

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia

**Inflamação crônica de baixo grau associada ao polimorfismo rs1205 do
gene *CRP* em mulheres na pós-menopausa**

IRIANE PRADO DE SANTIS

Orientadora: Profa. Dra. Poli Mara Spritzer

Co-orientador: Prof. Dr. Ramon Bossardi Ramos

Porto Alegre, julho de 2018.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia

Inflamação crônica de baixo grau associada ao polimorfismo rs1205 do gene *CRP* em mulheres na pós-menopausa

IRIANE PRADO DE SANTIS

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Endocrinologia, à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós - Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia

Orientadora: Profa. Dra. Poli Mara Spritzer

Co-orientador: Prof. Dr. Ramon Bossardi Ramos

Porto Alegre, julho de 2018.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha orientadora, Dra. Poli Mara Spritzer, pelos ensinamentos que levarei adiante e pela confiança em mim depositada.

Agradeço ao meu co-orientador, Dr. Ramon Bossardi Ramos, pela disponibilidade, pelo direcionamento dos estudos e pelo incentivo.

Agradeço, também, aos colegas que tiveram participação na realização direta desse trabalho: Juliana Lindenau, Thais Rasia Silva, Gislaine Casanova e Karen Oppermann.

Quero agradecer também aos demais colegas da Unidade de Endocrinologia Ginecológica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, que compartilharam de suas experiências acadêmicas intensificando o aprendizado durante este período. Agradeço à Natália Goulart e Miriam Sant´Helena, pela assistência sempre que necessário.

Obrigada à minha família: meus pais, Luís e Solange, meus irmãos, Luciane e Luís Henrique e ao meu noivo Gabriel pelo incentivo à jornada acadêmica.

À todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho e aos amigos que me acompanharam e torceram por mim durante essa caminhada, sou muita grata por todo apoio.

RESUMO

Introdução: A prevalência de doença cardiovascular (DCV) aumenta exponencialmente em mulheres na pós-menopausa. O declínio dos níveis de estrogênio endógeno tem sido associado com aumento de fatores de risco cardiovascular e a presença de inflamação desempenha um papel central na aterosclerose. A proteína C reativa ultrasensível (PCR-us) é um importante marcador de inflamação, capaz de prever risco para DCV em pessoas aparentemente saudáveis. O polimorfismo rs1205 do gene *CRP* tem sido associado aos níveis circulantes de PCR-us.

Objetivo: Avaliar se genótipos do rs1205 do gene *CRP* estão associados com fatores de risco cardiovascular e a presença de inflamação crônica de baixo grau, de acordo com os níveis de PCR-us, em mulheres na pós-menopausa.

Métodos: Estudo transversal realizado a partir de um biorrepositório com 327 amostras de mulheres na pós-menopausa sem doença clínica evidente. Dados da avaliação clínica e laboratorial para fatores de risco cardiovascular foram coletados. Cartões de FTA (Flinders Technology Associates) foram utilizados para extração de DNA e posterior genotipagem por RT-PCR. A amostra foi estratificada de acordo com PCR-us inferior ou ≥ 3 mg/L.

Resultados: A média de idade da amostra foi 55 ± 6 anos. Oitenta e nove mulheres apresentaram PCR-us ≥ 3 mg/L (27,21%). Idade, tempo de menopausa e glicemia em jejum foram similares entre os grupos com PCR-us $<$ ou ≥ 3 mg/L. Participantes com PCR-us ≥ 3 mg/L apresentaram maiores níveis de triglicerídeos e HOMA-IR ($p < 0,005$) e maior frequência de cintura > 88 cm e IMC > 30 kg/m² ($p < 0,001$). A distribuição genotípica foi CC: 39,4%, CT: 47,4% e TT: 13,2%. Os níveis de PCR-us foram significativamente maiores nas portadoras de alelo C quando comparadas ao genótipo homozigoto TT [1,85 (0,74 - 3,73) vs. 1,28 (0,59 - 2,09), $p = 0,017$]. As portadoras do alelo C (CC+CT) foram mais prevalentes no grupo com PCR-us ≥ 3 mg/L (97% vs. 83%, $p = 0,003$) e apresentaram razão de prevalência (RP) para PCR-us ≥ 3 mg/L de 4,34 [IC95% 1,44-13,11], ($p = 0,009$). IMC e idade tiveram RP de (1,07 [IC95% 1,04-1,10] e 1,03 [IC95% 1,01-1,06], $p < 0,03$). Níveis de estradiol apresentaram RP de 0,99 [IC95% 0,98 - 0,99], ($p = 0,03$).

