



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Bruno Cesar Ottoboni Luperini

**RELAÇÃO ENTRE A INGESTÃO DE MICRONUTRIENTES E
ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS E GENÔMICAS NA
OBESIDADE MÓRBIDA**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Daisy Maria Fávero Salvadori
Coorientador: Dr. João Paulo de Castro Marcondes

**BOTUCATU – SP
2016**

Bruno Cesar Ottoboni Luperini

**RELAÇÃO ENTRE A INGESTÃO DE MICRONUTRIENTES E
ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS E GENÔMICAS NA
OBESIDADE MÓRBIDA**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, para obtenção do
título de Doutor em Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Daisy Maria Fávero Salvadori

Coorientador: Dr. João Paulo de Castro Marcondes

BOTUCATU – SP

2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Luperini, Bruno Cesar Ottoboni.

Relação entre a ingestão de micronutrientes e alterações citogenéticas e genômicas na obesidade mórbida / Bruno Cesar Ottoboni Luperini. - Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Daisy Maria Fávero Salvadori

Coorientador: João Paulo de Castro Marcondes

Capes: 40105008

Palavras-chave: obesidade mórbida; suplementação nutricional; lesões gênicas; perfil inflamatório; expressão gênica.

...mas, às vezes, algo bem difícil nos é dado, e quando essa coisa difícil acontece conosco, é um desafio observarmos as oportunidades, e aprender alguma coisa que, às vezes, é dolorosa. Aprender a ter paciência, por exemplo. Nós ouvimos que a estrada para a paz não é uma corrida de velocidade, mas sim uma maratona. É preciso paciência. É difícil. Pode ser para lutar pela sua opinião, lutar pela sua convicção, pelos seus sonhos. Essa é uma oportunidade que nos é dada. Para aprender, para sofrer, para lutar, todas essas oportunidades nos são dadas, mas elas são oportunidades, e aqueles que se beneficiam dessas oportunidades são os mais fortes. Eles fazem algo com a vida. E aqueles que falham recebem outra oportunidade. Nós sempre recebemos outra oportunidade. Essa é a maravilhosa riqueza da vida. Como cada um de nós pode encontrar um método para viver em gratidão, não somente ser grato de vez em quando, mas ser grato em cada momento? É um método muito simples. É tão simples, que é na verdade o que nos foi dito na infância, quando aprendemos a atravessar a rua. Pare. Olhe. Siga. Isso é tudo. Porém passamos pela vida com pressa. Nós não paramos!!! Perdemos a oportunidade porque não paramos. Temos que parar e nos aquietar. E temos que construir placas de "pare" em nossas vidas. Quando você para, a próxima coisa é olhar. Você olha. Você abre os olhos. Você abre seus ouvidos. Você abre todos os seus sentidos para essa maravilhosa riqueza que nos é dada. Não há um fim para isso, e é disso que se trata a vida, aproveitar o que nos é dado.

David Steindl-Rast

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai Cristino Luperini e minha mãe Marcia Ottoboni Luperini e meu irmão Ricardo Luperini. Pessoas com as quais cresci aprendendo tudo que sei hoje. Com suas lições de vida, me fazendo o adulto que sou, sempre tentando ser um motivo de orgulho e aprendendo também a não perder a essência do viver de maneira simples, construindo meu caráter seguindo seus exemplos. Hoje, não quero lágrimas por mim. Não mais! Quero que compartilhem comigo a alegria dessa conquista, pois ela só foi possível graças ao apoio incondicional de vocês. Muitos foram os momentos em que meu desabafo estava velado e as preocupações foram divididas com cuidado, sempre procurando amenizar a ansiedade e os obstáculos. Vocês me deram forças para vencer e incentivos para prosseguir. O momento que vivo agora é único e só existe porque vocês se doaram em silêncio e aceitaram viver incondicionalmente comigo essa etapa da minha vida. Para vocês, com meu amor e minha gratidão, ofereço essa minha vitória.

Deus sabe o quanto a angústia das nossas escolhas nos persegue. Não há como fugir delas. Então, somente nos resta uma opção: escolher. Assim sendo, o melhor que podemos fazer é escolher bem, de forma correta. De boas escolhas nascem pessoas dignas. Todos vivemos para escolher e seguir no caminho escolhido. Em nossa profissão, como em nossas vidas, somente julgaremos bem se tivermos bons critérios próprios. Tais parâmetros tornam as escolhas menos difíceis. À Deus devemos nossos melhores critérios. A Ele devemos a concretização desses sonhos depois dessas escolhas. Não fosse por Ele intercedendo em nossas decisões, não estaríamos aqui, hoje. Ele, que está sempre a nos lembrar do princípio do livre arbítrio, e que delega a esse princípio a função de nos tornarmos donos de nossa própria história, e que sempre nos dá uma aula de aceitação sem limites nem imposições.

E lá se foram quatro anos. Hoje mais do que nunca posso dizer que tenho muito a agradecer.

Não foi fácil, tampouco simples chegar até aqui. Sou grato a muitas pessoas e muitas situações com as quais cresci, evolui e aprendi a valorizar, aceitar, entender e principalmente a ter calma, fé e acreditar que as coisas sempre podem melhorar.

Agradeço todas as mulheres que participaram desse estudo e tornaram esse projeto possível.

A vocês, desejo toda a sorte do mundo.

Dra. Daisy Maria Fávero Salvadori, minha orientadora, obrigado por acreditar em mim e dar o *start* na vida que escolhi seguir. Você sempre foi o meu maior exemplo. Sempre correta e dedicada. Sua conduta e forma de acolher seus alunos é incomparável. Agradeço pela confiança total, pelas palavras de incentivo e ensinamentos que sempre me impulsionaram. Palavras muitas vezes firmes, com muitos puxões de orelha, porém fundamentais para continuar.

Dr. José Ignacio Riezu, Dr. Fermin Milagro Yoldi, Dr. J. Alfredo Martínez Hernández y la Universidad de Navarra, gracias por guiarme y por compartir ante mí vivencias únicas y enseñanzas magníficas, quiero expresar mis más sinceros sentimientos de gratitud y mis infinitas gracias.

Ao Dr Irineu Rasera Junior, Patrícia Fátima Sousa Novais, Flávia Andréia Marin e a toda equipe da Clínica Bariátrica, pela participação essencial na coleta de material e informações clínicas, pela parceria e disponibilidade que contribuíram para a execução desse trabalho.

Ao Dr Celso Vieira de Souza Leite e à Prof Dra Maria Rita Marques de Oliveira, pela colaboração e contribuições fundamentais no trabalho.

Ao Departamento de Patologia e à Vânia Soler pela competência, profissionalismo e apoio em todo esse processo.

Ao Grupo de Apoio à Pesquisa e ao José Eduardo Corrente por todo suporte para a conclusão desse trabalho.

Ao CNPQ e FAPESP por acreditarem no potencial do nosso estudo e pelo suporte financeiro.

Bruna Viana, minha melhor amiga, minha irmã que pude escolher. Obrigado por tudo! Pela paciência, pelo apoio e pelas palavras sempre coerentes na hora certa. Passe o tempo que for, nada muda... Nunca!

Marta Martínez Sáez la vida me dio la oportunidad de conocer y de encontrar en ti a una amiga sin igual, sincera y que siempre da lo mejor de sí misma. Por eso estoy orgulloso de ser tu amigo y espero que nuestra amistad siga fortaleciéndose con el paso del tiempo.

Gracias por escucharme, comprenderme, aconsejarme y hacerme reír cuando más lo necesito, no importa que tan lejos (todo un océano) o cerca estuviéramos.

Celina Oliveira e Letuza Marques, ter vocês ao meu lado é sempre um prazer. As conversas, as risadas e toda a companhia sempre maravilhosa.

Elaine Camargo sem dúvida passamos por muitas! Que bom poder contar contigo sempre. Pra tudo e em todas as horas. Sempre pronta para ouvir e acolher tudo com carinho.

Ao Renato Paschoal Prado e Joara de Paula Campos agradeço muito toda a colaboração e a oportunidade de aprender coisas novas. Mais do que colegas de trabalho, vocês se tornaram amigos, presentes e parceiros em todas as horas. Obrigado por toda a ajuda, pela companhia e amizade sempre.

João Paulo Marcondes, obrigado pela coorientação e por todos os momentos vividos, bons ou menos bons e por toda a sua ajuda e seu apoio, orientando e compartilhando seu conhecimento e amizade.

Juliana Padovani, não teria palavras suficientes para dizer o quanto é bom poder ter você em minha vida. Uma pessoa incrível, com um coração lindo.

Raphael Toledo, Tathiana Dorini, Gabriela Bittencourt, Pablo Bertolini e Jhennifer Rebecca. Sou muito grato por tê-los como amigos dentro e fora do laboratório. Obrigado pelas conversas, pelos cafés, pelos sorrisos sempre espontâneos e pela companhia de sempre.

Obrigado à Danielle Almeida por somar comigo as alegrias, dificuldades e colher os frutos dos nossos projetos.

Marilia Porto, que mesmo de longe, e sem ver (dessa vez) o dia virar noite, esteve presente. Sempre comigo, me apoiando e me fazendo acreditar que ter fé e lutar é fundamental e rende bons frutos! Muita saudade!

Amanda Garcia, te conhecer foi um presente, uma surpresa! Que bom que te encontrei. Que bom que a vida me deu você para dividir tudo sempre.

José Luiz Alves agradeço por todo o incentivo ao longo desse tempo. Obrigado pelas palavras sempre sinceras e que sempre me deram força para continuar.

André Sávio, Mário Botasso, Fábio Fernandes e Leonardo Menezes, obrigado pela força e companheirismo.

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO

1.1 - Considerações iniciais	1
1.2 - O tecido adiposo	2
1.3 - Obesidade e alterações genéticas	5
1.4 - Obesidade e suplementação nutricional	8
1.5 - Cirurgia bariátrica.....	11

II. OBJETIVO

2.1 - Objetivos específicos	14
-----------------------------------	----

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - População do estudo.....	15
3.2 - Suplementação nutricional	16
3.3 - Coleta de material biológico	16
3.4 - Isolamento de células mononucleares	17
3.5 - Extração e quantificação de RNA.....	17
3.6 - cDNA <i>microarray</i>	17
3.7 - Teste do Cometa	18
3.8 - Teste do Micronúcleo	19
3.9 - Perfil de citocinas	20
3.10- Análise estatística	20

IV. RESULTADOS

4.1 - Caracterização da população estudada	22
4.2 - Danos genéticos (Teste do cometa e teste do micronúcleo).....	23

4.3 - Níveis plasmáticos de citocinas	24
4.4 - Expressão gênica	26
V. DISCUSSÃO	36
VI. CONCLUSÃO	47
X. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
XI. ANEXOS	67

RESUMO

A obesidade é uma desordem multifatorial que envolve agentes hereditários, ambientais e estilo de vida, e suas consequências não são apenas sociais ou psicológicas, mas estão também relacionadas à presença de comorbidades como hipertensão arterial, diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e vários tipos de câncer. Considerando que as alterações genéticas relacionadas à obesidade não são totalmente conhecidas, assim como não se sabe a possível ação da suplementação nutricional sobre tais alterações, o presente estudo teve como objetivo avaliar a relação entre a ingestão de micronutrientes, alterações genéticas e perfil inflamatório em um grupo de 30 mulheres com obesidade mórbida, com idade entre 20 e 45 anos e submetidas à cirurgia bariátrica. A suplementação nutricional consistiu da ingestão (pó diluído em água) de vitaminas e micronutrientes correspondentes a duas *DRI*s (Ingestão Dietética de Referência) por dia, durante 10 semanas antes e 24 após a cirurgia bariátrica. O total de 30 mulheres eutróficas saudáveis, não fumantes e pareadas por idade às obesas, constituiu o grupo de referência. Todos os parâmetros avaliados nas mulheres obesas foram mensurados em três momentos: antes da suplementação nutricional (M1); 8 semanas após o início da suplementação e uma semana antes da cirurgia bariátrica (M2); e seis meses após o procedimento cirúrgico (M3). Os testes do cometa e do micronúcleo foram utilizados para medir, respectivamente, os níveis de danos primários no DNA e as frequências de alterações citogenéticas em células do sangue periférico. As mulheres obesas, nos três momentos mensurados, apresentaram maiores níveis ($p < 0,05$) de danos no DNA que as eutróficas (grupo controle). No entanto, seis meses após a cirurgia bariátrica, foi significativa a redução dos danos, quando consideradas apenas as obesas, muito embora os níveis não voltassem a atingir valores próximos ao do grupo controle. Frequências aumentadas de células micronucleadas foram detectadas nas mulheres obesas antes da cirurgia bariátrica em relação às eutróficas. Contudo, seis meses após a cirurgia a frequência diminuiu significativamente, ficando semelhante à do grupo controle. Diminuições significativas de citocinas inflamatórias foram observadas nas mulheres obesas, tanto após o início da suplementação de micronutrientes, como após a cirurgia. A avaliação do perfil de expressão gênica pela técnica de microarranjos de DNA mostrou que as mulheres obesas, antes da suplementação nutricional, apresentavam hiperexpressão de genes relacionados a vias de metabolismo energético e lipídico e perfil inflamatório. Após a suplementação, foram observadas modificações no perfil de expressão desses genes, além da modulação de genes de vias

como viabilidade celular e reparo de DNA. Por outro lado, após o procedimento cirúrgico e a concomitante suplementação nutricional ocorreu modulação de genes envolvidos em vias de metabolismo energético e processos inflamatórios, possivelmente devido à significativa perda de peso e consequente diminuição do IMC. Concluindo, do ponto de vista genético, este estudo demonstrou a importância da suplementação nutricional em mulheres com obesidade mórbida, antes e após a cirurgia bariátrica, embora não tivesse sido possível discriminar a extensão dos seus efeitos frente à perda de peso ocorrida após o procedimento cirúrgico.

Palavras chave: obesidade mórbida, suplementação nutricional, lesões gênicas, perfil inflamatório, expressão gênica.

ABSTRACT

Obesity is a complex disease that originates from a combination of social, environmental and genetic factors. Furthermore, it is associated with comorbidities such as hypertension, type 2 diabetes, heart disease and various types of cancers. Since the relationship among genetic alterations, nutritional supplementation and obesity are not fully understood, this study aimed to evaluate the effects of micronutrient intake on genetic and inflammatory profile in a group of 30 morbidly obese women, aged between 20 and 45 years and undergoing bariatric surgery. The nutritional intervention consisted of two recommended dietary allowance (RDA) of vitamins and micronutrients per day, for 10 weeks before and 24 after the bariatric surgery. A total of 30 healthy normal-weight, non-smokers and matched for age to the obese women were recruited as a control group. All the checked end-points in obese the women were measured at three moments: before nutritional supplementation (M1); 8 weeks after beginning of supplementation and one week before bariatric surgery (M2); and six months after surgery with simultaneous nutritional supplementation (M3). The comet and micronucleus tests were used to measure the levels of primary DNA damage and the frequency of cytogenetic changes in peripheral blood cells, respectively. Obese women at the three measured moments, presented higher levels ($p < 0.05$) of DNA damage than the control group. However, six months after the bariatric surgery the genetic damage was significantly reduced compared to the obese women before nutritional supplementation, but the amount did not reached the control group level. Similarly, increased frequencies of micronucleated cells were detected in obese women before bariatric surgery compared to the control group. However, six months after surgery this frequency decreased significantly, being similar to that in the control group. Significant reduction of inflammatory cytokines was observed in obese women after four weeks after the beginning of nutritional, as well as after surgery. Gene expression profiling was investigated using DNA microarrays. Data showed upregulation of genes related to energy and lipid metabolism, and also to inflammatory pathways in obese women before nutritional supplementation. Changes in these gene expression and also modulation of gene associated to cell viability and DNA repair pathways were observed after the nutritional supplementation. Six month after the surgical procedure and nutritional supplementation genes involved in energy metabolism and inflammatory pathways were modulated, probably due to the significant weight loss. In conclusion, this study showed the importance of

nutritional supplementation, both before and after bariatric surgery. However, it was not possible to distinguish the extension of its effects after surgery because of the weight loss.

Key words: morbid obesity, nutritional supplementation, DNA damage, inflammatory profile.

I – INTRODUÇÃO

1.1 Considerações iniciais

A obesidade é uma doença crônica multifatorial, caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal, derivada do desequilíbrio energético, no qual a ingestão excede o gasto de energia. Fatores genéticos (polimorfismos, alterações transcricionais) e epigenéticos (metilação do DNA, RNAs não codificadores) atuam de maneira integrada e dinâmica com fatores ambientais e, assim, contribuem para o estabelecimento e perpetuação do fenótipo da obesidade (Palou & Bonet, 2013; Henninger *et al.*, 2014; Vuillaume *et al.*, 2014; Huang & Hu, 2015). O consumo de alimentos com alta densidade calórica, no qual há ingestão de quantidades de proteínas, carboidratos e gordura além das recomendadas, associado à redução dos níveis de atividade física, se mostram como importantes fatores ambientais causadores do aumento da prevalência de indivíduos obesos (Keith *et al.*, 2006).

Apesar do grande número de estudos que identificaram variantes genéticas específicas em indivíduos obesos, está bem estabelecido que apenas tais componentes não resultam em obesidade sem que também haja exposição a um ambiente obesogênico (Fraser *et al.*, 2009). Os fatores genéticos e variantes gênicas (por ex., SNPs - *Single-nucleotide polymorphism*; polimorfismo de base única) podem determinar a susceptibilidade de um indivíduo à obesidade por meio de uma série complexa de mecanismos que regem vias e sistemas reguladores em diferentes níveis, incluindo a ingestão e gasto de energia e o controle e distribuição de nutrientes entre tecido adiposo e massa magra. Além disso, vale ressaltar que muitas doenças humanas são inteira ou parcialmente causadas por agentes químicos ambientais, os quais podem levar a modificações genéticas e/ou epigenéticas no genoma. No entanto, apesar das modificações epigenéticas, o estilo de vida, hábitos alimentares e agentes ambientais também podem afetar fatores de transcrição celular,

hormônios, mecanismos inflamatórios e microbiota, contribuindo, consideravelmente, para a epidemia de obesidade observada atualmente (Stienstra *et al.*, 2006; Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009; Jin-Qiang *et al.*, 2009; Giovanni *et al.*, 2010; Greiner & Bäckhed, 2011).

A obesidade é considerada importante causa de mortalidade, além de representar uma séria ameaça à saúde, pois está associada ao aumento de risco para o desenvolvimento de diversas comorbidades, como o diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares, síndrome metabólica, hipertensão, infarto e alguns tipos de câncer (Frayling *et al.*, 2007; Imes & Burke, 2014). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (WHO) a obesidade atingiu proporções epidêmicas em todo o mundo, sendo responsável, direta ou indiretamente, por pelo menos 3,4 milhões de mortes a cada ano. Antes associada a países desenvolvidos, a obesidade é hoje também prevalente em países em desenvolvimento, se tornando um problema de saúde pública (WHO, 2015).

O Índice de Massa Corporal (IMC) é o parâmetro comumente utilizado para classificar o grau de obesidade individual. O cálculo leva em conta o peso e a altura (kg/m^2), de modo que indivíduos com IMC acima de $24,9 \text{ kg}/\text{m}^2$ são classificados como tendo excesso de peso, e aqueles com IMC acima de $30 \text{ kg}/\text{m}^2$ são considerados obesos (Bastien *et al.*, 2014).

1.2 – O tecido adiposo

O tecido adiposo desempenha papel primordial na manutenção da homeostase energética, sendo o principal responsável pelo armazenamento e mobilização de energia no organismo. A expansão do tecido adiposo observada na obesidade ocorre por meio de dois processos concomitantes: hipertrofia (aumento do tamanho) e hiperplasia (aumento do número) dos adipócitos. Atualmente, no entanto, é de conhecimento que o tecido adiposo

também desempenha papel importante como órgão endócrino altamente funcional, sendo, em pessoas obesas, uma fonte de sinalização pró-inflamatória com impacto sistêmico (Murdolo *et al.*, 2013; Le Lay *et al.*, 2014; McGown *et al.*, 2014).

