized, crossover, postprandial	3 groups: High fat (38 E% from fat): - SFA: 22 E% - MUFA: 24 E% Low fat (< 30% E% from fat): - n3 PUFA (ALA): 2 E%	4 weeks	Breakfast (60 E% from fat): - SFA: 35 E% - MUFA: 36 E% - n3 PUFA (ALA): 4 E%	p65, IκBα, MCP-1, MIF-1, MMP-9 and IL-6 in PBMCs, measured in fasting period and 1, 2 and 4 h after the breakfast.
<b>2012, Cruz-Teno et al.<sup>27</sup></b>	n = 75 M/F: 28/47 Mean age: ~ 56 years	Clinical trial, randomized, controlled, parallel, postprandial	4 groups: High fat (38 E% from fat): - SFA: 16 E% - MUFA: 20 E% Low fat (28 E% from fat): - LFHCC n3: supplement with 1.24 g/day of n3 PUFA - LFHCC: 1.0 g/day supplement of control (sunflower oil)	12 weeks	Breakfast (65 E% from fat): - SFA: 38 E% - MUFA: 43 E% - LFHCC n3: supplement with 1.24 g of n3 PUFA - LFHCC: supplement with placebo capsules	TNF-α, IL-6, IκB-α, p65, MCP-1, MIF, MMP-9 in PBMCs, measured in fasting period and 2 and 4 h after the breakfast.
<b>2012, van Dijk et al.<sup>30</sup></b>	n = 49 M/F: 22/27 Mean age: ~ 55 years	Clinical trial, parallel	3 groups (37-40 E% from fat): - SFA: 19 E% - MUFA: 20% E% - MED*: 21 E% from MUFA	8 weeks	-	RNA microarray analysis (encoding 17,699 genes) in PBMCs, measured in fasting period at baseline and after the intervention period.
<b>2012, van Dijk et al.<sup>22</sup></b>	n = 42 M/F: 42/0 Age: 50-70 years	Clinical trial, randomized, double-blind, crossover, postprandial	Low-fat meal: N/A	1 day	Shake (87 E% from fat): - SFA: 46.5 E% - MUFA: 72 E% - n3 PUFA (EPA/DHA): 23.7 E%	IL-1β, IL-8, MCP-1, NFκB1 and TNF-α in PBMCs, measured in fasting period and 2 and 4 h after the breakfast.
<b>2012, Schmidt et al.<sup>36</sup></b>	n = 40 M/F: 40/0 Mean age: ~ 40 years	Clinical trial, randomized, double-blind, controlled,	2 groups: - n3 PUFA (EPA/DHA): 2.7 g/day	12 weeks	Consumption of capsules of the dietary intervention.	RNA microarray analyses from whole blood at baseline, after 1 and 12 weeks of

Year, authors	Subjects	Study design	Dietary intervention	Duration	Postprandial intervention	Inflammatory gene markers
		parallel, postprandial	- Control (n6 PUFA): 3.05 g/day (LA)			supplementation (long-term effect). Also 4 h after intake of capsules (postprandial response).
2012, Itariu et al. <sup>31</sup>	n = 55 M/F: 46/9 Mean age: ~ 38 years	Clinical trial, randomized, controlled, parallel	2 groups (30 E% from fat): - n3 PUFA (EPA/DHA): 3.36 g/day - Control (butter): 5 g/day	8 weeks	-	MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , IL-6, ADIPOQ, HIF1A and TGF- $\beta$ 1, CD68, CD163, MRC1 and CD40 in SAT and VAT, after the intervention period.
2013, Kratz et al. <sup>32</sup>	n = 24 M/F: 8/16 Mean age: ~ 39 years	Clinical trial, randomized, single-blind, controlled, parallel	2 groups (~34 E% from fat): - n3 PUFA: 3.5 E% - Control: 0.5 E% from n3 PUFA	14 weeks	-	TNF- $\alpha$ , IL-6, ICAM-1, CD14, CD206, CD284, MCP-1 and SAA1 in SAT, collected at baseline and after the intervention period.
2013, Labonté et al. <sup>35</sup>	n = 12 M/F: 12/0 Mean age: 54 years	Clinical trial, randomized, double-blind, controlled, crossover	2 groups: - n3 PUFA (EPA/DHA): 3.0 g/day - Control: blend of corn and soybean oil	8 weeks	-	IL-6, IL-18, TNF- $\alpha$ in duodenal samples, collected in fasting period at the end of each intervention.

n = number of subjects; M/F = male/female; N/A = not available; SFA = saturated fatty acids; MUFA = monounsaturated fatty acids; n3 PUFA = n3 polyunsaturated fatty acids; LFHCC n3 = high complex carbohydrate supplemented with n3 PUFA; LFHCC = high complex carbohydrate supplemented with placebo; ALA =  $\alpha$ -linolenic acid; LA = linoleic acid; E% = % of energy intake; PBMC = peripheral blood mononuclear cells; SAT = subcutaneous adipose tissue; VAT = visceral adipose tissue; ADIPOR = adiponectin receptor; ADIPQ = adiponectin gene; CD14, CD163, CD16A, CD206, CD284, CD40, CD68 = macrophage markers; HIF1 $\alpha$  = hypoxia-induced factor 1 $\alpha$ ; ICAM-1 = intercellular adhesion molecule-1; IL = interleukin; I $\kappa$ B = inhibitor of NF- $\kappa$ B; LEP = leptin; LEPR = leptin receptor; MCP-1 = monocyte chemoattractant protein-1; MIF = macrophage migration inhibitory factor; MIP-1 = macrophage inflammatory protein 1; MMP-9 = matrix metalloproteinase 9; MRC1 = mannose receptor C type 1; NF $\kappa$ B1 = nuclear factor kappa-B subunit 1; p65 = nuclear p65 protein; RBP4 = retinol binding protein 4; SAA1 = serum amyloid A1; TGF- $\beta$ 1 = transforming growth factor  $\beta$ 1; TLR4 = Toll-like receptor 4; TNF- $\alpha$  = tumor necrosis factor alpha; TNFRSF1A = tumor necrosis factor receptor superfamily member 1A.

\*Mediterranean (MED) diet components high in MUFA from extra-virgin olive oil and containing additional MED components (i.e. fatty fish, unrefined grain products, nuts, legumes and red wine).

<sup>§</sup>The SFA meal was high in coconut oil with 49 E% from medium-chain SFA (predominantly lauric acid) and 30 E% from long-chain SFA (predominantly myristic acid).