Conclusão: A presença do alelo C do SNP rs1205 do gene *CRP* foi associada com maior prevalência de inflamação crônica de baixo grau e risco cardiovascular em mulheres na pós-menopausa.

Palavras chave: Menopausa, polimorfismo, risco cardiovascular, proteína C reativa.

ABSTRACT

Introduction: The prevalence of cardiovascular disease (CVD) increases exponentially in postmenopausal women. The decline in endogenous estrogen levels has been associated with the presence of cardiovascular factors and the presence of inflammation plays a central role in atherosclerosis. High sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) is an important marker of inflammation, capable of predicting the risk for CVD in apparently healthy people. The rs1205 polymorphism of the *CRP* gene has been associated with circulating levels of hs-CRP.

Objective: To evaluate whether rs1205 genotypes of the *CRP* gene are associated with cardiovascular risk factors and the presence of low-grade chronic inflammation according to the levels of hs-CRP in postmenopausal women.

Methods: Cross-sectional study conducted from a bio-bank with 327 samples of postmenopausal women without evidence of clinical disease. Data from the clinical and laboratory evaluation for cardiovascular risk factors were collected. FTA cards (Flinders Technology Associates) were used for DNA extraction and subsequent genotyping by RT-PCR. The sample was stratified according to lower hs-CRP or $\geq 3\text{mg/L}$

Results: The mean age of the sample was 55 ± 6 years. Eighty-nine women had hs-CRP $\geq 3\text{mg/L}$ (27.21%). Age, time since menopause, and fasting glucose, were the same between the groups with hs-CRP $<$ or $\geq 3\text{mg/L}$. Participants with hs-CRP $\geq 3\text{mg/L}$ presented higher levels of triglycerides and HOMA-IR ($p < 0.005$) and higher waist frequency $> 88\text{cm}$ and BMI $> 30\text{kg/m}^2$ ($p < 0.001$). The genotype distribution was CC: 39.4%, CT: 47.4% and TT: 13.2%. The levels of hs-CRP were significantly higher in the C allele carriers when compared to the homozygous TT genotype [1.85 (0.74 - 3.73) vs. 1.28 (0.59 - 2.09), $p = 0.017$]. The C allele carriers (CC + CT) were more prevalent in the group with hs-CRP $\geq 3\text{mg/L}$ (97% vs. 83%, $p = 0.003$) and presented a prevalence ratio for hs-CRP of 4.34 [95% CI 1.44-13.11], ($p = 0.009$). BMI and age had PR of (1.07 [IC95% 1.04 - 1.10] e 1.03 [IC95% 1.01 - 1.06] , $p < 0.03$). Estradiol levels had a PR of 0.99 [95% CI] 0.98 - 0.99], ($p = 0.03$).

Conclusion: The presence of the rs1205 SNP C allele of the *CRP* gene was associated with a higher prevalence of low-grade chronic inflammation and cardiovascular risk in postmenopausal women.

Keywords: Menopause; polymorphism; cardiovascular risk; C reactive protein.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1: Apresenta as características clínicas e metabólicas das participantes.....	39
Tabela 2: Apresenta as características metabólicas, clínicas e antropométricas das participantes estratificadas pela presença (PCR-us ≥ 3 mg/L) ou ausência de inflamação.....	40
Figura 1: Mostra os níveis séricos de PCR-us de acordo com os genótipos.....	41
Tabela3: Apresenta a distribuição alélica e genotípica do rs1205, de acordo com as categorias de PCR-us: < 3 mg/L e ≥ 3 mg/L.....	41
Tabela 4: Mostra a razão de prevalência de PCR-us ≥ 3 mg/L de acordo com: genótipos, terapia hormonal, idade, IMC e estradiol.....	42