De fato, sabe-se que a obesidade é um estado inflamatório de baixa intensidade, derivado da produção de diversas citocinas (ou adipocinas) pelo tecido adiposo, as quais, além de estarem envolvidas no processo inflamatório, também exercem efeitos sistêmicos em órgãos como fígado, pâncreas, coração, articulações e no sistema nervoso central (Lopes, 2007; Weiss, 2011; Hall *et al.*, 2014). O processo inflamatório observado na obesidade inclui a ativação de diversas células do sistema imunológico (macrófagos, monócitos e neutrófilos), e é desencadeado pela expansão e hipóxia do tecido adiposo (Masoodi *et al.*, 2015). Embora os mecanismos moleculares não estejam completamente elucidados, a hipóxia é considerada como o principal evento desencadeador do processo inflamatório, embora, na ausência do fornecimento de nutrientes, a hipertrofia pode provocar necrose dos adipócitos e a liberação de seus conteúdos para o espaço extracelular, com consequente resposta inflamatória (Cancello *et al.*, 2005; Skurk *et al.*, 2007; O'Rourke *et al.*, 2011).

Dentre os hormônios sintetizados e secretados pelo tecido adiposo, a leptina, a resistina, a adiponectina, algumas citocinas inflamatórias, como a interleucina 6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral α (TNF- α), e atinflamatórias, como a interleucina 10 (IL-10), podem, dentre outras funções, influenciar a homeostase energética, o metabolismo lipídico e da glicose, a homeostase vascular, a resposta imune e funções vasculares e de coagulação do organismo. Recentemente, foi verificado que a IL-6, o TNF- α e a leptina desempenham papel importante no desenvolvimento da obesidade. Assim, o aumento do tecido adiposo e da secreção de citocinas inflamatórias têm efeitos pleiotrópicos nos eventos

endócrinos e metabólicos, os quais podem contribuir para a patogênese das comorbidades relacionadas à obesidade (Galic *et al.*, 2010; Singla *et al.*, 2010; Romacho *et al.*, 2014).

Além das adipocinas, também se observa no tecido adiposo a superprodução de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs), as quais danificam/alteram estruturas celulares e macromoléculas, fatos que podem resultar no desenvolvimento de outras anomalias (Fernández-Sánchez *et al.*, 2011). É de amplo conhecimento, que os radicais livres são moléculas reativas, com capacidade de interagir com proteínas, carboidratos e com o DNA e induzir alterações genéticas capazes de provocar importantes mudanças fenotípicas no nível celular e tecidual, impactando sobre importantes vias metabólicas (Sahaf *et al.*, 2005; Cerdá *et al.*, 2014; Le Lay *et al.*, 2014). Há várias evidências que demonstram, por exemplo, que quando a taxa de danos excede a capacidade de reparo do DNA, podem ocorrer mudanças fundamentais no desenvolvimento e função celular, resultando em envelhecimento acelerado e/ou perda do potencial regenerativo. De fato, o aumento da instabilidade cromossômica e defeitos nos sistemas de reparo do DNA estão sendo cada vez mais associados a doenças crônico-degenerativas, além de doenças relacionadas a disfunções imunológicas, cardiovasculares e neurológicas (Fenech, 2010). Além dos danos promovidos diretamente na molécula de DNA, as EROs e ERNs podem ativar fatores de transcrição (NF- κ B e AP1), ou modular as atividades de várias proteínas quinases e fosfatases, resultando em mudanças na expressão de vários genes, dentre os quais os que codificam citocinas pró-inflamatórias, proteínas relacionadas ao processo apoptótico e enzimas antioxidantes (Morgan & Liu, 2011; Marinho *et al.*, 2014).

1.3 - Obesidade e alterações genéticas

Inúmeros estudos relacionam alterações genéticas a diversas enfermidades. No entanto, embora pouco explorados alguns relacionam eventos genéticos e genômicos ao processo inflamatório de baixo grau observado em indivíduos com obesidade mórbida. Segundo Karbownik-Lewinska *et al.* (2012), tanto o processo de peroxidação lipídica como a concentração da 8-OHdG (8-hidroxideoxiguanosina, importante biomarcador de dano oxidativo no DNA) estão positivamente correlacionados ao IMC, pressão arterial, circunferência de cintura/quadril e proteína C reativa. Em estudo anterior, realizado com pacientes diabéticos e pré-diabéticos, também foi observada correlação positiva entre os níveis da 8-OHdG e o IMC (Al-Aubaidy *et al.*, 2011). Recentemente, Karaman *et al.* (2015) relataram que pacientes com síndrome metabólica apresentavam aumento de danos no DNA e da frequência de linfócitos micronucleados e correlação positiva entre esses eventos genéticos e a circunferência da cintura e IMC. Da mesma forma, Luperini *et al.* (2015) encontraram níveis aumentados de danos oxidativos no DNA em indivíduos com obesidade mórbida, além de uma associação positiva do alelo A do gene FTO e maiores níveis de lesões gênicas.

A identificação dos fatores moleculares subjacentes aos distúrbios metabólicos observados na obesidade pode fornecer informações relevantes sobre a complexa rede de eventos associados à essa disfunção, além de auxiliar na caracterização da resposta individual diante a determinada intervenção nutricional ou tratamento cirúrgico e medicamentoso (Zduńczyk & Pareek, 2009). A utilização de tecnologias que permitem o estudo da expressão global e caracterização de produtos gênicos, suas funções fisiológicas e possíveis interações, são úteis para esclarecer como micronutrientes podem interagir com o genoma, atuando na manutenção da homeostase do organismo, ou contribuindo para o

desenvolvimento de doenças. A técnica dos microarranjos (*microarrays*) de DNA, por exemplo, vem sendo amplamente utilizada para a análise da expressão simultânea de um grande número de genes, fornecendo um panorama abrangente para a compreensão dos mecanismos moleculares que controlam a resposta celular e fisiológica frente a uma variedade de estímulos estressores, e sobre as variações nos padrões e interações complexas entre genes e nutrientes (Zduńczyk & Pareek, 2009). Contudo, pouco se sabe sobre a expressão de genes específicos em resposta a intervenções dietéticas e, menos ainda, sobre o perfil de expressão gênica global. A magnitude dos dados gerados tem sido desconcertante, e é cada vez mais consenso que o significado funcional e fisiológico das alterações na expressão gênica pode ser melhor compreendido examinando-se a modulação coordenada de grupos de genes que atuam em vias específicas (Rendo-Urteaga *et al.*, 2015).

No caso da obesidade, a maioria dos genes estudados parece regular eventos que ocorrem no sistema nervoso central, como apetite e saciedade (Llewellyn & Wardle, 2015). Além disso, a associação entre estudos que buscam identificar a arquitetura genética individual e a expressão gênica em larga escala, podem auxiliar na identificação de genes que predispõem os indivíduos à obesidade. Vários estudos que utilizaram a técnica dos microarranjos de DNA investigaram genes diferencialmente expressos em indivíduos com peso normal e obesos, e indivíduos obesos antes e após processo de perda de peso (Kolehmainen *et al.*, 2008; Bouchard *et al.*, 2010; Márquez-Quiñones *et al.*, 2010). Clément *et al.* (2004), por exemplo, avaliaram o perfil de expressão gênica em mulheres obesas antes e após serem submetidas a restrição calórica, e observaram que a perda de peso levou à regulação de uma grande variedade de moléculas relacionadas à inflamação no tecido adiposo. Além disso, a perda de peso reduziu a expressão de genes de vias relacionadas ao

processo inflamatório no tecido adiposo (*IL-12* e *MCP1*) e levou ao aumento da expressão de moléculas com propriedades anti-inflamatórias (*IL-10* e *IL-1 RA*).

Com o avanço da tecnologia, a avaliação da expressão gênica por microarranjos de DNA forneceu importantes informações para o entendimento da obesidade e comorbidades associadas. Estudo realizado em 2008 por MacLaren *et al.* utilizando tecido adiposo de dois grupos de indivíduos obesos (sensíveis e resistentes à insulina), mostrou que as atividades dos genes *IKK β* (relacionado à aterosclerose e à obesidade) e *JNK* (relacionado à apoptose celular) foram significativamente maiores em indivíduos obesos resistentes à insulina, e que essas mudanças foram mais acentuadas no tecido adiposo visceral do que no tecido adiposo subcutâneo. Em outro estudo, foi observado que antes do procedimento de redução de estômago, o gene da adiponectina (*ADIPOQ*) apresentava expressão 3,12 vezes menor em pacientes obesos diabéticos em comparação ao grupo controle. No entanto, no pós-operatório, os mesmos pacientes apresentaram expressão 2,79 vezes maior do *ADIPOQ* em comparação ao grupo controle (Hindle *et al.*, 2010). Mais tarde, esses autores observaram que após cirurgia bariátrica, pacientes diabéticos apresentavam diminuição na expressão dos genes da leptina e resistina e que tal modulação estaria relacionada à resolução do diabetes e variaria de acordo com o peso perdido e o tipo de procedimento realizado (Edwards *et al.*, 2011).

De um modo geral, a manutenção do peso é uma tarefa difícil, mas importante para os efeitos benéficos da cirurgia bariátrica. Assim, torna-se também relevante conhecer os genes relacionados à regulação de processos associados à perda de peso (Johansson *et al.*, 2012). Sabe-se que o metabolismo de nutrientes e a homeostase energética são rigorosamente controlados por vários sistemas que envolvem fatores de transcrição específicos, e que, além disso, existe uma série de receptores expressos no trato

gastrointestinal, glândulas endócrinas e tecido adiposo, dentro os quais se destacam receptores de nutrientes e derivados metabólicos (*GPR41*, *GPR43*, *FXR*, *TGR5*); receptores de hormônios gastrointestinais (*CCKAR*, *CCKBR*, *GIPR*, *GLP1R*) e receptores de neuropeptídios (*NTSR1*, *ADCYAP1R1*, *VIPR1*, *VIPR2*), os quais podem atuar como sensores que modulam as funções destes órgãos, dependendo da situação metabólica individual. Assim, a expressão desses genes relativos a tais sensores metabólicos em células do sistema imunológico, pode, também, contribuir para a regulação das funções imunológicas e para a patogênese do processo inflamatório de baixo grau observado na obesidade (Pivovarova *et al.*, 2015).

Embora já tenham sido realizados estudos relacionando a suplementação nutricional, estresse oxidativo e modificações genômicas a diversas enfermidades, são ainda escassas informações associadas à obesidade mórbida. Portanto, o presente estudo foi delineado nessa direção, visando gerar conhecimentos que possam contribuir para o esclarecimento da complexa rede de eventos moleculares associados à obesidade, os quais, no futuro, possam ser utilizados para o estabelecimento de estratégias terapêuticas e de prevenção dessa disfunção orgânica.

1.4 - Obesidade e suplementação nutricional

A manutenção da saúde exige dieta equilibrada, composta por uma mistura complexa de macro e micronutrientes essenciais. Assim, determinar a composição dos alimentos e entender como podem interagir no e com o organismo e modular a saúde, são ações importantes para a prevenção e o tratamento de doenças. Nesse contexto, o uso de técnicas de biologia molecular nas pesquisas nas áreas da Medicina e da Nutrição deu origem a novo o campo da ciência, a Nutrigenômica (Masotti *et al.*, 2010).

A Nutrigenômica introduziu perspectiva inovadora nas recomendações nutricionais, que passam a ser individualizadas e influenciadas por características genéticas. Por meio de análises moleculares, esse novo campo da ciência vem gerando conhecimento sobre como os alimentos e micronutrientes podem interagir com o genoma e como o organismo responde a tais interações (Liu & Qian, 2011; Dauncey, 2012; Cozzolino & Cominetti, 2013; Cruz *et al.*, 2013; Sales *et al.*, 2014). Sabe-se que a resposta do organismo frente a ação de componentes bioativos dos alimentos é dependente da arquitetura genética individual. Por outro lado, tais componentes podem modificar a estrutura (compactação da cromatina) e a atividade (expressão ou repressão gênica) do genoma por meio de vários mecanismos, como a metilação do DNA, a acetilação e metilação de proteínas etc. (Farhud *et al.*, 2014).

Desde a última década, estudos de Nutrigenômica têm sido especialmente direcionados para disfunções orgânicas e doenças crônico-degenerativas (Sales *et al.*, 2014). No caso da obesidade, a adequação da ingestão de micronutrientes não é importante apenas para a manutenção da saúde, mas, também, para alcançar o máximo sucesso na manutenção da perda de peso em longo prazo. Além disso, os metabólitos provenientes dos micronutrientes ingeridos podem trazer benefícios à regulação da saciedade, absorção, taxa metabólica, metabolismo lipídico e de carboidratos, funções da tireóide e glândulas supra-renais, armazenamento de energia, homeostase da glicose, atividades neurais, dentre outros (Aills *et al.*, 2008). Muitos indivíduos obesos apresentam, antes e após a cirurgia bariátrica, deficiências nutricionais de vitamina D, ácido fólico, vitamina B12, entre outras, sendo que as principais complicações podem permanecer por mais de 20 anos após a cirurgia. Estima-se que aproximadamente 30% dos pacientes submetidos à cirurgia irão desenvolver alguma complicação relacionada à nutrição em algum momento após o procedimento cirúrgico. Por esta razão, a avaliação (incluindo níveis séricos de vitaminas e minerais) e a suplementação

nutricional devem ser realizadas antes da cirurgia, a fim de evitar, retardar ou minimizar o desenvolvimento de complicações no período pós-operatório (Bal *et al.*, 2011; Bordalo *et al.*, 2011).

As principais complicações relacionadas à falta de nutrientes em pacientes submetidos à cirurgia bariátrica incluem a anemia (ferro, ácido fólico, vitaminas B12, A, E, cobre e zinco), a doença metabólica óssea (cálcio, vitamina D), a desnutrição protéico-calórica, a esteatorréia, a encefalopatia de Wernicke (tiamina), a polineuropatia e miopatia (tiamina, cobre, vitaminas B12 e E), distúrbios visuais (vitaminas A e E, tiamina) e erupções cutâneas (zinco, ácidos graxos essenciais, vitamina A). A etiologia dessas deficiências é de origem multifatorial, com contribuições provenientes da ingestão dietética reduzida, escolhas alimentares alteradas e da má absorção (Fujioka *et al.*, 2011). Devido à persistência, ou até mesmo ao agravamento das deficiências nutricionais no período pós-operatório, é fundamental garantir um estado nutricional ideal, com rotina de triagem seguindo recomendações adequadas de suplementação (Toh *et al.*, 2009). A prescrição de suplementos de vitaminas e minerais é amplamente indicada, embora não existem dados na literatura sobre composição e dosagem adequadas e específicas para pacientes submetidos à cirurgia bariátrica (Bloomberg *et al.*, 2005; Gasteyger *et al.*, 2008).

Embora não haja consenso sobre o nível de micronutrientes necessário para prevenção de danos genéticos, admite-se que uma dieta balanceada, com consumo adequado de frutas e vegetais, associada a estilo de vida saudável, desempenham papel importante para um metabolismo celular eficiente e para a proteção contra lesões no DNA (Ferguson, 2002; Prado *et al.*, 2010). Nesse sentido, intervenções nutricionais que atenuem os eventos biológicos relacionados, por exemplo, ao estresse oxidativo oriundo do processo inflamatório, podem ser importantes estratégias em termos de saúde pública para a

prevenção de comorbidades associadas à obesidade (Garcia-Bailo *et al.*, 2011; Harvie *et al.*, 2011). No entanto, segundo Gasteyger *et al.* (2008), apenas a suplementação de rotina com um complexo multivitamínico padrão não impede a ocorrência de deficiências nutricionais observadas após a cirurgia bariátrica. Assim, os autores sugerem, que seja implementado acompanhamento rigoroso dos pacientes no pós-operatório, a fim de detectar as deficiências mais frequentes, que geralmente incluem as vitaminas B-12 e D, ferro, cálcio e ácido fólico.

1.5 Cirurgia bariátrica

Embora os medicamentos antiobesogênicos sejam efetivos para a redução de peso em curto prazo, podem induzir efeitos adversos como a hipertensão, insônia, náusea, dores de cabeça, arritmia e boca seca (Bray & Ryan, 2014; Patel, 2015). Com isso, a cirurgia bariátrica vem sendo considerada como alternativa relevante para o tratamento da obesidade mórbida, uma vez que o paciente perde de 30% a 40% do peso corpóreo (Adams *et al.*, 2007; Gloy *et al.*, 2013). Contudo, as diferentes técnicas cirúrgicas têm também apresentado complicações associadas. As alterações de anatomia e fisiologia gastrointestinal que promovem a perda de peso, ocasionalmente podem induzir desequilíbrios nutricionais devido à ingestão diminuída ou perdas nutricionais excessivas secundárias à reconfiguração da motilidade gastrointestinal, do espaço de armazenamento, pH e perfil enzimático (Dalcanale *et al.*, 2010; Buchwald *et al.*, 2011).

Dentre os principais procedimentos bariátricos, destacam-se a derivação gástrica em Y de Roux (DGYR), a banda gástrica ajustável e o *sleeve* gástrico (Buchwald & Oien, 2013). Na técnica de derivação gástrica em Y de Roux (**Figura 1**), ocorre uma diminuição drástica do estômago, com redução em torno de 15-30 ml do seu volume original e consequente diminuição da absorção do conteúdo ingerido, incluindo vitaminas e sais

minerais. Além disso, o duodeno e uma pequena parte do jejuno proximal são excluídos do processo digestivo e absorptivo (Olbers *et al.*, 2003; Manning *et al.*, 2015). Apesar de ser considerado um método seguro e eficaz, os resultados da DGYR variam consideravelmente entre os pacientes. Uma pequena, mas significativa proporção dos pacientes submetidos a esse tipo de cirurgia tem perda de peso abaixo do ideal e até mesmo recuperação significativa do peso (Kalarchian *et al.*, 2014). Contudo, apesar desse aparente “insucesso”, a maioria dos pacientes com diabetes, hiperlipidemia, hipertensão, alterações metabólicas, cardiovasculares e problemas respiratórios, apresentam melhora substancial dessas comorbidades após a cirurgia (Chang *et al.*, 2014).

Os reflexos da cirurgia bariátrica podem estender-se a vários órgãos e/ou processos fisiológicos, tais como a secreção de hormônios gastrointestinais, gasto energético, a colonização bacteriana intestinal e o metabolismo de ácidos biliares (Mattar *et al.*, 2005). Além disso, foram também relatadas alterações moleculares (na expressão gênica) relacionadas a esse procedimento cirúrgico, embora os mecanismos sejam menos óbvios e pareçam contribuir para os efeitos benéficos da cirurgia (Maggard *et al.*, 2005; Miras & le Roux, 2013; Kalarchian *et al.*, 2014). Assim, considerando que a cirurgia bariátrica *per se* pode desencadear alterações nutricionais e metabólicas, esta opção de tratamento é indicada apenas a pacientes que apresentam comorbidades associadas, que estão muito acima do peso e que não obtiveram sucesso na perda de peso por meio de abordagens não cirúrgicas (Fujioka *et al.*, 2011).

Derivação gástrica em Y de Roux

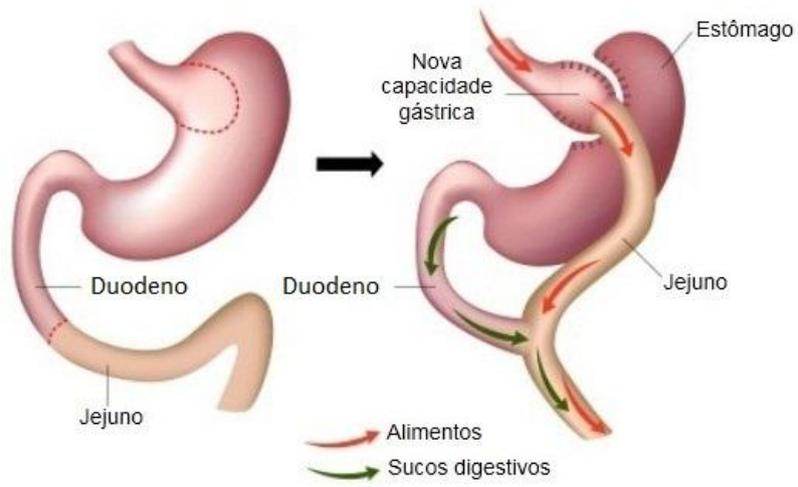


Figura 1. Derivação gástrica em Y de Roux (adaptado de <http://www.bariatric-surgery-source.com/types-of-bariatric-surgery.html>)

II - OBJETIVOS

Este estudo teve como principal objetivo avaliar, em mulheres com obesidade mórbida, o efeito da suplementação de micronutrientes sobre marcadores genéticos, genômicos e inflamatórios, antes e após a realização de cirurgia bariátrica.