Essa Dissertação de Mestrado segue o formato proposto pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sendo apresentada em duas partes: Parte I (introdução) e Parte II (artigo original submetido à publicação):

- **Parte I:** PCR-us e risco cardiovascular associado a fatores genéticos na pós-menopausa
- **Parte II:** C-reactive protein gene rs1205 polymorphism is associated with low-grade chronic inflammation in postmenopausal women

SUMÁRIO

Parte I – Introdução: PCR-us e risco cardiovascular associado a fatores genéticos na pós-menopausa.....	10
Parte II – Artigo original: C-reactive protein gene rs1205 polymorphism is associated with low-grade chronic inflammation in postmenopausal women.....	20

Parte I: Introdução

PCR-us e risco cardiovascular associado a fatores genéticos na pós-menopausa

A menopausa ocorre em média aos 50 anos e é caracterizada pela ausência de menstruação por pelo menos um ano. Esse é um período em que muitas mulheres experimentam modificações desfavoráveis na qualidade de vida, além do aumento exponencial do risco de doença cardiovascular (DCV), sendo esta a principal causa de morte nessa população [1, 2]. A diminuição dos níveis de estrogênio endógeno pode levar a fenótipos desfavoráveis, como modificações no perfil lipídico, aumento dos níveis de triglicerídeos e colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL) e redução dos níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL) [3, 4]. Além disso, frequentemente, há diminuição da massa óssea e da massa magra esquelética, aumento da secura vaginal, perda de libido, ocorrência de ondas de calor e aumento da adiposidade. Esses fatores estão associados com o aumento do risco de complicações, como hipertensão arterial, embolia pulmonar, litíase biliar, dislipidemias, diabetes, síndrome metabólica e DCV [5, 6]. O mecanismo que desencadeia essas alterações pode ser explicado, pelo menos em parte, pelo avanço da idade e dos mecanismos de adaptação fisiológica, além de estarem associados com a deficiência do estrogênio [7].

Sabe-se que o estrogênio exerce um efeito protetor sobre o organismo da mulher, o qual está relacionado à sua ação sobre o metabolismo de lipídeos e carboidratos (diminuição da resistência insulínica periférica), além de sua ação sobre fatores vasoativos, plaquetas, fatores de coagulação e fibrinólise [8]. O declínio na produção de estrogênio endógeno está associado com fatores de risco cardiovascular e maior prevalência de DCV [6, 9]. Além disso, a menopausa também está associada com um estado inflamatório de baixo grau e a inflamação é um mecanismo chave que desempenha um papel central na iniciação e progressão da aterosclerose [10].

Neste contexto, a proteína C reativa (PCR) é um importante biomarcador sensível de inflamação, utilizado na prática clínica [11]. A proteína C reativa é um reagente de fase aguda, não específico, produzido predominantemente pelo fígado em resposta a citocinas pró-inflamatórias, especialmente interleucina IL-1, IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF) - α , e pode estar associado a uma variedade de doenças [12-14]. Este analito foi descoberto em 1930

por William S. Tiller e Thomas Francis, através da reação do soro de pacientes infectados por *Streptococcus pneumoniae*, que reagia com um componente celular da bactéria (Fração C), tal “substância reagente” responsável por esta precipitação foi denominada Proteína C reativa (PCR)[15, 16]. Estudos posteriores caracterizaram a PCR como um analito que sofria aumento em pacientes com patologias diversas e que negativava com a resolução do processo, todavia permanecia positiva nos casos de evolução desfavorável [15].

A PCR é constituída por 206 aminoácidos que formam 5 subunidades unidas por ligação não covalente, dispostas simetricamente em torno de um eixo central, ela exerce sua função fisiológica a partir de ligações dependentes de cálcio com os possíveis ligantes: fosfocolina, cardiolipinas ou lipoproteínas. O complexo “ligante-PCR” ativa a via clássica do sistema complemento levando a opsonização e fagocitose do microorganismo e/ou células lesadas [17]. Sua impotência está associada com a capacidade de reconhecer patógenos e células danificadas do hospedeiro e de iniciar sua eliminação interagindo com sistemas efetores humorais e celulares no sangue [18]. A interação da PCR com macrófagos/monócitos induz a secreção de interleucinas e fator de necrose tumoral, ativando a transcrição proteica e exacerbando a resposta inflamatória [19].

O desenvolvimento de ensaios laboratoriais de alta sensibilidade para este analito, denominado Proteína C reativa ultrasensível (PCR-us), tornou-se uma ferramenta importante para explorar o papel desse reagente como um preditor de eventos cardiovasculares [20, 21]. A dosagem de PCR-us apresenta boa estabilidade, reprodutibilidade e sensibilidade, o que possibilita a detecção do analito em indivíduos aparentemente saudáveis, a fim de estimar risco cardiovascular [22]. Muitos estudos prospectivos confirmaram a associação positiva entre níveis de PCR-us e DCV, mostrando que o aumento dos níveis da proteína implica em aumento gradual do risco cardiovascular [23-25]. PCR-us é capaz de indicar precocemente um dano aterosclerótico, pela sua capacidade de ativação do endotélio, que prejudica a produção de óxido nítrico (NO), resultando na disfunção endotelial [26].

Os níveis circulantes de PCR-us estão diretamente relacionados ao risco cardiovascular e podem ser avaliados de acordo com a Diretriz de Práticas de Medicina Laboratorial de Bioquímica Clínica, que dispõe sobre biomarcadores emergentes para a prevenção primária de doença cardiovascular: níveis < 1 mg/L são desejáveis, pois refletem um baixo estado inflamatório sistêmico e menor risco de aterosclerose; níveis entre 1 e 3

mg/L representam risco vascular moderado; enquanto que níveis >3 mg/L indicam alto risco vascular. Resultados superiores a 10 mg/L devem ser confirmados em análises subsequentes, excluindo a possibilidade de resposta de fase aguda ou processo infeccioso transitório [27, 28].

A concentração de proteína C reativa detectada em amostras de sangue reflete uma condição multifatorial, ou seja, têm influência de fatores ambientais e genéticos. A PCR está associada à adiposidade, principalmente à gordura abdominal, à dislipidemia e com a resistência à insulina [29]. Idade, tabagismo e uso de medicamentos também podem influenciar seus níveis [30]. Estudos demonstraram que obesidade e síndrome metabólica conferem níveis mais elevados de PCR e aumento do risco de DCV [31, 32]. A Terapia Hormonal na menopausa, por exemplo, pode aumentar os níveis de PCR-us quando administradas em doses orais convencionais; em contraste, estudos demonstraram que baixas doses de estradiol ou administrados pela via transdérmica não implicam aumento de PCR-us [4, 26].

A herdabilidade da concentração circulante é estimada em 25% a 56% [33-35] sugerindo que a variação genética é mesmo um determinante importante nos níveis de PCR. Estudos de associação genômica (GWAS- Genome-Wide Association Studies) identificaram vários genes associados aos níveis de PCR; dentre esses, o gene *CRP*, teve o efeito mais forte [36]. Outros estudos genéticos também demonstraram a associação entre polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) do *CRP* e os níveis da proteína [37].

O gene *CRP* que codifica a proteína C reativa está localizado no braço longo do cromossomo um (1q23.2) [18]. Estudos de coorte demonstraram que um conjunto de polimorfismos, incluindo: rs1417938 (SNP na região do íntron 1), rs309144 e rs3093059 (SNPs na região promotora), rs1800947 (SNP no éxon 2), rs1205 e rs1130864 (ambos na região flanqueadora 3' não traduzida) foram associados com diferenças nos níveis de proteína C reativa em todos os estudos [38, 39].

O rs1205, caracterizado pela substituição de citosina (C) por timina (T), tem sido relacionado aos níveis sanguíneos de proteína C reativa e possivelmente influencia a expressão do *CRP* [18]. A presença do alelo C na região polimórfica tem sido associada a maiores taxas de PCR além de maior risco de desfechos cardiometabólicos adversos [40]. Um estudo NHANES (National Health and Nutrition Examination Survey), que incluiu 41% das

mulheres na pós-menopausa, encontrou uma associação entre as concentrações de proteína C reativa e rs1205 nas mulheres americanas adultas. [10]. Outro estudo epidemiológico de população mista (homens e mulheres) sobre fatores de risco de envelhecimento (AGES-Reykjavik Study,) mostrou que o alelo C capturou os efeitos mais fortes sobre os níveis de PCR-us. Os portadores do alelo de risco (C) tinham níveis significativamente mais altos de PCR-us do que os não portadores [41].