Objetivos específicos

- ✓ Avaliar e comparar o nível de danos primários no DNA (teste do cometa) e de alterações cromossômicas (teste do micronúcleo) em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs - *Peripheral blood mononuclear cells*) antes e após a cirurgia bariátrica;
- ✓ comparar o perfil de citocinas plasmáticas circulantes antes e após suplementação nutricional e antes e após cirurgia bariátrica;
- ✓ analisar o perfil de expressão gênica, antes e após suplementação nutricional e antes e após cirurgia bariátrica;

III - MATERIAL E MÉTODOS

III.1- População do estudo

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina – UNESP, Botucatu – SP – Brasil (**ANEXO I**). Todos os voluntários assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**ANEXOS III e IV**).

O estudo foi realizado com um grupo de 30 mulheres caucasianas, com idade entre 20 e 45 anos ($34,6 \pm 5,6$), que estavam registradas na lista de espera e sendo acompanhadas para a realização de cirurgia bariátrica no Centro de Gastroenterologia e Cirurgia da Obesidade vinculado ao Hospital dos Fornecedores de Cana de Piracicaba – SP. Todas as participantes responderam a um questionário de triagem (**ANEXO II**) que teve por objetivo obter informações referentes aos hábitos de vida, uso de medicamentos e suplementos alimentares e históricos clínico. Como critérios de exclusão foram considerados: o etilismo (> 40 mg de álcool dia); a presença de síndromes genéticas associadas à obesidade; a presença de hipo e hipertireoidismo, insuficiência renal ou hepática, neoplasias, infecção por HIV (vírus da imunodeficiência humana) e outros tipos de infecção; uso de corticosteróides e reposição hormonal no climatério; e a exposição a agentes físicos ou químicos prejudiciais à saúde. Para o grupo controle, foram recrutadas 30 mulheres eutróficas saudáveis, caucasianas, da população das cidades de Botucatu e Piracicaba – SP, pareadas por idade ao grupo de obesas. Como critérios de inclusão no grupo controle foram considerados: IMC entre 18,5 e 24,9 kg/m²; mulheres sem histórico familiar de obesidade mórbida; sem prática de exercícios físicos extenuantes; sem consumo de suplementos alimentares; e os critérios de exclusão utilizados para o grupo de pacientes obesas.

III.2 Suplementação nutricional

O grupo de mulheres com obesidade mórbida (grupo de estudo) recebeu suplementação de vitaminas e sais minerais, a qual iniciada dois meses (10 semanas) antes da cirurgia bariátrica e seguida por 6 meses na fase pós-operatória. Esse suplemento de micronutrientes foi manipulado por profissional especializado (Proderma Farmácia de Manipulação Ltda, Piracicaba - SP) e fornecido às participantes em cápsulas ou em pó (sachês), de acordo com protocolo sugerido por Aills *et al.* (2008) para cirurgias disabsortivas: uma *Recommended Dietary Allowance* - RDA (Institute of Medicine, 2002) diária antes da cirurgia e duas RDA após a cirurgia (por 6 meses). A quantidade de vitaminas e minerais fornecida em 2 RDA correspondeu a: 5000 UI vitamina A (retinol), 400 UI vitamina D3 (colecaciferol), 30 mg vitamina E (α -tocoferol), 180 μ g vitamina K, 150 mg ácido ascórbico, 2,2 mg tiamina, 2,2 mg riboflavina, 28 mg nicotinamida, 10 mg ácido pantotênico, 2,6 mg piridoxina, 800 μ g ácido fólico, 60 μ g biotina, 4,8 μ g cianocobalamina, 350 mg magnésio, 500 mg cálcio, 16 mg zinco, 1800 μ g cobre, 50 μ g cromo, 36 mg ferro, 110 μ g selênio, 3,6 mg manganês, 300 μ g iodo, 10 μ g silício e 10 μ g vanádio. No fornecimento de 1 RDA, a quantidade de micronutrientes foi exatamente a metade desses valores.

III.3 Coleta de material biológico

De cada voluntária foram coletados, por profissional habilitado e utilizando material descartável, 10 mL de sangue periférico, em três momentos. A primeira coleta (**M1**) foi realizada uma semana antes do início da suplementação vitamínica (10 semanas antes da cirurgia bariátrica); a segunda (**M2**), dois meses após o início da suplementação (uma

semana antes do procedimento cirúrgico); e a terceira (**M3**), seis meses após a cirurgia bariátrica. A coleta de sangue das voluntárias do grupo controle foi realizada uma única vez.

III.4 Isolamento de células mononucleares (PBMCs - *peripheral blood mononuclear cells*)

O isolamento de PBMCs das amostras de sangue periférico foi realizado utilizando-se o tubo CPTM citrato Na₂ (BD *Vacutainer*®), de acordo com as instruções do fabricante.

III.5 Extração e quantificação de RNA

Uma amostra de sangue total (20 ml) foi coletada em tubo *RNA PAXgene*. O RNA total foi extraído utilizando o *PAXgene* kit (Qiagen), de acordo com os protocolos do fabricante, e armazenado a -80°C. A integridade e qualidade do RNA foram avaliadas no equipamento *Bioanalyzer* (Agilent 2100; Agilent Technologies).

III.6 cDNA microarray

Amostras de 200 ng de RNA total foram hibridados em lâminas 8 x 60K *oligo microarrays* (G4851B, Agilent Technologies) usando o *one color (Cy3) Low input Quick Amp labeling kit* (Agilent Technologies, Inc. Life Sciences and Chemical Analysis Group, Santa Clara, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. A transcrição reversa foi realizada com o RNA total e os controles *spike-in*, e as hibridações realizadas durante 17 horas a 65 ° C, utilizando sistema automatizado (SureHyb, GE Healthcare UK Limited, UK). Posteriormente, as lâminas foram lavadas com soluções tampão, e soluções de estabilização e secagem (Agilent) foram utilizadas para proteger as sondas de cianina contra a degradação. Os sinais de hibridação foram capturados pelo equipamento *Scanner GenePix 4000B* (Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA USA) e os dados de expressão gênica foram extraídos a partir

das imagens digitalizadas por meio do recurso de extração (FE), versão 15.5 (Agilent Technologies, Inc. Life Sciences and Chemical Analysis Group, Santa Clara, CA, USA).

III.7 Teste do cometa

Para a realização do teste do cometa (SCGE – *Single Cell Gel Electrophoresis*), alíquotas de 10 µl da suspensão celular foram adicionados a 120 µl de agarose de baixo ponto de fusão a 0,5% e colocados sobre lâminas limpas, previamente identificadas e recobertas com uma fina camada de agarose de ponto de fusão normal a 1,5%. Em seguida, as lâminas foram cobertas com lamínula e colocadas a 4°C, por 5 minutos, para a polimerização da agarose. Após esse período as lamínulas foram removidas e as lâminas incubadas em solução de lise a 4°C (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, Triton X-100 a 1% e DMSO a 10% com pH 10), onde permaneceram por um período de 24 horas, a 4°C, protegidas da luz. Para a detecção de danos oxidativos no DNA, os nucleóides foram tratados com as enzimas endonuclease III (endoIII) e formamidopirimidina-DNA glicosilase (FPG), que permitem a detecção, respectivamente, de pirimidinas e purinas oxidadas (Dusinska & Collins, 2008). Para isso, após a etapa de lise, as lâminas foram lavadas em PBS (livre de Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺) por 5 minutos, posteriormente três vezes em tampão *Flare* 1x (40mM Hepes, 0,1M KCl, 0,2mg/ml soro albumínico bovino - SAB e 0,5mM EDTA, pH 8) por 5 minutos e, em seguida, colocadas em câmara úmida, onde foram tratadas com 50 µl do tampão de reação enzimática (950 µl de H₂O ultra pura, 40 µl de tampão *Flare* 10 x e 10 µl de SAB) para a quantificação dos danos endógenos, ou com as enzimas Endo III (50 µl) ou FPG (50 µl), ambas diluídas em tampão de reação enzimática na proporção de 1:1000. Após os respectivos tratamentos, as lâminas foram cobertas com lamínula, incubadas a 37°C por 45 minutos e colocadas em geladeira por 10 minutos para polimerização da agarose. Após esse período, as lamínulas foram cuidadosamente removidas e as lâminas transferidas para

cuba de eletroforese contendo tampão alcalino gelado e recém-preparado (1mM EDTA e 300 mM NaOH, pH>13), onde permaneceram por 40 minutos para a desespiralização do DNA. A eletroforese foi conduzida a 25 V e 300 mA por 30 minutos, e posteriormente as lâminas foram incubadas, durante 15 minutos, em solução de neutralização (0,4 M de Tris, pH 7,5), fixadas com etanol 100% e deixadas a temperatura ambiente para secagem. No momento da análise, as lâminas foram coradas com 70 µl de solução de *Syber Gold* – Invitrogen/USA (2: 10000), cobertas com lamínula e os nucleóides visualizados em microscópio de fluorescência (aumento de 400X) acoplado a sistema de análise de imagem (*Comet Assay IV* - Perceptive Instruments, UK). Foram analisados 50 nucleóides por lâmina, em duplicatas e como parâmetro para avaliação dos níveis de danos no DNA foi considerado o *tail intensity* (intensidade de DNA na cauda). Para cada tratamento enzimático foram confeccionadas e analisadas duas lâminas. Todas as etapas da técnica foram conduzidas sob luz indireta.

III.8 Teste do micronúcleo

Para a realização do teste do micronúcleo, as amostras de sangue foram processadas de acordo com o protocolo descrito por Salvadori *et al.* (2003). Decorrido quatro horas após a coleta da amostra de sangue periférico, foi realizado o isolamento de PBMCs, conforme descrito anteriormente, e 0,5 ml da suspensão foi adicionado a frasco de cultura contendo 4,5 ml de RPMI 1640 (com bicarbonato de sódio, glutamina e antibiótico – CULTILAB, Campinas - SP), 1 ml de soro fetal bovino e 150 µl de fitohemaglutinina (CULTILAB, Campinas - SP). As culturas foram mantidas a 37° C, em atmosfera de 5% CO₂. Após 44 horas, foram adicionados 18 µl de citocalasina B (6µg/ml; Sigma) e a cultura incubada por outras 28 horas. Após o total de 72 horas, o conteúdo de cada frasco de cultura foi transferido para um tubo cônico e centrifugado a 800 rpm, por

5 min. O sobrenadante foi descartado e a suspensão de células hipotonizada em 5 mL de solução de KCl 0,075M. Após nova centrifugação (800 rpm, 5 min), o sedimento de células foi fixado com metanol/ácido acético na proporção de 5:1 (com o acréscimo de 3 gotas de formaldeído) e outras duas vezes com o mesmo fixador na proporção de 3:1. Ao final, a suspensão de células foi gotejada em lâminas de vidro previamente limpas e, após secas, coradas com solução de Giemsa 5%, por 5 minutos. Todas as lâminas foram codificadas e as análises citogenéticas realizadas em teste duplo cego em microscópio óptico de luz, com aumento de 400x. De cada sujeito da pesquisa foram avaliadas 1.000 células binucleadas para a verificação da presença de micronúcleos. Foram consideradas células com pouca ou nenhuma sobreposição e com citoplasma e núcleo bem delimitados e intactos.

III.9 Perfil de citocinas

O perfil de citocinas plasmáticas foi utilizado por método de imunoenensaio utilizando-se o *Milliplex® Map kit (Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel kit*, Millipore Corp., Billerica, MA) na plataforma Luminex® MAGPIX. Esse método permite a análise simultânea de múltiplas citocinas por meio de microesferas magnéticas e fluoróforos. O *kit* utilizado permitiu a dosagem das citocinas IL-1 α , IL-1 β , IL-1-receptor antagonist (IL-1Ra), IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, IL-8, IL-12P40, IL-12P70, IL-13, IL-15, IL-17A, INF α 2, INF γ , IFN- γ , *inducible protein 10* (IP-10), *eotaxin*, *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF), *granulocyte colony stimulating factor* (G-CSF), *tumor necrosis- β* (TNF- β), *macrophage inflammatory protein 1- α* (MIP1 α), *macrophage inflammatory protein 1- β* (MIP1 β) e *vascular endothelial growth factor* (VEGF).

III.10 Análise estatística

Os testes Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov foram utilizados para verificar se a distribuição dos dados obtidos pelo teste do cometa e os níveis de citocinas circulantes seguiam a distribuição normal. A distribuição gama foi utilizada para a normalização dos dados e o modelo linear generalizado (GENMOD) para comparação entre os grupos (*software SAS for Windows v.9.2*). Para avaliação dos dados demográficos foram utilizados os testes t de Student e ANOVA em medidas repetidas, seguidos do teste de Tukey. Para a análise dos dados do teste do micronúcleo foi utilizada a distribuição de Poisson. O valor de $p < 0,05$ foi adotado como parâmetro para significância estatística. A normalização dos dados de *microarray* foi realizada utilizando-se o algoritmo *quantile*. Após a avaliação da qualidade, foi realizado um processo de filtragem para eliminar os conjuntos de sondas com baixa expressão. LIMMA (*Linear Models for Microarray Data*) (Smyth, 2004) foi usado para identificar os conjuntos de sondas com expressão diferencial significativa entre as condições experimentais. Foram considerados genes diferencialmente expressos ($p < 0,05$) aqueles com *Fold Change* entre $\geq 0,56$ e $\leq -0,56$. O processamento de dados e as análises estatísticas foram realizados utilizando-se o *software R* e o Bioconductor (Gentleman *et al.*, 2005). Para a análise da função biológica e enriquecimento dos dados foi utilizado o programa IPA (*Ingenuity Pathway Analysis*). As vias selecionadas foram divididas em categorias levando-se em conta os genes que se correlacionam positivamente (z-score positivo; superexpressos) e negativamente (z-score negativo; subexpressos).

IV - RESULTADOS

IV.1 Caracterização da população do estudo

A **Tabela I** apresenta dados da população do estudo, mostrando diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) para peso corpóreo e IMC (Índice de Massa Corporal) entre as mulheres obesas e o grupo controle nos três momentos de coleta das informações (M1, M2 e M3). Quando considerado apenas o grupo de obesas, foi observada redução significativa do peso corpóreo a partir de M2 ($M3 < M2 < M1$), e de IMC em M3 ($M3 < M2 = M1$).

Tabela I. Características da população de estudo em relação a peso corpóreo e Índice de Massa Corporal (IMC)

Grupo/Momento da análise (M)	Peso corpóreo (Kg)	IMC (Kg/m ²)
Controle	60,6 ± 6,4	24,3 ± 4,5
Obesas		
M1	124,6 ± 10,5 ^{#A}	47,2 ± 5,1 ^{#A}
M2	118,0 ± 11,1 ^{#B}	44,8 ± 5,1 ^{#A}
M3	89,6 ± 8,7 ^{#C}	33,9 ± 3,4 ^{#B}

Dados apresentados como média ± desvio padrão. M: momento da coleta da informação: M1 - antes do início da suplementação nutricional; M2 - dois meses após a suplementação nutricional e antes da cirurgia bariátrica; M3 - seis meses após a cirurgia bariátrica. # $p < 0,05$ com relação ao grupo controle; letras diferentes indicam diferença significativa entre os momentos de análise (M1, M2 e M3).

IV.2 Danos genéticos (teste do cometa e teste do micronúcleo)

A **Tabela II** apresenta os dados referentes a danos primários no DNA de células mononucleares do sangue periférico (teste do cometa). Os dados mostraram níveis aumentados ($p < 0,01$) de quebras de fita simples, dupla e sítios álcali-lábeis em mulheres obesas em relação ao grupo controle, nos três momentos avaliados (M1, M2 e M3). Resultados similares foram observados para danos oxidativos em bases púricas e pirimídicas do DNA. Considerando apenas as mulheres obesas, a comparação entre os três momentos evidenciou que os níveis de lesões no DNA diminuíram significativamente ($p < 0,05$) de M1 (antes do início da suplementação nutricional) para M3 (6 meses após a cirurgia e suplementação nutricional).

Tabela II. Danos no DNA (*tail intensity*) em células mononucleares do sangue periférico de mulheres com obesidade mórbida

Grupos	Danos no DNA ¹	Danos oxidativos em purinas	Danos oxidativos em pirimidinas
Controle (n=30)	15,68 ± 20,85	26,73 ± 29,45	23,54 ± 25,85
Obesas - M1 (n=30)	49,19 ± 33,29*	57,06 ± 32,37*	54,19 ± 32,12*
Obesas - M2 (n=30)	43,39 ± 32,38*	51,02 ± 32,86*	48,11 ± 31,81*
Obesas - M3 (n=30)	43,31 ± 31,15* [#]	48,18 ± 31,15* [#]	49,35 ± 31,96* [#]

Dados apresentados como média ± desvio padrão. M1 - antes do início da suplementação nutricional; M2 - dois meses após a suplementação nutricional e antes da cirurgia bariátrica; M3 - seis meses após a cirurgia bariátrica; ¹ quebras de fita simples, dupla e sítios álcali-lábeis; * $p < 0,01$ em relação ao grupo controle; [#] $p < 0,05$ (M1 x M3).

A **Tabela III** apresenta a frequência (%) de linfócitos micronucleados (LMN) em mulheres com obesidade mórbida e eutróficas (grupo controle). Os resultados mostraram frequências aumentadas de LMN nas obesas antes da cirurgia bariátrica (M1 e M2), quando comparadas às eutróficas. Após a cirurgia (M3), a frequência de LMN nas mulheres obesas foi significativamente menor do que aquelas observadas antes da cirurgia (M1 e M2), ficando semelhante à do grupo controle.

Tabela III. Frequência (%) de linfócitos micronucleados (LMN) em mulheres com obesidade mórbida (n=30) e eutróficas (n=30)

Grupos	Controle	Obesas		
		M1	M2	M3
%o LMN	3,02 ± 0,06	4,88 ± 0,09 ^{#A}	4,18 ± 0,07 ^{#A}	3,45 ± 0,05 ^B

Dados apresentados como média ± desvio padrão. M1 - antes do início da suplementação nutricional; M2 - dois meses após a suplementação nutricional e antes da cirurgia bariátrica; M3 - seis meses após a cirurgia bariátrica; [#] p < 0,05 em relação ao grupo controle; letras diferentes indicam diferença significativa (p < 0,05) entre os momentos de análise (M1, M2 e M3) do grupo de obesas.

IV.3 Níveis plasmáticos de citocinas

A **Tabela IV** apresenta os níveis de citocinas plasmáticas em mulheres com obesidade mórbida e eutróficas (grupo controle). De maneira geral, os níveis de citocinas foram significativamente mais altos nas obesas, especialmente antes da suplementação nutricional (M1). Exceções foram detectadas para: IFN- γ , IL-1 α , IL1- β e IL-3, que apresentaram níveis semelhantes nos dois grupos. Dois meses após o início da suplementação (M2), além das citadas, as citocinas GM-CSF, IFN- α 2, TNF- β , IL-5, IL-13, IL-15 e IL-17 também apresentaram níveis similares ao grupo controle. Seis meses após a

cirurgia e com a suplementação nutricional (M3), apenas as citocinas EOTAXIN, G-CSF, IP-10, EGF, IL1- β e IL-8, não estavam em níveis semelhantes ao grupo controle. Em resumo, foi observada redução significativa dos níveis plasmáticos da maioria das citocinas de M1 para M3 (M3 < M2 < M1).