A evidência de que o rs1205 do gene *CRP* está associado a fatores de risco para DCV pode contribuir para um conhecimento mais aprofundado dos mecanismos de susceptibilidade à doença na população. Estudos com mulheres na pós-menopausa são necessários porque representam um grupo de risco com maior incidência de desfechos cardiometabólicos. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar se os genótipos do gene *CRP* influenciam a presença de inflamação crônica de baixo grau ($\text{PCR-us} \geq 3\text{mg/L}$) como um marcador não convencional para o risco cardiovascular e para determinar um possível impacto deste polimorfismo no risco cardiovascular.

REFERÊNCIAS

- [1] D. Mozaffarian, E.J. Benjamin, A.S. Go, D.K. Arnett, M.J. Blaha, M. Cushman, S.R. Das, S. de Ferranti, J.P. Després, H.J. Fullerton, V.J. Howard, M.D. Huffman, C.R. Isasi, M.C. Jiménez, S.E. Judd, B.M. Kissela, J.H. Lichtman, L.D. Lisabeth, S. Liu, R.H. Mackey, D.J. Magid, D.K. McGuire, E.R. Mohler, C.S. Moy, P. Muntner, M.E. Mussolino, K. Nasir, R.W. Neumar, G. Nichol, L. Palaniappan, D.K. Pandey, M.J. Reeves, C.J. Rodriguez, W. Rosamond, P.D. Sorlie, J. Stein, A. Towfighi, T.N. Turan, S.S. Virani, D. Woo, R.W. Yeh, M.B. Turner, W.G. Members, A.H.A.S. Committee, S.S. Subcommittee, Executive Summary: Heart Disease and Stroke Statistics--2016 Update: A Report From the American Heart Association, *Circulation* 133(4) (2016) 447-54.
- [2] T.S. Mikkola, T.B. Clarkson, Estrogen replacement therapy, atherosclerosis, and vascular function, *Cardiovasc Res* 53(3) (2002) 605-19.
- [3] J.R. Guthrie, L. Dennerstein, E.C. Dudley, Weight gain and the menopause: a 5-year prospective study, *Climacteric* 2(3) (1999) 205-11.
- [4] G. Casanova, R. Bossardi Ramos, P. Ziegelmann, P.M. Spritzer, Effects of low-dose versus placebo or conventional-dose postmenopausal hormone therapy on variables related to cardiovascular risk: a systematic review and meta-analyses of randomized clinical trials, *J Clin Endocrinol Metab* 100(3) (2015) 1028-37.
- [5] R. Clapauch, A. Athayde, R.M. Meirelles, R.V. Weiss, D.P. Pardini, L.M. Leão, L.P. Marinheiro, [Hormonal therapy of menopause: 2004 position of the Department of Female Endocrinology and Andrology of the Brazilian Society of Endocrinology and Metabolism], *Arq Bras Endocrinol Metabol* 49(3) (2005) 449-54.
- [6] V.J. Ama Moor, J.R. Nansseu, M.E. Nouaga, J.J. Noubiap, G.D. Nguetsa, G. Tchanana, A. Ketcha, J. Fokom-Domgue, Assessment of the 10-year risk of cardiovascular events among a group of sub-Saharan African post-menopausal women, *Cardiol J* (2015).

- [7] D. Vaidya, D.M. Becker, V. Bittner, R.A. Mathias, P. Ouyang, Ageing, menopause, and ischaemic heart disease mortality in England, Wales, and the United States: modelling study of national mortality data, *BMJ* 343 (2011) d5170.
- [8] S.R. El Khoudary, R.P. Wildman, K. Matthews, R.C. Thurston, J.T. Bromberger, K. Sutton-Tyrrell, Endogenous sex hormones impact the progression of subclinical atherosclerosis in women during the menopausal transition, *Atherosclerosis* 225(1) (2012) 180-6.
- [9] K.S. Stamatelopoulos, E. Armeni, G. Georgiopoulos, M. Kazani, K. Kyrkou, K. Stellos, A. Koliviras, A. Alexandrou, M. Creatsa, C. Papamichael, I. Lambrinouadaki, Recently postmenopausal women have the same prevalence of subclinical carotid atherosclerosis as age and traditional risk factor matched men, *Atherosclerosis* 221(2) (2012) 508-13.
- [10] A.Z. Fan, A. Yesupriya, M.H. Chang, M. House, J. Fang, R. Ned, D. Hayes, N.F. Dowling, A.H. Mokdad, Gene polymorphisms in association with emerging cardiovascular risk markers in adult women, *BMC Med Genet* 11 (2010) 6.
- [11] A. Avan, S.B. Tavakoly Sany, M. Ghayour-Mobarhan, H.R. Rahimi, M. Tajfard, G. Ferns, Serum C-reactive protein in the prediction of cardiovascular diseases: Overview of the latest clinical studies and public health practice, *J Cell Physiol* (2018).
- [12] H. Tomiyama, R. Okazaki, Y. Koji, Y. Usui, T. Hayashi, S. Hori, A. Yamashina, Elevated C-reactive protein: a common marker for atherosclerotic cardiovascular risk and subclinical stages of pulmonary dysfunction and osteopenia in a healthy population, *Atherosclerosis* 178(1) (2005) 187-92.
- [13] A.I. Russell, D.S. Cunninghame Graham, C. Shepherd, C.A. Robertson, J. Whittaker, J. Meeks, R.J. Powell, D.A. Isenberg, M.J. Walport, T.J. Vyse, Polymorphism at the C-reactive protein locus influences gene expression and predisposes to systemic lupus erythematosus, *Hum Mol Genet* 13(1) (2004) 137-47.
- [14] W.H. Sheu, W.C. Wang, K.D. Wu, C.T. He, C.M. Hwu, T. Quertermous, W.S. Hsieh, W.J. Lee, C.T. Ting, Y.I. Chen, C.A. Hsiung, CRP-level-associated polymorphism rs1205

within the CRP gene is associated with 2-hour glucose level: The SAPPHIRe study, *Sci Rep* 7(1) (2017) 7987.

[15] H. Ablij, A. Meinders, C-reactive protein: history and revival, *Eur J Intern Med* 13(7) (2002) 412.

[16] M. Kaur, C-reactive Protein: A Prognostic Indicator, *Int J Appl Basic Med Res* 7(2) (2017) 83-84.

[17] J.E. Volanakis, Human C-reactive protein: expression, structure, and function, *Mol Immunol* 38(2-3) (2001) 189-97.

[18] F.G. Hage, A.J. Szalai, C-reactive protein gene polymorphisms, C-reactive protein blood levels, and cardiovascular disease risk, *J Am Coll Cardiol* 50(12) (2007) 1115-22.

[19] L. Marnell, C. Mold, T.W. Du Clos, C-reactive protein: ligands, receptors and role in inflammation, *Clin Immunol* 117(2) (2005) 104-11.

[20] D.A. Morrow, N. Rifai, E.M. Antman, D.L. Weiner, C.H. McCabe, C.P. Cannon, E. Braunwald, C-reactive protein is a potent predictor of mortality independently of and in combination with troponin T in acute coronary syndromes: a TIMI 11A substudy. *Thrombolysis in Myocardial Infarction*, *J Am Coll Cardiol* 31(7) (1998) 1460-5.

[21] G.J. Blake, P.M. Ridker, Novel clinical markers of vascular wall inflammation, *Circ Res* 89(9) (2001) 763-71.

[22] A.P. Doumatey, J. Zhou, A. Adeyemo, C. Rotimi, High sensitivity C-reactive protein (Hs-CRP) remains highly stable in long-term archived human serum, *Clin Biochem* 47(4-5) (2014) 315-8.

[23] S. Mora, K. Musunuru, R.S. Blumenthal, The clinical utility of high-sensitivity C-reactive protein in cardiovascular disease and the potential implication of JUPITER on current practice guidelines, *Clin Chem* 55(2) (2009) 219-28.