Tabela IV. Concentração de citocinas plasmáticas (pg/ml) em mulheres com obesidade mórbida e eutróficas

Citocina	Controle	Obesas - M1	Obesas - M2	Obesas - M3
EOTAXINA	35,51 \pm 1,51	106,13 \pm 5,48 ^{#A}	92,77 \pm 9,39 ^{#A}	82,95 \pm 8,87 ^{#A}
G-CSF	36,23 \pm 2,13	23,71 \pm 2,57 ^{#A}	33,39 \pm 5,14 ^{#A}	39,15 \pm 4,43 ^{#B}
GM-CSF	1,63 \pm 0,11	2,14 \pm 0,16 ^{#A}	2,05 \pm 0,26 ^A	1,71 \pm 0,17 ^A
IFN-α2	2,34 \pm 0,31	3,52 \pm 0,44 ^{#A}	3,04 \pm 0,6 ^{AB}	2,36 \pm 0,31 ^B
IFN-γ	1,46 \pm 0,39	1,88 \pm 0,20 ^A	1,72 \pm 0,27 ^A	1,73 \pm 0,2 ^B
IP-10	205,08 \pm 7,75	505,89 \pm 40,29 ^{#A}	447,26 \pm 37,17 ^{#A}	341,14 \pm 24,99 ^{#B}
EGF	57,73 \pm 11,89	297,63 \pm 44,04 ^{#A}	209,13 \pm 25,32 ^{#A}	157,03 \pm 19,02 ^{#B}
MIP-1α	3,52 \pm 1,03	11,35 \pm 3,42 ^{#A}	8,33 \pm 2,52 ^{#A}	4,99 \pm 1,95 ^A
MIP-1β	16,60 \pm 1,93	49,93 \pm 10,3 ^{#A}	35,98 \pm 5,79 ^{#A}	21,76 \pm 4,1 ^B
TNF-β	0,24 \pm 0,01	0,84 \pm 0,49 ^{#A}	0,35 \pm 0,06 ^B	0,20 \pm 0,02 ^C
IL1-α	16,64 \pm 5,67	4,53 \pm 0,94 ^{#A}	12,91 \pm 5,15 ^B	15,70 \pm 6,91 ^B
IL-1α	3,34 \pm 10,93	18,39 \pm 8,3 ^B	11,57 \pm 8,7 ^{AB}	3,89 \pm 1,25 ^A
IL1-β	0,20 \pm 0,04	0,20 \pm 0,05 ^A	0,17 \pm 0,04 ^A	0,14 \pm 0,02 ^{#A}
IL-2	0,17 \pm 0,02	0,45 \pm 0,16 ^{#A}	0,19 \pm 0,04 ^{#B}	0,17 \pm 0,02 ^B
IL-3	0,04 \pm 0,01	0,04 \pm 0,01 ^A	0,04 \pm 0,01 ^A	0,04 \pm 0,01 ^A
IL-5	0,47 \pm 0,26	0,16 \pm 0,02 ^{#A}	0,56 \pm 0,34 ^B	0,53 \pm 0,25 ^B
IL-7	0,67 \pm 0,13	2,23 \pm 0,63 ^{#A}	1,11 \pm 0,12 ^{#B}	0,80 \pm 0,07 ^C
IL-8	2,01 \pm 0,33	16,28 \pm 5,6 ^{#A}	11,39 \pm 3,3 ^{#A}	6,88 \pm 1,2 ^{#B}
IL-12 (p40)	0,52 \pm 0,08	12,69 \pm 8,13 ^{#A}	4,94 \pm 2,98 ^{#A}	0,40 \pm 0,08 ^B
IL-12 (p70)	0,89 \pm 0,09	31,68 \pm 26,57 ^{#A}	21,43 \pm 14,72 ^{#A}	1,28 \pm 0,7 ^B
IL-15	0,35 \pm 0,03	0,63 \pm 0,14 ^{#A}	0,44 \pm 0,1 ^{AB}	0,34 \pm 0,03 ^B
IL-17	0,38 \pm 0,05	1,33 \pm 0,69 ^{#A}	0,28 \pm 0,05 ^{AB}	0,27 \pm 0,04 ^B

IL-13	1,70 ± 0,46	0,34 ± 0,13 ^{#A}	1,43 ± 1,16 ^B	1,75 ± 1,02 ^B
IL-4	0,92 ± 0,13	0,32 ± 0,04 ^{#A}	0,51 ± 0,12 ^{#B}	0,86 ± 0,17 ^B

Dados apresentados como média ± desvio padrão. M1 - antes do início da suplementação nutricional; M2 - dois meses após a suplementação nutricional e antes da cirurgia bariátrica; M3 - seis meses após a cirurgia bariátrica; [#] p < 0,05 em relação ao grupo controle; letras diferentes indicam diferença significativa (p < 0,05) entre os momentos da avaliação (M1, M2 e M3) nas mulheres obesas.

IV.4 Expressão gênica

Após a aplicação dos critérios estatísticos, dos 60.000 transcritos avaliados, 1.705 estavam diferencialmente expressos entre o grupo de mulheres obesas em M1 vs. o grupo controle; 534 em M2 vs. M1; 486 em M3 vs. M2 e 934 em M3 vs. M1. Todos esses genes foram então selecionados para análise de função (*Ingenuity Pathway Analysis*). As **Tabelas VI, VII, VIII e IX** apresentam as principais vias metabólicas correspondentes aos genes diferencialmente expressos nas comparações entre os grupos de estudo. Entre as obesas em M1 (antes da suplementação nutricional) vs. grupo controle (**Tabela VI**) destacaram-se vias biológicas como a de metabolismo de carboidratos, de síntese de lipídeos e de resposta inflamatória; entre obesas em M1 vs. M2 as vias de regulação da quantidade de esteroides e concentração de colesterol, a de viabilidade celular e reparo de DNA (**Tabela VI**); entre M3 x M2 (**Tabela VIII**) foi observado aumento de *z-score* para as vias de clivagem de carboidratos, de síntese de diacilglicerol e hidrólise de fosfoinosítídeos, além de diminuição na expressão de vias como degranulação de neutrófilos, ligação de lipídeos e liberação de prostaglandina. A análise de M3 x M1 (**Tabela IX**), mostrou diminuição no *z-score* de vias como ativação de leucócitos, resposta inflamatória, inflamação do tecido adiposo, liberação de lipídios e necrose, além do aumento da expressão de genes da via de ligação de DNA.

Tabela VI - Vias e genes diferencialmente expressos em células do sangue periférico de mulheres com obesidade mórbida antes da suplementação nutricional e cirurgia bariátrica em relação ao grupo controle (**M1 vs. C**)

Processo Biológico	p-value	z-score	Genes
Metabolismo de carboidratos	6,64E-03	2,159	CEBPA, CHIA, CPT1A, CREBBP, DPM3, EEF1A1, ERBB2, ETNK1, ETNK2, F2R, GCK, GK, GRB10, GUSB, HLA-A, IAPP, IDS, IRS2, ITGB1, LIPC, LTF, MAN2A1, MIOX, MMP2, PIGY, PIKFYVE, PLA2G10, PLAT, PLCH2, PPP1R3G, PRKCB, S1PR1, STAT3, SULF2, TBXA2R, TKT
Síntese de carboidratos	7,40E-03	2,522	CEBPA, CREBBP, DPM3, EEF1A1, ERBB2, ETNK1, ETNK2, F2R, GCK, GK, GRB10, HLA-A, IRS2, ITGB1, LIPC, LTF, MAN2A1, PIGY, PIKFYVE, PLA2G10, PPP1R3G, PRKCB, S1PR1, STAT3, TBXA2R, TKT
Oxidação de D-glucose	1,10E-02	2,216	GCK, NOV, NT5C2, SAT1, UCP3
<i>Burst</i> respiratório	1,85E-03	0,218	CLEC4D, ITGA4, ITGB1, LTF, NCF1, PGAM1, PLA2G10, SLC11A1
Infiltração celular por leucócitos	2,11E-03	0,271	APCS, BRAF, C3AR1, CEBPA, CES1, DUSP1, ERBB2, ESR2, F2R, HLA-A, IL17RA, IL4R, ITGA4, ITGB1, KCNE3, LTF, MMP2, MMP9, NCF1, NFKBIZ, PLA2G10, PLA2G7, PLAT, RSPO3, STAT3, VWF
Migração de células espumosas	6,14E-03	0,122	CDKN1B, DUSP1, F2R, FHL1, ITGB1, MMP9, NOV, PLAT, S1PR1, STAT3, TPT1
Resposta Inflamatória	2,63E-03	0,830	ACOT11, APCS, C3AR1, CASP8, CD200, CDK19, CLEC4M, DIAPH1, ERBB2, F2R, GGT5, GNLY, HCAR2, HLA-A, IL17RA, IL24, IL27, IL4R, ITGA4, ITGA9, ITGB1, KCNE3, KMT2E, LTF, MAPK9, MGLL, MMP2, MMP9, MSRA, NCF1, NFIL3, NFKBIZ, PARP4, PLA2G10, PLA2G7, PLAT, PRKCB, S1PR1, SLC11A1, SLC1A5, STAT3, TBXA2R, TNFSF18, TOLLIP, TPST1
Acúmulo de leucócitos	5,64E-03	0,105	APCS, BCL2, BRAF, CASP8, CD200, CEBPA, DUSP1, F2R, IL17RA, ITGA4, ITGB1, MAPK9, MMP9, NCF1, PLA2G10, S1PR1, SH3BP2, STAT3
Metabolismo de ácidos graxos	8,95E-03	2,787	ABCG4, ACOT12, APCS, BCL2, BCL2L1, CASP8, CES1, CPT1A, CYP4A11, ERBB2, ESR2, FAM57B, GGT5, GNLY, HCAR2, HMGCL, IAPP, IL24, IL27, LIPC, LTF, MAPK9, MGLL, NCF1, NPC1L1, OSBPL1A, PLA2G10, S1PR1, SDHA, STAT3, TBXA2R, TNXB, UCP3, VWF
Hidrólise de ácidos graxos	5,88E-03	1,313	ACOT11, LIPC, MGLL, PLA2G10
Síntese de lipídeos	1,27E-03	1,699	APC, BCL2, BCL2L1, CASP8, CCHCR1, CEBPA, CES1, CYP4A11, DIAPH1, DPM3, EEF1A1, ERBB2, ESR2, ETNK1, ETNK2, FAM57B, GGT5, GNLY, GPAT2, HSD17B7, IAPP, IDI1, IL24, IL27, ITGB1, LIPC, LTF, MAPK9, MMP2, MMP9, MZB1, NCF1, NPC1L1, NR5A2, NUS1, OPA1, PIGY, PIKFYVE, PLA2G10, PRKCB, S1PR1, STAT3, TBXA2R, VWF

Metabolismo de polissacarídeos	1,43E-02	-0,375	CHIA,ERBB2,GCK,GRB10,GUSB,IDS,IRS2,LIPC,LTF,MAN2A1,MMP2,PLAT,PPP1R3G,STAT3,SULF2
Glicólise	1,01E-02	-0,055	BCL2,ENO4,ESRRA,GCK,IRS2,LDHA,NCF1,PGAM1,STAT3,UCP3
Transporte de D-glucose	7,53E-03	-0,120	BRAF,CLTCL1,CSF2RB,ERBB3,GCK,GRB10,IRS2,ITGB1,NT5C2,PRKCB,VPS45
Apoptose de leucócitos	1,43E-02	0,327	BCL2,BCL2L1,CASP8,CDKN1B,CEBPA,ERBB2,ETV6,ITGA4,ITGB1,LTK,MZB1,STAT3
Apoptose de linfócitos B	1,77E-03	0,573	BCL2,BCL2L1,CASP8,CDKN1B,ERBB2,ETV6,ITGA4,ITGB1,LTK,MZB1,STAT3
Migração de células T	1,27E-02	2,356	AQP3,BCL2,DIAPH1,ERBB2,ESR2,GNLY,HLA-A,HNRNPL,IL17RA,ITGA4,ITGA9,ITGB1,LTK,PLA2G10,S1PR1,STAT3
Adesão de leucócitos	3,47E-03	1,982	CLEC4M,CSF2RB,ITGB1,VWF
Diferenciação de monócitos	1,41E-02	0,557	APCS,BCL2,CEBPA,CSF2RB,GNLY,IL27,LTF,STAT3
Infiltração de leucócitos	2,11E-03	0,271	APCS,BRAF,C3AR1,CEBPA,CES1,DUSP1,ERBB2,ESR2,F2R,HLA-A,IL17RA,IL4R,ITGA4,ITGB1,KCNE3,LTF,MMP2,MMP9,NCF1,NFKBIZ,PLA2G10,PLA2G7,PLAT,RSPO3,STAT3,VWF
Movimento celular de leucócitos	5,25E-03	0,868	APCS,AQP3,BCL2,BRAF,C3AR1,CEBPA,CES1,CLEC4M,DIAPH1,DUSP1,ERBB2,ESR2,ETV6,F2R,GNLY,HCAR2,HLA-A,HNRNPL,IFNL2,IL17RA,IL4R,ITGA4,ITGA9,ITGB1,KCNE3,LTF,LTK,MAPK9,MMP2,MMP9,NCF1,NFIL3,NFKBIZ,PLA2G10,PLA2G7,PLAT,PRKCB,QPCT,ROCK2,RSPO3,S1PR1,STAT3,TNFSF18,VWF
Migração de leucócitos	3,40E-03	0,824	APCS,AQP3,BCL2,BRAF,C3AR1,CD200,CEBPA,CES1,CLEC4M,CSF2RB,DIAPH1,DUSP1,ERBB2,ESR2,ETV6,F2R,GGT5,GNLY,HCAR2,HLA-A,HNRNPL,HSPA1A/HSPA1B,IFNL2,IL17RA,IL4R,ITGA4,ITGA9,ITGB1,KCNE3,LTF,LTK,MAPK9,MMP2,MMP9,NCF1,NFIL3,NFKBIZ,PLA2G10,PLA2G7,PLAT,PRKCB,QPCT,ROCK2,RSPO3,S1PR1,STAT3,TNFRSF10A,TNFSF18,TPT1,VWF
Crescimento do fígado	8,99E-03	-0,308	BCL2,C3AR1,CDKN1B,CEBPA,CSF2RB,CUL3,IL4R,ITGB1,MAPK9,NCF1,STAT3,STK3,SULF2
Regeneração do fígado	7,94E-03	0,372	C3AR1,CASP8,IL4R,MMP9,SAT1,STAT3,SULF2
Acúmulo de células sanguíneas	2,03E-03	0,132	APCS,BCL2,BRAF,CASP8,CD200,CEBPA,DUSP1,F2R,IL17RA,ITGA4,ITGB1,MAPK9,MMP9,NCF1,PLA2G10,PLAT,S1PR1,SH3BP2,STAT3,WASH1
Secreção de prostaglandinas	1,05E-02	1,000	MAPK9,PLA2G10,PRKCB,STAT3

Clivagem de ácidos graxos	3,90E-03	1,633	ACOT11,GGT5,LIPC,MGLL,PLA2G10
Quantidade de HDL no sangue	9,20E-03	1,671	ACOT11,ESR2,IRS2,KCNE3,LIPC,NPC1L1
Produção de ácido láctico	4,83E-04	1,387	BCL2,ESRRA,EWSR1,GCK,HNRNPA1,LDHA,STAT3
Metabolismo de ácido fosfatídico	1,21E-02	0,886	CEBPA, DPM3, EEF1A1, ETNK1, ETNK2, ITGB1, LIPC, PIGY, PIKFYVE, PLA2G10, PLCH2, PRKCB
Necrose	5,38E-03	0,555	ADARB1, ADGRL2, AIP, AMOTL1, APC, ATG14, BCL2, BCL2L1, BRAF, C3AR1, CASP8, CBX5, CCDC8, CCDC86, CCHCR1, CCNC, CD200, CD33, CDK3, CDKN1B, CEBPA, CES1, CKAP5, COL6A1, CREBBP, CSF2RB, DFFA, DIDO1, DLG4, DPM3, DUSP1, E2F4, EEF1A1, EMP2, ERBB2, ERBB3, ESR2, ETV6, EWSR1, F2R, FBXO17, FGL2, FMOD, GABBR1, GABRP, GCK, GNLY, GPAT2, GRB10, GRIN3A, HCAR2, HDAC2, HNRNPA1, HSPA1A/HSPA1B, IAPP, IFNL2, IL17RA, IL24, IL27, IRS2, ITGA4, ITGB1, IVNS1ABP, JUNB, KHDRBS1, KIAA0101, KIFC3, LDHA, LTB4R2, LTF, LTK, MAGEA3/MAGEA6, MAN2A1, MAP3K4, MAPK9, MAT2A, MBD1, MMP2, MMP9, MYBPC3, MZB1, NCF1, NCOA1, NFIB, NFIL3, NFKBIZ, NOC2L, NOV, NR5A2, NT5C2, OPA1, PIKFYVE, PLA2G7, PLAT, POT1, PPM1A, PRKCB, RBBP4, ROCK2, RPS6KA1, RRAS2, S1PR1, SAT1, SDHA, SF3A1, SH3BP2, SKI, SMG1, SNCB, SRSF2, SSTR3, STAT3, STK3, SULF2, TARDBP, TBXA2R, TESK2, TFCP2, TNFRSF10A, TNFSF18, TPT1, VWF, WTAP, XRCC2

Os scores são calculados pelo *weighted Z-test* (*z-score* positivo – genes superexpressos; negativo - subexpressos).

Tabela VII. Vias e genes diferencialmente expressos em células do sangue periférico de mulheres com obesidade mórbida e sob suplementação nutricional (antes da cirurgia bariátrica) em relação a antes do início da suplementação (**M2 vs. M1**)

Processo Biológico	p-value	z-score	Genes
Quantidade de esteroides	1,43E-02	-1,211	ABCG5, ACOT11, ADCY10, BHMT, CHST10, CYP3A7, DBH, DLG2, EDN1, FASLG, ICAM1, INSIG1, MBTPS1, NPC1L1, NR2C2, NR5A1, PMP22, SLC26A3, SNCA, SPP1, SST
Concentração de colesterol	1,73E-02	-1,036	ABCG5, ACOT11, ADCY10, BHMT, DLG2, FASLG, ICAM1, INSIG1, MBTPS1, NPC1L1, NR2C2, PMP22, SNCA, SPP1
Viabilidade celular	6,68E-03	0,699	ADCY10, BAX, BLM, BRCA2, CAMLG, CC2D1A, CDK11A, CEACAM5, DDIT3, E2F4, EDN1, EN1, EPHA4, EPHB2, ERBB3, ETS2, FANCD2, FASLG, FBXO18, FCER1G, HNRNPUL2, ICAM1, IGFBP3, IKZF2, INSIG1, KIF1A, KLK3, LDHA, NR2C2, NR5A1, NRG1, PFDN6, PHLPP2, PMS2, PPEF2, PRKCG, PRKD1, RARG, REV1, RRM2B, RUNX1T1, SMARCA2, SNCA, SNW1, SPP1, SRC, SST, TCF7, TERT, TINAG, TRIM21, USP8, WHSC1
Resposta autoimune	2,03E-02	-1,982	BAX,FASLG,LTC4S,MPZ
Metabolismo de esteróides	2,16E-02	-0,436	ABCG5,CYP3A7,EDN1,FECH,GRM1,HDC,HSD3B2,INSIG1,MBTPS1,NPC1L1,NR5A1,UGT2B11
Acúmulo de lipídios	2,58E-03	0,724	BAX,BHMT,CIDEC,CPT1A,DBH,EDN1,GPR84,ICAM1,IGHG1,INSIG1,KIF20B,NR2C2,NR5A1,NRG1,PAFAH1B2,PRKD1,SRC
Apoptose	1,85E-02	-0,661	ADCY10,AHCTF1,ANP32A,APH1A,APOBEC3B,APOL6,AREL1,ARNT2,ATG16L1,ATMIN,ATP2A1,ATXN3,BAX,BLM,BLNK,BRCA2,CAMLG,CARD9,CCDC6,CCDC8,CD164,CDK11A,CEACAM5,CIDEC,CSNK1A1,CTTN,DDAH2,DDIT3,DNAJC5,E2F4,EDN1,EN1,EPHA4,EPHB2,ERBB3,ETS2,EXO1,FASLG,FCER1G,FOXO6,GNA11,GRM1,HSP90AA1,ICAM1,IGFBP3,IGHG1,IL17RB,IL4R,IRF2BP2,KLK3,LDHA,MAP2K3,MBTPS1,MPZ,MXI1,NEDD9,NR5A1,NRG1,NSD1,NSMF,PAFAH1B2,PMP22,PMS2,PRDM16,PRKCG,PRKD1,PSMG2,RABL6,RARG,ROCK2,RPS6KB1,RRBP1,RRM2B,RUNX1T1,RXFP2,SELENBP1,SIRT7,SLK,SMARCA2,SNCA,SNW1,SPP1,SRC,SRRT,SST,STRADB,TERT,TGFBR3,TINAG,TOP2A,TRIM21,TRIM39,UBR2,VTI1A,WHSC1
Mitogênese	2,06E-02	-0,336	EDN1,ERBB3,IGFBP3,IGHG1,LTC4S,NRG1,RPS6KB1,SPP1,SRC
Transformação celular	2,33E-02	-1,074	ANP32A,BAX,CCDC6,CHRM5,E2F4,ERBB3,FBXO18,FBXO7,GRM1,HSP90AA1,LDHA,MAP2K3,MXI1,NRG1,PRKCG,ROCK2,RUNX1T1,SMARCA2,SPP1,SRC,TERT
Sobrevivência celular	3,31E-03	0,178	ADCY10,BAX,BLM,BRCA2,CAMLG,CC2D1A,CDK11A,CEACAM5,DDIT3,E2F4,EDN1,EN1,EPHA4,EPHB2,ERBB3,ETS2,EXO1,FANCD2,FASLG,FBXO18,FCER1G,HNRNPUL2,ICAM1,IGFBP3,IKZF2,IL4R,INSIG1,KIF1A,KLK3,LAPTM4B,LDHA,NEDD9,NR2C2,NR5A1,NRG1,PFDN6,PHLPP2

			,PMS2,PPEF2,PRKCG,PRKD1,RARG,REV1,RRM2B,RUNX1T1,SMARCA2,SNCA,SNW1,SPP1,SR C,SST,TCF7,TERT,TINAG,TOP2A,TRIM21,USP8,WHSC1
Gasto energético	8,26E-03	-0,378	ACOT11,BHMT,CIDEC,DDIT3,DLG2,HDC,NR2C2,SDC3
Reparo de DNA	1,55E-03	0,558	ATMIN, ATXN3, BLM, BRCA2, EXO1, FANCD2, FANCI, HERC2, INTS3, NR2C2, PMS2, PRKCG, PRMT6, RAD51D, REV1, RRM2B, TERT, TOP2A

Os *scores* são calculados pelo *weighted Z-test* (*z-score* positivo – genes superexpressos; negativo - subexpressos).