- [24] O. Yousuf, B.D. Mohanty, S.S. Martin, P.H. Joshi, M.J. Blaha, K. Nasir, R.S. Blumenthal, M.J. Budoff, High-sensitivity C-reactive protein and cardiovascular disease: a resolute belief or an elusive link?, *J Am Coll Cardiol* 62(5) (2013) 397-408.
- [25] B.C. Alves, T.R. Silva, P.M. Spritzer, Sedentary Lifestyle and High-Carbohydrate Intake are Associated with Low-Grade Chronic Inflammation in Post-Menopause: A Cross-sectional Study, *Rev Bras Ginecol Obstet* 38(7) (2016) 317-24.
- [26] L.H. da Silva, D.G. Panazzolo, M.F. Marques, M.G. Souza, B.D. Paredes, J.F. Nogueira Neto, L.M. Leão, V. Morandi, E. Bouskela, L.G. Kraemer-Aguiar, Low-dose estradiol and endothelial and inflammatory biomarkers in menopausal overweight/obese women, *Climacteric* 19(4) (2016) 337-43.
- [27] G.L. Myers, R.H. Christenson, M. Cushman, C.M. Ballantyne, G.R. Cooper, C.M. Pfeiffer, S.M. Grundy, D.R. Labarthe, D. Levy, N. Rifai, P.W. Wilson, N.L.C. Members, National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice guidelines: emerging biomarkers for primary prevention of cardiovascular disease, *Clin Chem* 55(2) (2009) 378-84.
- [28] P.M. Ridker, A Test in Context: High-Sensitivity C-Reactive Protein, *J Am Coll Cardiol* 67(6) (2016) 712-723.
- [29] L.M. Lima, N. Wiernsperger, L.G. Kraemer-Aguiar, E. Bouskela, Short-term treatment with metformin improves the cardiovascular risk profile in first-degree relatives of subjects with type 2 diabetes mellitus who have a metabolic syndrome and normal glucose tolerance without changes in C-reactive protein or fibrinogen, *Clinics (Sao Paulo)* 64(5) (2009) 415-20.
- [30] W. Koenig, Update on C-reactive protein as a risk marker in cardiovascular disease, *Kidney Int Suppl* (84) (2003) S58-61.
- [31] P.J. Tully, H. Baumeister, J. Bengel, A. Jenkins, A. Januszewski, S. Martin, G.A. Wittert, The longitudinal association between inflammation and incident depressive symptoms in men: the effects of hs-CRP are independent of abdominal obesity and metabolic disturbances, *Physiol Behav* 139 (2015) 328-35.