Tabela VIII - Vias e genes diferencialmente expressos em células do sangue periférico de mulheres com obesidade mórbida sob suplementação nutricional e seis meses após a cirurgia bariátrica em relação a antes da cirurgia e sob suplementação nutricional (**M3 vs. M2**)

Processo Biológico	p-value	z-score	Genes
Clivagem de carboidratos	2,45E-03	1,446	CHRM3, CTSG, F2, GRM8, MAPK1, MMP14, PLCB1, PLCG1, TNFSF10
Hidrólise de carboidratos	4,26E-03	1,217	CHRM3,CTSG,F2,GRM8,MAPK1,PLCB1,PLCG1,TNFSF10
Degranulação de granulócitos	3,45E-03	-1,000	ANXA3,DEFA1 (includes others),F2,ITGAM,PPBP
Liberação de prostaglandinas	2,02E-02	-0,132	ERBB2,F2,INSR,TNFSF10
Síntese de proteínas	1,08E-04	-0,644	APLP1,ARHGEF1,CNOT8,DDX3X,EIF4G2,ERBB2,FST,HDAC6,IGFBP3,INSR,MAPK1,MMP14,NANOS1,PHLPP2,PURB,RPL17,RPL39,RPS15A,RPS20,RPS24,RPS6KB1,TNFSF10,TP73,UPF3A
Metabolismo de proteínas	6,07E-03	0,189	ADAMTS7,APLP1,ARHGEF1,ARNTL,CNOT8,CSNK2A1,CTSE,CTSG,DDX3X,EIF4G2,ERBB2,F2,FST,HDAC6,HPS4,IGFBP3,INSR,ITCH,KLK3,LTF,MAPK1,MDM4,MME,MMP14,NANOS1,PHLPP2,PROC,PURB,RPL17,RPL39,RPS15A,RPS20,RPS24,RPS6KB1,TNFSF10,TP73,UPF3A
Expressão de proteínas	8,02E-03	-0,708	APLP1,CNOT8,DDX3X,EIF4G2,HDAC6,MMP14,NANOS1,PHLPP2,PURB,RPL17,RPL39,RPS24,RPS6KB1,TNFSF10,TP73
Degranulação de neutrófilos	3,32E-03	-2,000	ANXA3, DEFA1 (includes others), ITGAM, PPBP
Hidrólise de fosfoinositídeos	7,75E-03	1,566	CHRM3, F2, GRM8, MAPK1, PLCB1, PLCG1
Hidrólise de ácido fosfatídico	5,79E-03	1,567	CHRM3, F2, GRM8, MAPK1, PLCB1, PLCG1, TNFSF10
Ligação de lipídios	1,91E-02	-0,391	CPT1A, F2, HDAC6, LY96, TNFSF10
Síntese de diacilglicerol	7,14E-03	0,849	CHRM3, F2, PLCB1, PLCG1

Os *scores* são calculados pelo *weighted Z-test* (*z-score* positivo – genes superexpressos; negativo - subexpressos).

Tabela XI - Vias e genes diferencialmente expressos em células do sangue periférico de mulheres com obesidade mórbida sob suplementação nutricional e seis meses após a cirurgia bariátrica em relação a antes da cirurgia e antes do início da suplementação nutricional (M3 vs. M1)

Processo Biológico	p-value	z-score	Genes
Ativação de leucócitos	6,61E-04	-0,426	ANXA1, BAX, BCL2L1, BLNK, CAMK4, CAMP, CCR5, CD244, CD40, CTSL, CXCL12, DAPP1, EDN1, ERBB2, ETS1, FAS, FCER1G, FLT3LG, FOXO3, GDNF, GF11, HLA-A, ICAM1, IGHG1, IGHM, IL15RA, IL18R1, IL21R, ITGAV, KLKB1, LAT2, MGAT5, MIF, MPO, NCF1, NFATC2, NPC1, OSM, PPIA, PSEN2, PTEN, PTPRE, RABGEF1, RELA, SBNO2, SERPING1, SLA2, SNCA, SPN, SRC, STAT3, TNFSF10, VEGFA
Quimiotaxia de macrófagos	5,55E-04	-0,096	CAMP, CCR5, CMKLR1, CTSE, CXCL12, DEFA1 (includes others), ERBB2, HCAR2, ICAM1, MIF, PIK3CB, PLA2G4A, RABGEF1, TNFSF10, VEGFA
Ligação de DNA	6,62E-05	0,422	ADCY6, ARNT, CCAR1, CD40, CDK1, CHRM1, CXCL12, CYP2B6, EDN1, ERBB2, ETS1, FAS, FOXO3, FOXP4, FYB, GAPDH, GF11, IL6ST, MAP3K4, MAPK1, MIF, MTF1, NFATC2, NFKBIB, NR3C2, NR5A1, OSM, PLA2G4A, PLCG1, PPIA, PSEN2, PTEN, RARG, RB1, RELA, SPN, SRC, STAT3, TAGLN, TCF23, TERT, TFF3, TRADD, TSNAX, VDR, VEGFA, WTAP
Inflamação do tecido adiposo	2,44E-03	-1,387	FAS, MPO, OSM, STAT3, VEGFA
Liberação de prostaglandinas	1,13E-03	-1,674	EDN1, ERBB2, FCER1G, MIF, PLA2G4A, RABGEF1, TNFSF10, VEGFA
Quantidade de células sanguíneas	1,41E-04	1,671	APOB, BAX, BCL2L1, BLNK, BNIP3L, CAMK4, CAMP, CCR5, CD244, CD40, CDKN1B, CMKLR1, CTSE, CXCL12, DAPP1, DMTN, E2F2, E2F4, EPB42, EPHA4, ERBB2, ETS1, ETV2, FAS, FCER1G, FLT3LG, FOXO3, FYB, GF11, GNMT, HLA-A, ICAM1, IGHM, IGLL1/IGLL5, IL15RA, IL21R, IL25, IL6ST, IL9R, LAMA3, MAPK1, MBTD1, MDM4, MFNG, MGAT4B, MIF, MPO, MUC1, NFATC1, NFATC2, NFKBIB, NPC1, NR3C2, OSM, PLA2G15, PLA2G4A, PLCE1, PLCG1, PPIA, PSEN2, PTEN, RABGEF1, RB1, RBM15, RELA, SLC4A1, SNCA, SPN, SRC, STAT3, STEAP4, TDP2, TERT, TET2, TNFSF10, VDR, VEGFA, WWOX
Função de linfócitos	1,51E-03	1,069	BCL2L1, CCR5, CD244, CD40, ETS1, FCER1G, FLT3LG, FYB, HLA-A, ICAM1, IGHG1, IGHM, IL15RA, IL18R1, IL21R, IL9R, LAT2, LDHA, MAP3K4, NFATC1, NFATC2, PPIA, PTEN, RELA, SPN, STAT3, TCF7, TNFSF10, VDR
Morte celular de leucócitos	1,88E-04	-1,195	AKTIP, BAX, BCL2L1, BLNK, CAMP, CCAR1, CCR5, CD40, CDK1, CDKN1B, CXCL12, E2F2, EPHA4, ETS1, FAS, FOXO3, GAPDH, GF11, ICAM1, IGHM, IL15RA, IL6ST, NFATC1, NFATC2, NFKBIB, NR5A1, PLCG1, PTEN, RB1, RELA, SPN, STAT3, TERT, TNFSF10, VDR, VEGFA

Liberação de ácidos graxos	1,93E-03	-1,638	CAMP,CD40,EDN1,ERBB2,FAS,FCER1G,HCAR2,HTR1B,MAPK1,MIF,PLA2G4A,PLCG1,RABGEF1,SRTNFSF10,VEGFA
Renovação de lipídeos	2,04E-03	-1,176	ACSL1,ADCYAP1R1,CD244,CHRM1,EDN1,PLA2G4A
Liberação de eicosanóides	2,10E-03	-1,935	CAMP,CD40,EDN1,ERBB2,FAS,FCER1G,MAPK1,MIF,PLA2G4A,PLCG1,RABGEF1,SRC,TNFSF10,VEGFA
Síntese de eicosanóides	2,20E-03	-1,281	ANXA1,CAMP,CD40,EDN1,ERBB2,FCER1G,FOXO3,IGHM,MAPK1,MGST2,MIF,NCF1,NFATC2,NPC1,PIK3CB,PLA2G4A,RELA,STAT3,TNFSF10,VEGFA
Apoptose de linfócitos	2,20E-04	-1,667	AKTIP,BAX,BCL2L1,BLNK,CCAR1,CCR5,CD40,CDKN1B,CXCL12,E2F2,EPA4,ETS1,FAS,FOXO3,GFI1,ICAM1,IGHM,IL15RA,NFATC1,NFATC2,NFKBIB,NR5A1,PLCG1,PTEN,RB1,RELA,SPN,STAT3,TERT,TNFSF10,VDR,VEGFA
Apoptose de linfócitos T	2,42E-03	-1,532	AKTIP,BAX,BCL2L1,CCAR1,CCR5,CDKN1B,CXCL12,E2F2,EPA4,ETS1,FAS,FOXO3,GFI1,ICAM1,IL15RA,NFATC1,NR5A1,PTEN,RB1,SPN,STAT3,TERT,TNFSF10,VDR
Síntese de prostaglandinas	2,45E-04	-1,361	ANXA1,CAMP,CD40,EDN1,ERBB2,FCER1G,FOXO3,IGHM,MAPK1,MIF,NCF1,NFATC2,NPC1,PIK3CB,PLA2G4A,RELA,STAT3,TNFSF10,VEGFA
Proliferação de linfócitos	2,52E-03	2,125	ABI2,ANXA1,BAX,BCL2L1,BLNK,CAMP,CCR5,CD244,CD40,CDKN1B,CXCL12,DAPP1,E2F2,EPHB2,ETS1,FAS,FCER1G,FLT3LG,FOXO3,FYB,GFI1,HSPA8,ICAM1,IGHG1,IGHM,IIGLL1/IIGLL5,IKZF2,IL15RA,IL21R,IL25,IL6ST,IL9R,JAG1,KLF9,LAT2,MFNG,MGAT5,MIF,NFATC1,NFATC2,NPC1,PIK3CB,PLAU,PTEN,RELA,SHB,SPN,STAT3,TCF7,TERT,TNFSF10,TRADD,VDR,VEGFA
Apoptose de leucócitos	4,60E-05	-1,348	AKTIP,ANXA1,BAX,BCL2L1,BLNK,CAMP,CCAR1,CCR5,CD40,CDKN1B,CXCL12,E2F2,EPA4,ETS1,FAS,FCER1G,FOXO3,GFI1,HCAR2,HSP90AB1,ICAM1,IGHM,IL15RA,IL6ST,MIF,MPO,NFATC1,NFATC2,NFKBIB,NPC1,NR5A1,PLA2G4A,PLCG1,PTEN,RB1,RELA,SPN,STAT3,TERT,TNFSF10,VDR,VEGFA
Função de leucócitos	7,35E-04	1,234	BCL2L1,CCR5,CD244,CD40,CMKLR1,CSPG4,CTTN,CXCL12,ETS1,FCER1G,FLT3LG,FYB,GFI1,HLA-A,HSP90AA1,ICAM1,IGHG1,IGHM,IL15RA,IL18R1,IL21R,IL9R,LAT2,LDHA,MAP3K4,MIF,MPO,MPP1,NCF1,NFATC1,NFATC2,PLA2G15,PLA2G4A,PLAU,PPIA,PTEN,RELA,SLA2,SPN,STAT3,TCF7,TNFSF10,VDR,VEGFA
Lesão aterosclerótica	8,76E-04	1,179	APOB,CCR5,CD40,ICAM1,IGHG1,MIF,MPO,NCF1,NPC1,NR3C2,PLA2G15,PLAU,SDC4,TNFSF10,VDR,VEGFA
Morte celular de células sanguíneas	9,23E-06	-1,211	AKTIP,ANXA1,APC,BAX,BCL2L1,BLNK,BNIP3L,CAMP,CCAR1,CCR5,CD40,CDKN1B,CXCL12,E2F2,E2F4,EPA4,ETS1,FAS,FCER1G,FOXO3,GFI1,HCAR2,HSP90AB1,ICAM1,IGHM,IL15RA,IL6ST,MIF,MPO,NFATC1,NFATC2,NFKBIB,NPC1,NR5A1,OSM,PLA2G4A,PLCG1,PPIA,PTEN,RB1,

Resposta inflamatória	1,81E-03	-0,267	ANXA1, BLNK, CAMP, CCR5, CD40, CMKLR1, CSPG4, CTSE, CXCL12, DEFA1 (includes others), E2F2, EDN1, ERBB2, ETS1, FCER1G, FOXO3, GDNF, HCAR2, HLA-A, ICAM1, IGHG1, IGHM, IL25, IL6ST, ITGAV, KLKB1, KRT1, MIF, MPO, MPP1, MUC1, MYO1F, NCF1, NFATC2, NFKBIB, NPC1, OSM, PARP4, PIK3CB, PLA2G4A, PLAU, PON2, PPIA, PSEN2, PTEN, RABGEF1, RELA, RPL13A, SBNO2, SDC4, SEMA7A, SERPING1, SNCA, SRC, STAT3, TRADD, VEGFA
Liberação de lipídios	6,95E-04	-1,442	ADM, ANXA1, CAMP, CD40, EDN1, ERBB2, FAS, FCER1G, HCAR2, HTR1B, MAPK1, MIF, NPC1, NR5A1, PLA2G4A, PLCG1, RABGEF1, SRC, TNFSF10, VEGFA
Renovação de lipídios	2,04E-03	-1,176	ACSL1, ADCYAP1R1, CD244, CHRM1, EDN1, PLA2G4A
Necrose	6,77E-06	-0,701	A4GALT, ACER2, ACTB, ADCY6, ADCYAP1R1, ADM, AKTIP, ANP32A, ANXA1, APC, API5, APOB, APOL1, ARFIP2, ARNT, ATAD2, ATG13, ATG14, ATXN3, BARD1, BAX, BAZ1A, BCL2L1, BLNK, BNIP3L, BRAT1, CALCR, CAMK4, CAMP, CCAR1, CCAR2, CCDC6, CCDC8, CCR5, CD40, CDC20, CDK1, CDKN1B, CHMP6, CHRM1, CRHR2, CSNK2A1, CSPG4, CTTN, CXCL12, CYB5A, DCTN3, DDN, DDX3X, DEFA1 (includes others), DHX9, E2F2, E2F4, ECEL1, EDN1, EMP2, EMP3, EPHA4, EPHB2, ERBB2, ERBB3, ERCC6, ETS1, FAF1, FANCL, FANCM, FAS, FCER1G, FLT3LG, FOXO3, GABRP, GALNT10, GAPDH, GCLM, GDNF, GFI1, GNMT, HCAR2, HIST1H2BO, HK2, HSP90AA1, HSP90AB1, HSPA8, HSPB6, ICAM1, IFI6, IGHG1, IGHM, IKZF2, IL15RA, IL21R, IL6ST, IL9R, IMMT, ITGAV, JAG1, KLF9, LAMA3, LDHA, MAML2, MAP3K4, MAPK1, MCOLN2, MCTS1, MDM4, MGAT5, MIF, MKI67, MPO, MTF1, MUC1, NCF1, NFATC1, NFATC2, NFKBIB, NPC1, NR3C2, NR5A1, NSMF, OSM, PBX3, PIK3CB, PKMYT1, PLA2G4A, PLAU, PLCE1, PLCG1, PON2, PPIA, PRKAR2B, PSEN2, PTEN, PTPRE, RAB28, RABGEF1, RARG, RASD1, RB1, RBX1, RELA, RFWD2, RRM2B, SAT1, SDC4, SEMA7A, SIAH1, SLC6A8, SLK, SMARCB1, SMOX, SNCA, SPN, SRC, SSTR5-AS1, STARD9, STAT3, STRADB, STYXL1, SVIL, TARDBP, TCF7, TDP2, TERT, TFF3, TGM3, TNFSF10, TOP2B, TRADD, TRIM39, TSC2, USP12, UXT, VDR, VEGFA, VTI1A, WTAP, WWOX, ZFP82

Os scores são calculados pelo *weighted Z-test* (*z-score* positivo – genes superexpressos; negativo - subexpressos).

V. DISCUSSÃO

Por ser um método eficaz para a perda de peso, as consequências da cirurgia bariátrica vêm sendo amplamente estudadas (Maser *et al*, 2013; Puzziferri *et al*, 2014; Gobato *et al*, 2014). A derivação gástrica em Y de Roux (RYGB) é uma cirurgia mal absorptiva do alimento e, portanto, associada a maior prevalência de deficiências nutricionais. Após a intervenção, a exposição do alimento aos sucos biliares e pancreáticos é modificada, diminuindo a digestão e, conseqüentemente, a absorção de nutrientes e micronutrientes, o que contribui para o agravamento ou aparecimento de deficiências nutricionais nos primeiros seis meses do período pós-operatório. Assim sendo, recomenda-se que todos os pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos de má absorção sejam tratados com suplementos multivitamínicos que contenham pelo menos o dobro da dose diária recomendada (RDA) (Tack & Deloose, 2014).

Estudo anteriormente realizado em nosso laboratório, com o mesmo protocolo de suplementação nutricional, mostrou, primeiramente, que apenas as vitaminas C (cofator essencial na biossíntese de carnitina, metabólito fundamental no processo de oxidação de ácidos graxos) e E apresentavam níveis séricos abaixo dos valores de referência em mulheres com obesidade mórbida. Com a suplementação, apenas os níveis de vitamina E foram restaurados (Campos, 2015). No entanto, diferentemente desses achados, outro estudo realizado no Brasil evidenciou outras deficiências nutricionais no período pré-operatório, especialmente de magnésio, vitaminas A, B12 e C, ferro e beta-caroteno, em um conjunto de 80 pacientes que aguardavam a realização da cirurgia bariátrica (Nicoletti *et al.*, 2013). Com relação ao período pós-cirúrgico, a literatura mostra o agravamento do quadro de desnutrição na ausência de suplementação nutricional (Toh *et al.*, 2009). Como tal situação não foi detectada em estudo

concomitante ao presente trabalho (Campos, 2015), considera-se que o suplemento vitamínico e de sais minerais fornecido às participantes teria sido eficaz na manutenção dos níveis dos micronutrientes dentro dos parâmetros de normalidade, até seis meses após o procedimento cirúrgico.

No entanto, é importante ressaltar a dificuldade em se determinar o fator ou fatores que contribuem para a diminuição dos níveis vitamínicos em indivíduos obesos. Estudos mostrando, por exemplo, concentrações inversamente proporcionais da vitamina C em relação ao IMC, indicam que deficiências de vitaminas antioxidantes, como as C e E, podem estar associadas ao processo inflamatório crônico característico da obesidade e ao consequente aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Johnston *et al.*, 2007; Garcia *et al.*, 2012). Gao *et al.* (2013) observaram que o sistema antioxidante pode estar comprometido em situações de deficiência de vitamina C, aumentando o risco de comorbidades associadas à obesidade. Dentre as importantes consequências do aumento da concentração de EROs está o fato dessas moléculas poderem danificar estruturas celulares, proteínas, lipídios e o DNA (Lopes, 2007; Seifried *et al.*, 2007; Fernández-Sánchez *et al.*, 2011). Realmente, nossos resultados demonstraram maiores níveis de alterações no DNA (oxidação das bases púricas e pirimídicas) em células do sangue periférico das mulheres obesas em relação às eutróficas. Resultados similares foram observados na avaliação da frequência de MN em linfócitos. Uma explicação para esses achados poderia ser, portanto, o estresse oxidativo resultante do desequilíbrio entre os níveis de agentes pró (EROs) e antioxidantes (p.ex. vitaminas C e E), levando a lesões oxidativas no DNA e deformações na sua estrutura, culminando em mutações gênicas e/ou cromossômicas (Birben *et al.*, 2012). Apóia esta hipótese, o relato que pacientes obesos apresentam, além do quadro clínico de dislipidemia e metabolismo de glicose alterados, taxas

elevadas de marcadores associados à inflamação e ao estresse oxidativo (Oliver *et al.*, 2010). Segundo O'Rourke (2008), mesmo que o tecido adiposo seja o principal foco de inflamação na obesidade, os efeitos resultantes são sistêmicos, uma vez que as adipocitocinas produzidas por esse tecido atuam em outros órgãos por meio de vias hormonais.

Sabe-se que o estresse oxidativo é importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças como câncer, diabetes tipo 2 e complicações cardiovasculares (De Pergola & Silvestris, 2013), e que a obesidade, por sua vez, está associada a maior risco para o desenvolvimento das neoplasias de cólon, gástrica e adenocarcinoma esofágico (Calle *et al.*, 2003; Beavis *et al.*, 2016). Embora o mecanismo de carcinogênese não seja completamente conhecido, o aumento do estresse oxidativo na obesidade e na síndrome metabólica, e o consequente aumento de danos no DNA estão possivelmente relacionados ao processo carcinogênico (Gallagher *et al.*, 2010; Luperini *et al.*, 2015). A literatura reporta a correlação positiva entre os níveis séricos da 8-hidroxi-2'-desoxi-guanosina (8-OHdG) e maior IMC, sugerindo que o dano oxidativo na molécula de DNA poderia ser decorrente da obesidade (Gandhi & Kaur, 2012). Além disso, sabe-se que lesões no DNA podem alterar a regulação do ciclo celular e processos como transcrição, replicação e reparo da molécula, o que poderia favorecer a tumorigênese (Al-Aubaidy & Jelinek, 2011). Acrescenta-se ao descrito, que as EROs geradas durante desordens metabólicas podem causar aumento da condição inflamatória devido a alterações em vias de sinalização do sistema redox e da expressão de genes de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, levando ao desenvolvimento de comorbidades (Reuter *et al.*, 2010). Embora a carcinogênese seja resultado da interação de múltiplos eventos celulares intrínsecos e extrínsecos, que incluem instabilidade genômica e anormalidades proliferativas, a inflamação tem como

característica marcante a capacidade de favorecer a maioria, se não todas, as alterações nucleares e moleculares que são cruciais na gênese tumoral (Hanahan *et al.*, 2011; Elinav *et al.*, 2013). De maneira geral, estudos recentes, como o desenvolvido por Ryan *et al.* (2015), sugerem que cerca de 25% dos casos de câncer diagnosticados no mundo poderiam ser evitados com a redução da incidência de obesidade. Segundo os autores, esta disfunção metabólica vem está intimamente associada ao câncer ginecológico, particularmente os de endométrio e ovário.

No entanto, dados recentes têm demonstrado que a suplementação multivitamínica e com micronutrientes antioxidantes (semelhante à utilizada no presente estudo) é efetiva na prevenção de danos oxidativos no DNA, além de atuar na manutenção da homeostase entre os sistemas pró e antioxidantes, diminuindo o estresse oxidativo (Kim *et al.*, 2013). De fato, nossos resultados mostraram que a redução dos níveis de danos primários no DNA e da frequência de micronúcleos seis meses após a cirurgia bariátrica (M3), pode ter sido consequência do equilíbrio orgânico estabelecido pela redução de peso e pela suplementação nutricional.

O teste do micronúcleo (MN) tem se mostrado importante ferramenta para a identificação precoce de alterações celulares e cromossômicas que podem resultar em distúrbios para a saúde. Considerando que os MN são estruturas representativas de eventos clastogênicos e aneugênicos que podem ter origem, dentre outros mecanismos, em lesões primárias no DNA (oxidação de bases, quebras de fita dupla etc.) que não foram efetivamente reparadas, as EROs geradas em virtude do estado inflamatório e do desequilíbrio nutricional poderiam ser as responsáveis pelo aumento da frequência de células micronucleadas no sangue periférico das mulheres obesas. Dados de estudos de intervenção alimentar sugerem que a combinação de vários micronutrientes é mais

eficaz na redução da frequência de MN que o tratamento com compostos isolados. De acordo com a revisão realizada por Thomas *et al.* (2011), a redução da média de MN em linfócitos de indivíduos saudáveis após a suplementação com múltiplos micronutrientes é de 33,4%, enquanto após a administração de micronutrientes isolados é de apenas 7,6%. Sabe-se que micronutrientes como o folato e a vitamina B12 desempenham importante função no metabolismo e manutenção do DNA (Ames, 2002; Fenech, 2001). Em situações de deficiência de folato, por exemplo, ocorre a incorporação excessiva de uracilas no DNA, fato que pode resultar em mutações pontuais, quebras de fita simples e dupla, quebras cromossômicas e formação de micronúcleos (Fenech, 2011; Dhillon *et al.*, 2011). Do mesmo modo, a deficiência de vitamina B12 pode levar a incorporação errônea de uracila no DNA por meio da restrição da síntese e processamento do folato (Zhang *et al.*, 2003).

Na era pós-genômica, a alimentação deixou de ser vista apenas como uma fonte vital de nutrientes para a manutenção da saúde humana e passou a ser considerada como agente capaz de atuar na expressão de características genéticas, benéficas ou não para o organismo. Há estudos mostrando a estreita relação entre a ingestão de micronutrientes e a expressão gênica, podendo ser esta relação a base do surgimento de processos fisiopatológicos ou, pelo contrário, representar um alvo mais precoce para, por exemplo, retardar o aparecimento de doenças crônicas associadas (Minihane *et al.*, 2015). Dados da literatura demonstram que muitos genes diferencialmente expressos em indivíduos obesos estão principalmente relacionados à inflamação e à resposta imune (Lee *et al.*, 2005), ao metabolismo lipídico e da glicose, e à adesão celular e metabolismo energético (Shea *et al.*, 2009). No presente estudo, a avaliação da expressão gênica em larga escala pela técnica de *microarray* mostrou que no grupo de mulheres obesas comparado ao grupo controle (M1 x C) ocorria, principalmente, aumento na expressão

de genes relacionados a vias de metabolismo energético (metabolismo e síntese de carboidratos, oxidação de D-glicose, metabolismo de ácidos graxos, hidrólise de ácidos graxos, síntese de lipídios, metabolismo de ácido fosfatídico) e inflamação (resposta inflamatória, ativação, migração e acúmulo leucocitário, secreção de prostaglandinas e necrose). Esses achados confirmam dados previamente descritos na literatura, indicando que as alterações em tais vias podem realmente estar relacionadas à gênese da obesidade ou serem consequências do processo obesogênico (Gregor & Hotamisligil, 2011; Lyons *et al.*, 2016). De fato, o aumento de lesões no DNA (quebras de fita simples e dupla, lesões oxidativas) observado em células do sangue das mulheres obesas (M1 – antes da suplementação) pode estar associado às alterações transcricionais de genes que atuam em vias de resposta inflamatória, uma vez que é conhecida a relação existente entre processo inflamatório, a produção de EROS e danos no DNA (Birben *et al.*, 2012).

São vários os eventos relacionados ao desencadeamento e propagação do estado inflamatório crônico característico da obesidade (Xue & Ideraabdullah, 2016). A exposição a ácidos graxos livres que iniciam a sinalização inflamatória, a infiltração de células imunológicas e mudanças nas populações de células inflamatórias, contribuem, significativamente, para a inflamação dos tecidos metabólicos (músculo esquelético, fígado e pâncreas). Sob condições normais de peso, o tecido adiposo tem a capacidade de armazenar de forma eficaz os ácidos graxos livres. No entanto, em indivíduos obesos, esta capacidade de armazenagem e metabolização é excedida, resultando em acúmulo e estado inflamatório devido à lipotoxicidade decorrente desses processos (Van Herpen & Schrauwen-Hinderling, 2008). Além disso, sabe-se que alterações em vias de metabolismo de ácidos graxos, carboidratos e citocinas inflamatórias, podem estar relacionadas à diminuição da capacidade antioxidante (Oliver *et al.*, 2010; Lyons *et al.*, 2016), além de poder inibir determinadas vias de reparo do DNA (Pertyńska-

Marczewska *et al.*, 2010). De fato, os dados referentes à comparação entre as obesas sob suplementação nutricional e aquelas não suplementadas (M2 *vs.* M1) sugerem que a suplementação e a perda peso decorrente do início do tratamento para a cirurgia bariátrica podem ter promovido a hipoexpressão de genes associados a vias do metabolismo lipídico (concentração de esteroides e colesterol) e a hiperexpressão de genes que atuam em vias que favorecem a viabilidade celular e reparo de DNA. Sabe-se que a dieta pode ter influência positiva ou negativa sobre o processo inflamatório e o estresse oxidativo, ambos relacionados a morte celular por apoptose ou necrose (Chrysohoou *et al.*, 2004; Sies *et al.*, 2005; Valentini *et al.*, 2015). Diversos fatores podem desencadear e propagar o estado inflamatório observado na obesidade, dentre os quais o consumo excessivo de energia e nutrientes e o tipo de nutriente ingerido. Em particular, a exposição excessiva a ácidos graxos pode aumentar o processo inflamatório por promover alterações na expressão de moléculas de adesão em macrófagos, mediadas por pela ação dos genes *TRL4* e *NFκB*, além de modular o metabolismo de eicosanóides (prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos) e a expressão de citocinas inflamatórias, afetando a homeostase celular (Valentini *et al.*, 2015; Lyons *et al.*, 2016).

Uma vez que a restrição calórica (também evidenciada pela diminuição significativa do peso corporal em M2) se mostra efetiva na regulação negativa de genes relacionados ao metabolismo de adipócitos (incluindo de ácidos graxos, síntese de triacilglicerol e via glicolítica) e a vias que afetam a função mitocondrial (por exemplo, genes envolvidos no ciclo de citrato e fosforilação oxidativa) (Johansson *et al.*, 2012), é de se supor que pode também promover a diminuição da capacidade de armazenamento e metabolismo energético dos adipócitos (Capel *et al.*, 2009), o que resultaria na modulação de diversas outras vias metabólicas. Dados na literatura mostram que processos oxidativos na molécula do colesterol podem ser modificados pela atividade de

vitaminas lipossolúveis com ação antioxidante (González-Castejón & Rodríguez-Casado, 2011). Estudos prospectivos demonstraram que a suplementação multivitamínica (vitamina B6, B12, ácido fólico, vitamina E, C e β -caroteno) foi capaz de alterar os índices de homocisteína e oxidação do LDL (*low density lipoprotein*) colesterol, protegendo o organismo contra danos lipídicos causados por radicais superóxido decorrentes do processo de peroxidação. Segundo os autores, os micronutrientes atuam por meio de atividade enzimática direta ou indireta, além do bloqueio de alterações proteicas e em ácidos nucleicos (Bunout *et al.*, 2000; Earnest *et al.*, 2003; Ceriello *et al.*, 2016).

Por outro lado, a hiperexpressão de genes relacionados a vias de viabilidade celular (*BAX*, *BLM*, *BRCA2*, *ICAM1*, *RUNX1T1* e *USP8*) e reparo do DNA observada nas mulheres obesas sob suplementação nutricional, poderia, pelo menos em parte, ser explicada pela atividade antioxidante de micronutrientes como o folato, o selênio e o zinco, por estarem, estes, associados à proteção contra danos genômicos, uma vez que atuam como cofatores em vias de síntese, reparo e metilação gênica, prevenindo a interação de EROs com o DNA (Fenech, 2010). Além disso, os agentes antioxidantes provenientes da suplementação poderiam ter atuado diretamente sobre as EROs, eliminando-as do ambiente celular (Ibero-Baraibar *et al.*, 2015). Diversos estudos têm demonstrado que a inflamação crônica de baixo grau, como a que ocorre na obesidade, pode ser reduzida pela ação de componentes da dieta, como polifenóis, ácidos graxos poliinsaturados e vitaminas antioxidantes, confirmando os efeitos benéficos e propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias desses micronutrientes sobre a inflamação, stress oxidativo, homeostase da glicose e alterações nos adipócitos (Frey & Vogel; 2011; Munoz & Costa, 2013).

Como as alterações decorrentes da cirurgia bariátrica são dinâmicas, a avaliação do perfil de expressão gênica em um único momento pode não ilustrar, por exemplo, os efeitos do remodelamento do tecido adiposo e os consequentes efeitos no organismo (Poitou *et al.*, 2015). De maneira geral, dados semelhantes aos obtidos após a suplementação nutricional (M2 *vs.* M1) foram obtidos seis meses após a cirurgia bariátrica (M3), em relação às obesas, antes da suplementação (M3 *vs.* M1), evidenciando a diminuição na expressão de genes de vias do processo inflamatório e metabolismo lipídico, o que confirma resultados previamente descritos na literatura (Clément *et al.*, 2004; Eissing *et al.*, 2013; González-Plaza *et al.*, 2016). Canello *et al.* (2005), por exemplo, descreveram melhorias no perfil inflamatório (redução do número de macrófagos no tecido adiposo e hipoeexpressão de genes envolvidos na quimiotaxia de macrófagos) de obesos três meses após a perda de peso resultante de cirurgia bariátrica. Vale ressaltar que, diferentemente do observado antes da realização da cirurgia (M2 *vs.* M1), quando a suplementação nutricional proporcionou a redução da expressão de genes de vias de metabolismo de esteroides, concentração de colesterol e apoptose, e aumento na expressão de genes de vias associadas à viabilidade celular e reparo de DNA (embora não havendo redução de lesões primárias no DNA e alterações citogenéticas), a perda de peso decorrente da cirurgia bariátrica, associada à suplementação nutricional (M3 *vs.* M1), demonstrou ser efetiva na restauração e preservação da função celular, atenuando o desbalanço nos níveis de agentes pró-oxidantes e contribuindo para a diminuição significativa de danos genéticos.

Comparados aos dados obtidos oito semanas após o início da suplementação nutricional (porém antes da cirurgia; M2), a análise da expressão gênica seis meses após o procedimento cirúrgico com concomitante suplementação nutricional (M3 *vs.* M2) mostrou a modulação de genes envolvidos em vias de metabolismo energético

(clivagem e hidrólise de carboidratos e síntese de diacilglicerol), degranulação de neutrófilos e granulócitos e liberação de prostaglandinas (processos inflamatórios), sugerindo que esta estaria associada à significativa perda de peso e consequente diminuição do IMC decorrente da cirurgia do que propriamente à suplementação alimentar. No entanto, não pode ser descartado o fato do rigoroso acompanhamento nutricional após a cirurgia bariátrica ser fundamental para evitar, ou minimizar, as deficiências decorrentes das modificações anatômicas, para o processo de cicatrização tecidual e para a preservação da massa magra durante a rápida perda de peso (Aills *et al.*, 2008). Como mencionado anteriormente, o procedimento cirúrgico por *RYGB* é um processo restritivo, mal absorptivo e que exerce efeitos neuro-hormonais, com várias alterações funcionais no organismo, as quais podem afetar mecanismos relacionados à fome e saciedade, levando à diminuição da ingestão de alimentos e alterações metabólicas (Kulick, 2010; Kushner & Neff, 2013; Neeha & Kinth, 2013; Bosnic, 2014). Contudo, de maneira geral, a literatura sugere que a melhora do quadro das doenças metabólicas após cirurgia bariátrica se dá, em grande parte, pela reversão dos estados endócrino e imunológico (processo inflamatório) associados ao tecido adiposo patogênico (Buchwald *et al.*, 2004; Bays *et al.*, 2009).

Embora os resultados deste estudo tenham demonstrado que a suplementação nutricional pode contribuir para melhorar o metabolismo lipídico e o processo inflamatório (aumento do metabolismo de esteroides e colesterol; redução e aumento dos níveis circulantes de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias, respectivamente) em mulheres obesas, não foi possível discriminar a extensão dos seus efeitos frente à cirurgia bariátrica, uma vez que não há dados referentes a pacientes submetidos ao procedimento cirúrgico, porém sem a suplementação vitamínica¹. Contudo, os dados obtidos fornecem informações importantes para pesquisas futuras, as quais objetivem a

identificação de novos alvos terapêuticos e medicamentos que proporcionem melhor qualidade de vida aos indivíduos com obesidade mórbida.

¹ A suplementação alimentar faz parte do protocolo estabelecido para o tratamento de pacientes submetidos a cirurgia bariátrica (*ASMBS - Allied Health Nutritional Guidelines for the Surgical Weight Loss Patient Allied Health Sciences Section Ad Hoc Nutrition Committee*)

VI. CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que a obesidade mórbida está associada ao aumento de danos genéticos em células sanguíneas e de citocinas inflamatórias circulantes, e a alterações na expressão de genes relativos a vias de metabolismo energético (metabolismo e síntese de carboidratos e ácidos graxos), resposta inflamatória (secreção de prostaglandinas) e necrose. Por outro lado, mostrou que a suplementação nutricional *per se* (antes da cirurgia bariátrica) atuou na modulação de genes de vias do metabolismo lipídico e energético e de viabilidade celular e reparo de DNA. Adicionalmente, os resultados evidenciaram que a perda de peso decorrente da cirurgia bariátrica, concomitantemente à suplementação alimentar, levaram à redução dos eventos genotóxicos, melhoria do perfil inflamatório e à modulação de genes envolvidos em vias como a quimiotaxia de macrófagos e inflamação do tecido adiposo. Embora exista dificuldade para definir qual(is) o(s) agentes (suplementação nutricional ou perda de peso) foi(ram) responsável(is) por cada uma das alterações observadas nas mulheres obesas, os dados evidenciaram que a suplementação nutricional esteve especialmente relacionada a vias que favorecem a viabilidade celular. Finalizando, do ponto de vista genético, este estudo demonstrou a importância da suplementação de vitaminas e micronutrientes a mulheres com obesidade mórbida, antes e após cirurgia bariátrica.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams TD, Gress RE, Smith SC, Halverson RC, Simper SC, Rosamond WD, Lamonte MJ, Stroup AM, Hunt SC. Long-term mortality after gastric bypass surgery. *N Engl J Med.* 2007; 357 (8): 753-61.

Aills L, Blankenship J, Buffington C, Furtado M, Parrott J. ASMBS Allied Health Nutritional Guidelines for the Surgical Weight Loss Patient. *Surg Obes Relat Dis.* 2008;4(5 Suppl):S73-108.

Al-Aubaidy HA & Jelinek HF. Oxidative DNA damage and obesity in type 2 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol.* 2011;164(6):899-904.

Ames BN, Wakimoto P. Are vitamin and mineral deficiencies a major cancer risk? *Nat Rev Cancer.* 2002;(2): 694–704.

Bal BS, Finelli FC, Koch TR. Origins of and Recognition of Micronutrient Deficiencies. *Curr Diab Rep.* 2011; (11): 136–41.

Bastien M, Poirier P, Lemieux I, Després JP. Overview of epidemiology and contribution of obesity to cardiovascular disease. *Prog Cardiovasc Dis.* 2014 Jan-Feb;56(4):369-81.

Bays HE, Laferrère B, Dixon J, Aronne L, González-Campoy JM, Apovian C, Wolfe BM; Adiposopathy and Bariatric Surgery Working Group. Adiposopathy and bariatric surgery: is 'sick fat' a surgical disease? *Int J Clin Pract.* 2009;63(9):1285-300.

Beavis AL, Smith AJ, Fader AN. Lifestyle changes and the risk of developing endometrial and ovarian cancers: opportunities for prevention and management. *Int J Womens Health.* 2016;8:151-67.

Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, et al. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J.* 2012; (5): 9–19

Bloomberg RD, Fleishman A, Nalle JE, Herron DM, Kini S. Nutritional deficiencies following bariatric surgery: what have we learned? *Obes Surg.* 2005;(2):145-54. Review.