- [32] S. Devaraj, U. Singh, I. Jialal, Human C-reactive protein and the metabolic syndrome, *Curr Opin Lipidol* 20(3) (2009) 182-9.
- [33] J. Dupuis, M.G. Larson, R.S. Vasan, J.M. Massaro, P.W. Wilson, I. Lipinska, D. Corey, J.A. Vita, J.F. Keaney, E.J. Benjamin, Genome scan of systemic biomarkers of vascular inflammation in the Framingham Heart Study: evidence for susceptibility loci on 1q, *Atherosclerosis* 182(2) (2005) 307-14.
- [34] M.A. Wörns, A. Victor, P.R. Galle, T. Höhler, Genetic and environmental contributions to plasma C-reactive protein and interleukin-6 levels--a study in twins, *Genes Immun* 7(7) (2006) 600-5.
- [35] J. Wessel, G. Moratorio, F. Rao, M. Mahata, L. Zhang, W. Greene, B.K. Rana, B.P. Kennedy, S. Khandrika, P. Huang, E.O. Lillie, P.A. Shih, D.W. Smith, G. Wen, B.A. Hamilton, M.G. Ziegler, J.L. Witztum, N.J. Schork, G.W. Schmid-Schönbein, D.T. O'Connor, C-reactive protein, an 'intermediate phenotype' for inflammation: human twin studies reveal heritability, association with blood pressure and the metabolic syndrome, and the influence of common polymorphism at catecholaminergic/beta-adrenergic pathway loci, *J Hypertens* 25(2) (2007) 329-43.
- [36] A. Dehghan, J. Dupuis, M. Barbalic, J.C. Bis, G. Eiriksdottir, C. Lu, N. Pellikka, H. Wallaschofski, J. Kettunen, P. Henneman, J. Baumert, D.P. Strachan, C. Fuchsberger, V. Vitart, J.F. Wilson, G. Paré, S. Naitza, M.E. Rudock, I. Surakka, E.J. de Geus, B.Z. Alizadeh, J. Guralnik, A. Shuldiner, T. Tanaka, R.Y. Zee, R.B. Schnabel, V. Nambi, M. Kavousi, S. Ripatti, M. Nauck, N.L. Smith, A.V. Smith, J. Sundvall, P. Scheet, Y. Liu, A. Ruukonen, L.M. Rose, M.G. Larson, R.C. Hoogeveen, N.B. Freimer, A. Teumer, R.P. Tracy, L.J. Launer, J.E. Buring, J.F. Yamamoto, A.R. Folsom, E.J. Sijbrands, J. Pankow, P. Elliott, J.F. Keaney, W. Sun, A.P. Sarin, J.D. Fontes, S. Badola, B.C. Astor, A. Hofman, A. Pouta, K. Werdan, K.H. Greiser, O. Kuss, H.E. Meyer zu Schwabedissen, J. Thiery, Y. Jamshidi, I.M. Nolte, N. Soranzo, T.D. Spector, H. Völzke, A.N. Parker, T. Aspelund, D. Bates, L. Young, K. Tsui, D.S. Siscovick, X. Guo, J.I. Rotter, M. Uda, D. Schlessinger, I. Rudan, A.A. Hicks, B.W. Penninx, B. Thorand, C. Gieger, J. Coresh, G. Willemsen, T.B. Harris, A.G. Uitterlinden, M.R. Jarvelin, K. Rice, D. Radke, V. Salomaa, K. Willems van Dijk, E.

Boerwinkle, R.S. Vasan, L. Ferrucci, Q.D. Gibson, S. Bandinelli, H. Snieder, D.I. Boomsma, X. Xiao, H. Campbell, C. Hayward, P.P. Pramstaller, C.M. van Duijn, L. Peltonen, B.M. Psaty, V. Gudnason, P.M. Ridker, G. Homuth, W. Koenig, C.M. Ballantyne, J.C. Witteman, E.J. Benjamin, M. Perola, D.I. Chasman, Meta-analysis of genome-wide association studies in >80 000 subjects identifies multiple loci for C-reactive protein levels, *Circulation* 123(7) (2011) 731-8.

[37] C.C. Lee, N.C. You, Y. Song, Y.H. Hsu, J. Manson, L. Nathan, L. Tinker, S. Liu, Relation of genetic variation in the gene coding for C-reactive protein with its plasma protein concentrations: findings from the Women's Health Initiative Observational Cohort, *Clin Chem* 55(2) (2009) 351-60.

[38] J. Shen, J.M. Ordovas, Impact of genetic and environmental factors on hsCRP concentrations and response to therapeutic agents, *Clin Chem* 55(2) (2009) 256-64.

[39] N. Vinayagamorthy, H.J. Hu, S.H. Yim, S.H. Jung, J. Jo, S.H. Jee, Y.J. Chung, New variants including ARG1 polymorphisms associated with C-reactive protein levels identified by genome-wide association and pathway analysis, *PLoS One* 9(4) (2014) e95866.

[40] M.W. Miller, H. Maniates, E.J. Wolf, M.W. Logue, S.A. Schichman, A. Stone, W. Milberg, R. McGlinchey, CRP polymorphisms and DNA methylation of the AIM2 gene influence associations between trauma exposure, PTSD, and C-reactive protein, *Brain Behav Immun* 67 (2018) 194-202.

[41] G. Eiriksdottir, A.V. Smith, T. Aspelund, S.H. Hafsteinsdottir, E. Olafsdottir, L.J. Launer, T.B. Harris, V. Gudnason, The interaction of adiposity with the CRP gene affects CRP levels: age, gene/environment susceptibility-Reykjavik study, *Int J Obes (Lond)* 33(2) (2009) 267-72.