Bordalo LA, Teixeira TF, Bressan J, Mourão DM. Bariatric surgery: how and why to supplement. *Rev Assoc Med Bras.* 2011; (57): 113-20.

Bosnic G. Nutritional requirements after bariatric surgery. *Crit Care Nurs Clin North Am.* 2014;26(2):255-62.

Bouchard L, Rabasa-Lhoret R, Faraj M, Lavoie M-E, Mill J, Pérusse L, Vohl M-C. Differential epigenomic and transcriptomic responses in subcutaneous adipose tissue between low and high responders to caloric restriction. *Am J Clin Nutr.* 2010;91:309–20.

Bray GA & Ryan DH. Update on obesity pharmacotherapy. *Ann N Y Acad Sci.* 2014;1311:1-13.

Buchwald H, Avidor Y, Braunwald E, Jensen MD, Pories W, Fahrbach K, Schoelles K. Bariatric Surgery A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA.* 2004;(292): 1724-28.

Buchwald H, Oien DM. Metabolic/bariatric surgery worldwide 2011. *Obesity Surgery* 2013;23(4):427–436.

Bunout D. Therapeutic potential of vitamin E in heart disease. *Expert Opin Investig Drugs.* 2000;9(11):2629-35. Review.

Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med*. 2003;348(17):1625-38.

Canello R, Henegar C, Viguerie N, Taleb S, Poitou C, Rouault C, Coupaye M, Pelloux V, Hugol D, Bouillot JL, Bouloumié A, Barbatelli G, Cinti S, Svensson PA, Barsh GS, Zucker JD, Basdevant A, Langin D, Clément K. Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes*. 2005;54(8):2277–86.

Cerdá C, Sánchez C, Climent B, Vázquez A, Iradi A, El Amrani F, Bediaga A, Sáez GT. Oxidative stress and DNA damage in obesity-related tumorigenesis.. *Adv Exp Med Biol*. 2014; (824):5-17.

Ceriello A, Testa R, Genovese S. Clinical implications of oxidative stress and potential role of natural antioxidants in diabetic vascular complications. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2016;26(4):285-92.

Chang SH, Stoll CR, Song J, Varela JE, Eagon CJ, Colditz GA. The effectiveness and risks of bariatric surgery: an updated systematic review and meta-analysis, 2003-2012. *JAMA Surg*. 2014;149(3):275-87

Chrysohoou C, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Das UN, Stefanadis C. Adherence to the Mediterranean diet attenuates inflammation and coagulation process in healthy adults: The ATTICA Study. *J Am Coll Cardiol*. 2004;44(1):152-8.

Clément K, Viguerie N, Poitou C, Carette C, Pelloux V, Curat CA, Sicard A, Rome S, Benis A, Zucker JD, Vidal H, Laville M, Barsh GS, Basdevant A, Stich V, Canello R,

Langin D. Weight loss regulates inflammation-related genes in white adipose tissue of obese subjects. *FASEB J.* 2004;18(14):1657-69.

Cozzolino SMF & Cominetti C. Biochemical and physiological bases of nutrition in different stages of life in health and disease, Monole, São Paulo, Brazil, 1ª edição, 2013.

Cruz IBM, Taufer M., and. Schwanke CHA. Genomics in the era of aging and its potential application in gerontology and geriatrics. *Institute of Geriatrics and Gerontology PUCRS: The Cradle of Academic Geriatrics In Brazil*, A. C. A. Souza, Ed., pp. 83–84, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (EDIPUCRS), Porto Alegre, Brazil, 1st edition, 2003.

Daisy Maria Favero Salvadori, Edmundo Kanan Marques, Lucia Regina Ribeiro. Mutagênese Ambiental. Edição 1. Editora ULBRA; 2003.

Dalcanale L, Oliveira CPMS, Faintuch J, Nogueira MA, Rondó P, Lima VMR, Mendonça S, Pajacki D, Mancini M, Carrilho FJ. Long-Term Nutritional Outcome After Gastric Bypass. *Obes Surg.* 2010; (20): 181–87.

Dauncey MJ. Recent advances in nutrition, genes and brain health. *Proceedings of the Nutrition Society.* 2012; (71): 581–591, 2012.

De Pergola G & Silvestris F. Obesity as a major risk factor for cancer. *J Obes.* 2013;2013:291546.

Dhillon VS, Thomas P, Iarmarcovai G, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Fenech M. Genetic polymorphisms of genes involved in DNA repair and metabolism influence micronucleus frequencies in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis.* 2011; 26 (1): 33-42.

Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon J-P, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, Zoeller RT, Gore AC. Endocrine-disrupting chemicals: An endocrine society scientific statement. *Endocrine Rev* 2009;30:293-342.

Dusinska M & Collins AR. The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. *Mutagenesis*. 2008;23(3):191-205.

Earnest CP, Wood KA, Church TS. Complex multivitamin supplementation improves homocysteine and resistance to LDL-C oxidation. *J Am Coll Nutr*. 2003;22(5):400-7.

Edwards C, Hindle AK, Fu S, Brody F. Downregulation of leptin and resistin expression in blood following bariatric surgery. *Surg Endosc*. 2011;25(6):1962-8.

Eissing L, Scherer T, Tödter K, Knippschild U, Greve JW, Buurman WA, Pinnschmidt HO, Rensen SS, Wolf AM, Bartelt A, Heeren J, Buettner C, Scheja L. De novo lipogenesis in human fat and liver is linked to ChREBP- β and metabolic health. *Nat Commun*. 2013;4:1528.

Elinav E, Nowarski R, Thaiss CA, Hu B, Jin C, Flavell RA. Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. *Nat Rev Cancer*. 2013;13(11):759-71.

Farhud D, Zarif Yeganeh M, Zarif Yeganeh M. Nutrigenomics and Nutrigenetics. *Iran J Public Health*. 2010; (4): 1-14.

Fenech M, Ferguson LR. Vitamins/minerals and genomic stability in humans. *Mutat Res*, 2001; (475): 1-6.

Fenech M. Dietary reference values of individual micronutrients and nutrients for genome damage prevention: current status and a road map to the future. *Am J Clin Nutr.* 2010; (91):1438S–54S.

Ferguson L. R. Natural and human-made mutagens and carcinogens in the human diet. *Toxicology.* 2002; (181-182): 79-82.

Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González A, Esquivel-Chirino C. Inflammation, Oxidative Stress, and Obesity. *International Journal of Molecular Sciences.* 2011; (12):3117-32.

Fraser LK, Clarke GP, Cade JE, Edwards KL. Fast food and obesity: a spatial analysis in a large United Kingdom population of children aged 13-15. *Am J Prev Med.* 2012;42(5):e77-85.

Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM, Lindgren CM, *et al.* A Common Variant in the *FTO* Gene Is Associated with Body Mass Index and Predisposes to Childhood and Adult Obesity. *Science.* 2007; 316(5826):889-94.

Frey SK, Vogel S. Vitamin A metabolism and adipose tissue biology. *Nutrients.* 2011;3(1):27-39.

Fujioka K, DiBaise JK, Martindale RG. Nutrition and metabolic complications after bariatric surgery and their treatment. *J Parenter Enteral Nutr.* 2011 (5):52S-9S.

Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol.* 2010; 316 (2): 129-39

Gallagher EJ, Fierz Y, Ferguson RD, LeRoith D. The pathway from diabetes and obesity to cancer, on the route to targeted therapy. *Endocr Pract.* 2010;16(5):864-73.

Gandhi G & Kaur G. Assessment of DNA damage in obese individuals. *Res. J. Biol.*, 2012; (2): 37–44.

Gao D, Trayhurn P, Bing C. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits the cytokine-induced secretion of MCP-1 and reduces monocyte recruitment by human preadipocytes. *Int J Obes (Lond)*. 2013; 37 (3): 357-65.

Garcia OP, Ronquillo D, Caamano Mdel C, Camacho M, Long KZ, Rosado JL. Zinc, vitamin A, and vitamin C status are associated with leptin concentrations and obesity in Mexican women: Results from a cross-sectional study. *Nutr. Metab. (Lond.)*. 2012; (9): 59.

Garcia-Bailo B, E-Soheemy A, Haddad PS, Arora P, Benzaied F, Karmali M, Badawi A. Vitamins D, C, and E in the prevention of type 2 diabetes mellitus: modulation of inflammation and oxidative stress. *Biologics*. 2011; (5): 7-19.

Gasteyger C, Suter M, Gaillard RC, Giusti V. Nutritional deficiencies after Roux-en-Y gastric bypass for morbid obesity often cannot be prevented by standard multivitamin supplementation. *Am J Clin Nutr*. 2008; 87(5): 1128-33.

Gene polymorphisms and increased DNA damage in morbidly obese women. Luperini BC, Almeida DC, Porto MP, Marcondes JP, Prado RP, Rasera I, Oliveira MR, Salvadori DM. *Mutat Res*. 2015;776:111-7.

Gentleman R, Carey V, Huber W, Irizarry R, Dudoit S. *Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor*. New York, NY: Springer (2005).

Giovanni M, Gambino R, Cassader M. Obesity, diabetes, and gut microbiota: the hygiene hypothesis expanded? *Diabetes Care*. 2010;33:2277-84.

Gloy Viktoria L, Briel Matthias, Bhatt Deepak L, Kashyap Sangeeta R, Schauer Philip R, Mingrone Geltrude et al. Bariatric surgery versus non-surgical treatment for obesity: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ*. 2013; 347:f5934.

Gobato RC, Seixas Chaves DF, Chaim EA. Micronutrient and physiologic parameters before and 6 months after RYGB. *Surg Obes Relat Dis*. 2014;10(5):944-51.

González-Castejón M, Rodríguez-Casado A. Dietary phytochemicals and their potential effects on obesity: a review. *Pharmacol Res*. 2011;64(5):438-55.

González-Plaza JJ, Gutiérrez-Repiso C, García-Serrano S, Rodríguez-Pacheco F, Garrido-Sánchez L, Santiago-Fernández C, García-Arnés J, Moreno-Ruiz FJ, Rodríguez-Cañete A, García-Fuentes E. Effect of Roux-en-Y gastric bypass-induced weight loss on the transcriptomic profiling of subcutaneous adipose tissue. *Surg Obes Relat Dis*. 2016;12(2):257-63.

Gregor MF & Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:415-45.

Greiner T, Bäckhed F. Effects of the gut microbiota on obesity and glucose homeostasis. *Trends Endocrinol Metab* 2011;22:117-23.

Hall CJ, Sanderson LE, Crosier KE, Crosier PS. Mitochondrial metabolism, reactive oxygen species, and macrophage function-fishing for insights. *J Mol Med (Berl)*. 2014;92(11):1119-28.

Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.

Harvie MN, Pegington M, Mattson MP, Frystyk J, Dillon B, Evans G, The effects of intermittent or continuous energy restriction on weight loss and metabolic disease risk markers: a randomized trial in young overweight women. *Int J Obes (Lond)*. 2011; (5): 714-27.

Henninger AMJ, Eliasson B, Jenndahl LE, Hammarstedt A. Adipocyte Hypertrophy, Inflammation and Fibrosis Characterize Subcutaneous Adipose Tissue of Healthy, Non-Obese Subjects Predisposed to Type 2 Diabetes. 2014; *PLoS ONE*. (8): e105262.

Hindle AK, Edwards C, McCaffrey T, Fu SW, Brody F. Reactivation of adiponectin expression in obese patients after bariatric surgery. *Surg Endosc*. 2010;24(6):1367-73.

Huang T & Hu FB. Gene-environment interactions and obesity: recent developments and future directions. *BMC Med Genomics*. 2015;8 Suppl 1:S2.

Ibero-Baraibar I, Azqueta A, Lopez de Cerain A, Martinez JA, Zulet MA. Assessment of DNA damage using comet assay in middle-aged overweight/obese subjects after following a hypocaloric diet supplemented with cocoa extract. *Mutagenesis*. 2015;30(1):139-46.

Imes CC, Burke LE. The Obesity Epidemic: The United States as a Cautionary Tale for the Rest of the World. *Curr Epidemiol Rep*. 2014 Jun 1;1(2):82-88.

Institute of Medicine. Dietary References Intakes. Disponível em: <http://www.iom.edu/>. Acesso em 16 de junho de 2015.

Jin-Qiang C, Brown TR, Russo J. Regulation of energy metabolism pathways by estrogens and estrogenic chemicals and potential implications in obesity associated with increased exposure to endocrine disruptors. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1793:1128-43.

Joara de Paula Campos. Relação entre a ingestão de micronutrientes, perfil de citocinas plasmáticas e expressão dos genes IL-6, IL-10 e TNF- α na obesidade mórbida [dissertação de mestrado]. Botucatu – SP: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Instituto de Biociências de Botucatu; 2015.

Johansson LE, Danielsson AP, Parikh H, Klintonberg M, Norström F, Groop L, Ridderstrale M. Differential gene expression in adipose tissue from obese human subjects during weight loss and weight maintenance. *Am J Clin Nutr*. 2012;96:196 – 207.

Johnston CS, Beezhold BL, Mostow B, Swan PD. Plasma vitamin C is inversely related to body mass index and waist circumference but not to plasma adiponectin in nonsmoking adults. *J. Nutr*. 2007; (137): 1757–62.

Kalarchian M, Turk M, Elliott J, Gourash W. Lifestyle management for enhancing outcomes after bariatric surgery. *Curr Diab Rep*. 2014; (10):540.

Karaman A, Aydın H, Geçkinli B, Çetinkaya A, Karaman S. DNA damage is increased in lymphocytes of patients with metabolic syndrome. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2015;782:30-5.

Karbownik-Lewinska M, Szosland J, Kokoszko-Bilska A, Stepniak J, Zasada K, Gesing A, Lewinski A. Direct contribution of obesity to oxidative damage to macromolecules. *Neuro Endocrinol Lett*. 2012;33(4):453-61.

Keith SW, Redden DT, Katzmarzyk PT, Boggiano MM, Hanlon EC, Benca RM, Ruden D, Pietrobelli A, Barger JL, Fontaine KR, Wang C, Aronne LJ, Wright SM, Baskin M, Dhurandhar NV, Lijoi MC, Grilo CM, DeLuca M, Westfall AO, Allison DB. Putative contributors to the secular increase in obesity: exploring the roads less traveled. *Int J Obesity*. 2006; 30:1585–94.

Kim YJ, Ahn YH, Lim Y, Kim JY, Kim J, Kwon O. Daily nutritional dose supplementation with antioxidant nutrients and phytochemicals improves DNA and LDL stability: a double-blind, randomized, and placebo-controlled trial. *Nutrients*. 2013; 5 (12): 5218-32.

Kolehmainen M, Salopuro T, Schwab US, Kekäläinen J, Kallio P, Laaksonen DE, Pulkkinen L, Lindi VI, Sivenius K, Mager U, Siitonen N, Niskanen L, Gylling H, Rauramaa R, Uusitupa M. Weight reduction modulates expression of genes involved in extracellular matrix and cell death: the GENOBIN study. *Int J Obes (Lond)*. 2008; 32:292–303.

Kulick D, Hark L, Deen D. The bariatric surgery patient: a growing role for registered dietitians. *J Am Diet Assoc*. 2010;110(4):593–9

Kushner R & Neff L. Surgery for severe obesity. *Am J Mens Health*. 2013;7:255–64.

Le Lay S, Simard G, Martinez MC, Andriantsitohaina R. Oxidative stress and metabolic pathologies: from an adipocentric point of view. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:908539.

Lee YH, Nair S, Rousseau E, Allison DB, Page GP, Tataranni PA, Bogardus C, Permana PA. Microarray profiling of isolated abdominal subcutaneous adipocytes

from obese vs non-obese Pima Indians: increased expression of inflammation-related genes. *Diabetologia*. 2005;48(9):1776-83.

Liu B & Qian SB. Translational regulation in nutrigenomics. *American Society for Nutrition*. 2011;(2): 511–519.

Llewellyn C & Wardle J. Behavioral susceptibility to obesity: Gene-environment interplay in the development of weight. *Physiol Behav*. 2015;152(Pt B):494-501.

Lyons CL, Kennedy EB, Roche HM. Metabolic Inflammation-Differential Modulation by Dietary Constituents. *Nutrients*. 2016;8(5). pii: E247.

MacLaren R1, Cui W, Simard S, Cianflone K. Influence of obesity and insulin sensitivity on insulin signaling genes in human omental and subcutaneous adipose tissue. *J Lipid Res*. 2008;49(2):308-23.

Maggard MA, Shugarman LR, Suttorp M, Maglione M, Sugerman HJ, Livingston EH. At al. Meta-analysis: surgical treatment of obesity. *Ann Intern Med*. 2005 ;142 (7): 547-59.

Manning S, Pucci A, Batterham RL. Roux-en-Y gastric bypass: effects on feeding behavior and underlying mechanisms. *J Clin Invest*. 2015;125(3):939-48.

Marinho HS, Real C, Cyrne L, Soares H, Antunes F. Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors. *Redox Biol*. 2014; (2): 535–562.

Márquez-Quiñones A, Mutch DM, Debarb C, Wang P, Combes M, Roussel B, Holst C, Martinez JA, Handjieva-Darlenska T, Kalouskova P, Jebb S, Babalis D, Pfeiffer AF, Larsen TM, Astrup A, Saris WH, Mariman E, Clément K, Vidal H, Langin D, Viguerie N; DiOGenes Project. Adipose tissue transcriptome reflects variations between subjects

with continued weight loss and subjects regaining weight 6 mo after caloric restriction independent of energy intake. *Am J Clin Nutr.* 2010;92(4):975-84.

Maser RE, Lenhard MJ, Peters MB, Irgau I, Wynn GM. Effects of surgically induced weight loss by Roux-en-Y gastric bypass on cardiovascular autonomic nerve function. *Surg Obes Relat Dis.* 2013;9(2):221-6.

Masoodi M, Kuda O, Rossmeisl M, Flachs P, Kopecky J. Lipid signaling in adipose tissue: Connecting inflammation & metabolism. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1851(4):503-18.

Masotti A, Da Sacco L, Bottazzo GF, Alisi A. Microarray Technology: A Promising Tool in Nutrigenomics. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2010;50(7):693-8.

Mattar SG, Velcu LM, Rabinovitz M, Demetris AJ, Krasinskas AM, Barinas-Mitchell E, Eid GM, Ramanathan R, Taylor DS, Schauer PR. Surgically-Induced Weight Loss Significantly Improves Nonalcoholic Fatty Liver Disease and the Metabolic Syndrome. *Ann Surg.* 2005;242(4):610-7; discussion 618-20.

McGown C, Birerdinc A, Younossi ZM. Adipose tissue as an endocrine organ. *Clin Liver Dis.* 2014;18(1):41-58.

Minihane AM, Vinoy S, Russell WR, Baka A, Roche HM, Tuohy KM, Teeling JL, Blaak EE, Fenech M, Vauzour D, McArdle HJ, Kremer BH, Sterkman L, Vafeiadou K, Benedetti MM, Williams CM, Calder PC. Low-grade inflammation, diet composition and health: current research evidence and its translation. *Br J Nutr.* 2015;114(7):999-1012. Review.

Miras AD & le Roux CW. Mechanisms underlying weight loss after bariatric surgery. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013;10(10):575-84. Review.

Morgan MJ & Z-g Liu. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell Res*. 2011; (21): 103–115.

Muñoz A & Costa M. Nutritionally mediated oxidative stress and inflammation. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:610950.

Murdolo G, Piroddi M, Luchetti F, Tortoioli C, Canonico B, Zerbinati C, Galli F, Iuliano L. Biochimie. Oxidative stress and lipid peroxidation by-products at the crossroad between adipose organ dysregulation and obesity-linked insulin resistance. *Biochimie*. 2013;95(3):585-94.

Mutagênese Ambiental. Autor: Daisy Maria Fávero Salvadori. Editora da ULBRA, Edição: 1; 2003. ISBN: 8575280678, 9788575280676.

Neeha VS & Kinth P. Nutrigenomics research: a review. *J Food Sci Technol*. 2013;50(3):415-28.

Nicoletti CF, Lima TP, Donadelli SP, Salgado W Jr, Marchini JS, Nonino CB. New look at nutritional care for obese patient candidates for bariatric surgery. *Surg Obes Relat Dis*. 2013;9(4): 520-5.

Olbers T, Lonroth H, Fagevik-Olsen M, Lundell L. Laparoscopic gastric bypass: development of technique, respiratory function, and long-term outcome. *Obes. Surg*. 2003;13: 364–370.

Oliver SR, Rosa JS, Milne GL, Pontello AM, Borntrager HL, Heydari S. Increased Oxidative Stress and Altered Substrate Metabolism in Obese Children. *Int J of Ped Obesity*. 2010; (5): 436-44.

O'Rourke RW. Inflammation in obesity-related diseases. *Surgery*. 2009; (3): 255-9.

Palou A & Bonet ML. Challenges in obesity research. *Nutr Hosp*. 2013; 28 (5):144-53.

Patel S. Emerging trends in nutraceutical applications of whey protein and its derivatives. *J Food Sci Technol*. 2015;52(11):6847-58.

Pertyńska-Marczewska M, Głowacka E, Grodzicka A, Sobczak M, Cypryk K, Wilczyński JR, Wilczyński J. Profile of peripheral blood neutrophil cytokines in diabetes type 1 pregnant women and its correlation with selected parameters in the newborns. *Am J Reprod Immunol*. 2010;63(2):150-60.

Pivovarova O, Gögebakan Ö, Sucher S, Groth J, Murahovschi V, Kessler K, Osterhoff M, Rudovich N, Kramer A, Pfeiffer AF. Regulation of the clock gene expression in human adipose tissue by weight loss. *Int J Obes (Lond)*. 2016 Feb 23.

Plasma folate, vitamin B6, vitamin B12, homocysteine, and risk of breast cancer. Zhang SM, Willett WC, Selhub J, Hunter DJ, Giovannucci EL, Holmes MD, Colditz GA, Hankinson SE. *J Natl Cancer Inst*. 2003;95(5):373-80.

Poitou C, Perret C, Mathieu F, Truong V, Blum Y, Durand H, Alili R, Chelghoum N, Pelloux V, Aron-Wisnewsky J, Torcivia A, Bouillot JL, Parks BW, Ninio E, Clément K, Tiret L. Bariatric Surgery Induces Disruption in Inflammatory Signaling Pathways Mediated by Immune Cells in Adipose Tissue: A RNA-Seq Study. *PLoS One*. 2015;10(5):e0125718.

Prado RP, Santos BF, De Souza Pinto CL, De Assis KR, Salvadori DM, Ladeira MS. Influence of diet on oxidative DNA damage, uracil misincorporation and DNA repair capability. *Mutagenesis*. 2010. 25 (5): 483-7.

Puzziferri N, Roshek TB 3rd, Mayo HG, Gallagher R, Belle SH, Livingston EH. Long-term follow-up after bariatric surgery: a systematic review. *JAMA*. 2014; 312 (9): 934-42.

Relação entre a ingestão de micronutrientes, perfil de citocinas plasmáticas e expressão dos genes IL-6, IL-10 e TNF- α na obesidade mórbida. Campos, Joara de Paula [UNESP] (2015-04-27) [Dissertação de mestrado].

Rendo-Urteaga T, García-Calzón S, González-Muniesa P, Milagro FI, Chueca M, Oyarzabal M, Azcona-Sanjulián MC, Martínez JA, Martí A. Peripheral blood mononuclear cell gene expression profile in obese boys who followed a moderate energy-restricted diet: differences between high and low responders at baseline and after the intervention. *Br J Nutr*. 2015;113(2):331-42.

Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med*. 2010;49(11):1603-16.

Romacho T, Elsen M, Röhrborn D, Eckel J. Adipose tissue and its role in organ crosstalk. *Acta Physiol (Oxf)*. 2014;210(4):733-53.

Ryan AM, Cushen S, Schellekens H, Bhuachalla EN, Burns L, Kenny U, Power DG. Poor awareness of risk factors for cancer in Irish adults: results of a large survey and review of the literature. *Oncologist*. 2015; 20(4):372-8.

Sahaf B, Heydari K, Herzenberg LA, Herzenberg LA. The extracellular microenvironment plays a key role in regulating the redox status of cell surface proteins in HIV-infected subjects. *Arch Biochem Biophys*. 2005; (434):26-32.

Sales NM, Pelegrini PB, Goersch MC. Nutrigenomics: definitions and advances of this new science. *J Nutr Metab*. 2014; 2014:202759.

Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner JA. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *The J of Nut Bioch*. 2007; (18): 567-79.

Shea J, French CR, Bishop J, Martin G, Roebathan B, Pace D, Fitzpatrick D, Sun G. Changes in the transcriptome of abdominal subcutaneous adipose tissue in response to short-term overfeeding in lean and obese men. *Am J Clin Nutr*. 2009;89(1):407-15.

Sies H, Stahl W, Sevanian A. Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. *J Nutr*. 2005;135(5):969-72.

Singla P, Bardoloi A, Parkash AA. Metabolic effects of obesity: A review. *World J Diabetes*. 2010; 1(3):76-88.

Skurk T, Alberti-Huber C, Herder C, Hauner H. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92:1023-33.

Smyth GK. Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol*. 2004;3:Article3.

Stienstra R, Duval C, Müller M, Kersten S. PPARs, obesity, and inflammation. *PPAR Res*. 2007;2007:95974.

Tack J & Deloouse E. Complications of bariatric surgery: dumping syndrome, reflux and vitamin deficiencies. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2014; (4):741-9. Review.

Thomas P, Wu J, Dhillon V, Fenech M, Ames BN, Wakimoto P. Effect of dietary intervention on human micronucleus frequency in lymphocytes and buccal cells. *Mutagenesis*. 2011; 26 (1): 69-76.

Toh SY, Zarshenas N, Jorgensen J. Prevalence of nutrient deficiencies in bariatric patients. *Nutrition*. 2009; 25:1150-6.

Valentini L, Pinto A, Bourdel-Marchasson I, Ostan R, Brigidi P, Turrioni S, Hrelia S, Hrelia P, Bereswill S, Fischer A, Leoncini E, Malaguti M, Blanc-Bisson C, Durrieu J, Spazzafumo L, Buccolini F, Pryen F, Donini LM, Franceschi C, Lochs H. Impact of personalized diet and probiotic supplementation on inflammation, nutritional parameters and intestinal microbiota - The "RISTOMED project": Randomized controlled trial in healthy older people. *Clin Nutr*. 2015;34(4):593-602

Van Herpen NA & Schrauwen-Hinderling VB. Lipid accumulation in non-adipose tissue and lipotoxicity. *Physiol Behav*. 2008;94(2):231-41.

Vuillaume ML, Naudion S, Banneau G, Diene G, Cartault A, Cailley D, Bouron J, Toutain J, Bourrouillou G, Vigouroux A, Bouneau L, Nacka F, Kieffer I, Arveiler B, Knoll-Gellida A, Babin PJ, Bieth E, Jouret B, Julia S, Sarda P, Geneviève D, Faivre L, Lacombe D, Barat P, Tauber M, Delrue MA, Rooryck C. New candidate loci identified by array-CGH in a cohort of 100 children presenting with syndromic obesity. *Am J Med Genet A*. 2014;164A (8): 1965-75.

Weiss TW, Seljeflot I, Hjerkin EM, Arnesen H. Adipose tissue pro-inflammatory gene expression is associated with cardiovascular disease. *International Journal of Clinical Practice*. 2011; (65): 939–944.

WHO, 2015. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>. Acessado em 15 de abril de 2016.

Xue J, Ideraabdullah FY. An assessment of molecular pathways of obesity susceptible to nutrient, toxicant and genetically induced epigenetic perturbation. *J Nutr Biochem*. 2016;30:1-13.

Zduńczyk Z & Pareek CS. Application of nutrigenomics tools in animal feeding and nutritional research. *J Anim Feed Sci*. 2009; 18 :3–16.

ANEXO 1



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu



Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
e-mail coordenadoria: tsarden@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde
em 30 de abril de 1997

Botucatu, 02 de abril de 2012

Of. 128/2012

Ilustríssima Senhora
Prof^a. Dr^a. Daisy Maria Fávero Salvadori
Departamento de Patologia da
Faculdade de Medicina de Botucatu

Prezada Prof^a Daisy,

De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa (**Protocolo CEP 4159-2012**) "**Relação entre a ingestão de neuronutrientes e alterações citogenéticas e genômicas na obesidade mórbida**", a ser conduzido por Bruno César Ottoboni Luperini, orientado por Vossa Senhoria, com a colaboração de Danielle Cristina de Almeida Dionizio, Maria Rita Marques de Oliveira e Patrícia Sousa Novais, recebeu do relator parecer **favorável**, aprovado em reunião de 02/04/2012.

OBS: Não há necessidade de envio à CONEP, pois cumpre a Resolução 340/2004-Genética Humana.

Situação do Projeto: APROVADO. Os pesquisadores deverão apresentar ao CEP ao final da execução do Projeto o "**Relatório Final de Atividades**".

Atenciosamente,

Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP

Ficha de triagem



Nome: _____ Sexo: M () F ()

Data: ___/___/___

Data de nascimento: ___/___/___

Etnia _____ Cor da
pele _____Local do nascimento:

Fones para contato _____

2) Problemas de saúde

<input type="checkbox"/>	Colesterol elevado
<input type="checkbox"/>	Triglicérides elevado
<input type="checkbox"/>	Ácido úrico alto
<input type="checkbox"/>	Pressão alta
<input type="checkbox"/>	Diabetes

<input type="checkbox"/>	Problema cardíaco
<input type="checkbox"/>	Problemas com a tireóide
<input type="checkbox"/>	Depressão
<input type="checkbox"/>	Outros:
<input type="checkbox"/>	

Observações:

3) Tabagista () SIM () NÃO

4) Medicamentos que está usando:

5) Assinale quais destas doenças seus pais, tios ou irmãos têm:

	Diabetes		Pressão Alta		Obesidade		Problema no coração	
	P	M	P	M	P	M	P	M
Pai/mãe								
Avo(a)								
Tio(a)								
Irmã(o)								

--	--	--	--	--	--	--	--	--

P = paterno M = materno

Peso - Kg	Altura - m	IMC – Kg/m ²
-----------	------------	-------------------------

6) História do peso

6.1. Há quanto tempo está com esse peso? _____

6.2. Qual foi o seu maior peso? _____ Há quanto tempo? _____

6.3. Qual foi o seu menor peso? _____ Há quanto tempo? _____

6.4. Ganha peso com facilidade?

() sim () Não

6.5. Faz algum controle alimentar para a manutenção do peso atual?

() sim () Não

6.6. Faz exercícios físicos para controlar o peso?

() sim () Não

6.7. Já fez uso de medicamento para controlar o peso?

() sim () Não

6.8. Já fez dieta para controlar peso?

() sim () Não

Linha do tempo:

Como você caracteriza o seu peso corporal nas seguintes fases?

	Baixo peso	Peso normal	Excesso de peso	Obeso	Muito obeso
Bebe					
Criança					

Adolescente					
Jovem					
Adulto					

ANEXO 3

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - PACIENTES

Faculdade de Medicina da UNESP – Botucatu

Departamento de Patologia

Eu _____,
RG _____, Estado Civil _____, Idade _____ anos, Residente à
_____, nº _____,
Complemento _____, Bairro _____, Cidade
_____, Telefone (____) _____, estou sendo convidada a participar

de um estudo sobre obesidade. A obesidade é uma doença que envolve fatores que herdamos dos nossos pais, fatores ambientais e de estilo de vida. A obesidade pode trazer causar problemas sociais, psicológicas, além de hipertensão arterial, diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e vários tipos de câncer. Portanto, a obesidade tornou-se um desafio para vários pesquisadores que buscam novos métodos de tratamento e de prevenção da doença. Assim, o estudo que estamos apresentando propõe avaliar se a ingestão de alguns nutrientes pode ter influência sobre os efeitos adversos da obesidade e da cirurgia bariátrica (de redução do estômago), especialmente sobre os fatores herdados (genéticos). Esperamos que os resultados forneçam informações importantes para entender como a obesidade pode causar tantos problemas à saúde e como podemos reduzir esses problemas.

Esse termo de consentimento que você deverá assinar foi elaborado de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, sobre pesquisa envolvendo seres humanos.

I. DADOS SOBRE A PESQUISA

Convido a Sra a participar do Projeto de Pesquisa “**Relação entre micronutrientes e efeitos citogenéticos e genômicos na obesidade mórbida**” que será desenvolvido por mim, **Bruno Cesar Ottoboni Luperini**, aluno de doutorado, sob a orientação da Dra. Daisy Maria Favero Salvadori no Laboratório de Toxicogenômica e Nutrigenômica, do Departamento de Patologia, da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

1. Avaliação do Risco da Pesquisa: Não haverá riscos extras pois a coleta da amostra de sangue para este estudo será feita durante as coletas realizadas no acompanhamento clínico preparatório para a cirurgia de redução de estômago.

2. Duração Prevista da Participação do Paciente Durante a Coleta e Entrevista: vinte minutos.

II. EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE SOBRE A PESQUISA

1. Justificativa e Objetivos da pesquisa: como o número de pessoas obesas vem crescendo muito e como a obesidade é uma doença que causa muitos problemas de saúde, a medicina tem buscado formas para prevenir e tratar essa doença e a cirurgia de redução de estômago (cirurgia bariátrica) é uma das formas. Por outro lado, esta pesquisa que estamos propondo tem por objetivo avaliar se consumo de algumas vitaminas e sais minerais pode auxiliar na prevenção e também na redução dos malefícios da obesidade, especialmente aqueles sobre a nossa constituição genética (as características que herdamos dos nossos pais).

2. Procedimentos utilizados: para esta pesquisa serão utilizadas amostras de sangue (10 mL) que serão coletadas em 3 momentos diferentes: o primeiro, uma semana antes do início da suplementação vitamínica e 10 semanas antes da cirurgia; o segundo, dois meses após o início da suplementação e uma semana antes da cirurgia; o terceiro, seis meses após a cirurgia bariátrica. Esse sangue será utilizado para analisar a existência de alguma alteração genética causada pela obesidade e se elas melhoram após a ingestão de vitaminas antes e após a cirurgia. Além disso, cada pessoa responderá a algumas perguntas (questionário) para saber sobre seu estado de saúde e se existem outras pessoas obesas na família. Todas as informações obtidas serão confidenciais, e tanto as amostras de sangue como os dados pessoais serão processados e armazenados no Laboratório de Toxicogenômica e Nutrigenômica do Depto. de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

3. Benefícios que poderão ser obtidos: Não haverá benefício imediato ao participante do estudo. Contudo, os resultados poderão contribuir para novas formas de tratamento e prevenção da obesidade e das doenças associadas a ela.

4. Procedimentos vantajosos para o indivíduo: será fornecida gratuitamente ao participante do estudo a suplementação vitamínica que é sempre recomendada pelo médico antes e após a realização da cirurgia de redução.

Declaro ter sido esclarecido sobre os seguintes pontos:

1. Para a participação neste estudo, terei que assinar uma autorização em duas vias, sendo uma entregue a mim e outra será mantida em arquivo pelo pesquisador, para a

- coleta de 3 amostras de 10 ml de meu sangue, em 3 momentos diferentes, que serão utilizados no estudo;
2. a minha participação como voluntário deverá ter a duração de aproximadamente 20 minutos, ocasião em que serão feitos os esclarecimentos e será coletada amostra do meu sangue;
 3. me será fornecida, gratuitamente, a suplementação vitamínica que deverei tomar por período de 8 meses antes e após a cirurgia de redução de estômago;
 4. terei a liberdade de responder ou não a qualquer pergunta;
 5. fui esclarecido que não receberei qualquer remuneração financeira por participar desta pesquisa;
 6. meu nome será mantido em sigilo, assegurando, assim, a minha privacidade. Se desejar, deverei ser informado sobre os resultados da pesquisa e ter acesso, a qualquer momento, às informações sobre procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa, a fim de esclarecer eventuais dúvidas;
 7. fui esclarecido sobre a disponibilidade de assistência no HCFMUNESP, por eventuais danos à minha saúde, decorrentes da pesquisa;
 8. poderei me recusar a participar ou mesmo retirar meu consentimento a qualquer momento da pesquisa, sem nenhum prejuízo ou penalização.
 9. fui informado que os pesquisadores responsáveis pela pesquisa estarão à minha disposição para quaisquer esclarecimentos a cerca da pesquisa;
 10. qualquer dúvida ou solicitação de esclarecimentos poderei entrar em contato com a equipe científica da Profª Dra. Daisy Maria Fávero Salvadori pelo telefone (14) 3811-7210 Ramal 220.
 11. qualquer dúvida adicional, poderei entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa, através do fone: (14) 3811-6143."

Diante dos esclarecimentos prestados, concordo em participar, como voluntária(o) do estudo "**Relação entre micronutrientes e efeitos citogenéticos e genômicos na obesidade mórbida**".

Botucatu, ____ / ____ / ____

Assinatura do Voluntário

Assinatura do Pesquisador

**NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELA PESQUISA,
PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES
ADVERSAS.**

Pesquisador Responsável: Bruno Cesar Ottoboni Luperini

Endereço: Rua Humberto Milanesi Nº 159 Pq. Res. Primavera Botucatu - SP

Telefone: (14) 8108-3443 (14) 3354-3739

E-mail: bruno_luperini@yahoo.com.br

Pesquisador Orientador: Prof^a Dra. Daisy Maria Fávero Salvadori

Endereço: R. Antonio Sabino Santa Rosa, 70, ap 34C – Vila Santana – Botucatu - SP

Telefone: (14) 3811-7263

E-mail: dfavero@fmb.unesp.br

ANEXO 4

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - GRUPO CONTROLE

Faculdade de Medicina da UNESP – Botucatu

Departamento de Patologia

Eu _____,
RG _____, Estado Civil _____, Idade _____ anos, Residente na
_____, nº _____,
Complemento _____, Bairro _____, Cidade
_____, Telefone (____) _____, estou sendo convidada a participar
de um estudo sobre obesidade. A obesidade é uma doença que envolve fatores que
herdamos dos nossos pais, fatores ambientais e de estilo de vida. A obesidade pode
trazer causar problemas sociais, psicológicas, além de hipertensão arterial, diabetes tipo
2, doenças cardiovasculares e vários tipos de câncer. Portanto, a obesidade tornou-se
um desafio para vários pesquisadores que buscam novos métodos de tratamento e de
prevenção da doença. Assim, o estudo que estamos apresentando propõe avaliar se a
ingestão de alguns nutrientes pode ter influência sobre os efeitos adversos da
obesidade e da cirurgia bariátrica (de redução do estômago), especialmente sobre os
fatores herdados (genéticos). Esperamos que os resultados forneçam informações
importantes para entender como a obesidade pode causar tantos problemas à saúde e
como podemos reduzir esses problemas.

Esse termo de consentimento que você deverá assinar foi elaborado de acordo com a Resolução
196/96 do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, sobre pesquisa envolvendo seres
humanos.

I. DADOS SOBRE A PESQUISA

Convido a Sra a participar do Projeto de Pesquisa “**Relação entre micronutrientes e efeitos citogenéticos e genômicos na obesidade mórbida**” que será desenvolvido por mim, **Bruno Cesar Ottoboni Luperini**, aluno de doutorado, sob a orientação da Dra. Daisy Maria Favero Salvadori no Laboratório de Toxicogenômica e Nutrigenômica, do Departamento de Patologia, da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

1. **Avaliação do Risco da Pesquisa:** Os riscos serão mínimos, havendo apenas o desconforto no momento da punção.

2. **Duração Prevista da Participação do Paciente Durante a Coleta e Entrevista:** vinte minutos.

II. EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO VOLUNTÁRIO SOBRE A PESQUISA

1. **Justificativa e Objetivos da pesquisa:** como o número de pessoas obesas vem crescendo muito e como a obesidade é uma doença que causa muitos problemas colaterais de saúde, a medicina tem buscado formas para prevenir e tratar essa doença. A cirurgia de redução de estômago (cirurgia bariátrica) é uma das formas. Por outro lado, esta pesquisa que estamos propondo tem por objetivo avaliar se a ingestão de algumas vitaminas e sais minerais pode auxiliar na prevenção e também na redução dos efeitos deletérios da obesidade, especialmente aqueles sobre a nossa constituição genética (as características que herdamos dos nossos pais).

2. **Procedimentos utilizados:** para esta pesquisa será utilizado amostra de sangue (10 mL) de mulheres com IMC entre 18,5 e 24,9 m² (normal), que serão coletados uma única vez. Esse sangue será utilizado para analisar a existência de alguma alteração genética causada pela obesidade e se elas melhoram após a ingestão de vitaminas antes e após a cirurgia. Além disso, cada pessoa responderá a algumas perguntas (questionário) para saber sobre seu estado de saúde e se existem outras pessoas obesas na família. Todas as informações obtidas serão confidenciais, e tanto as amostras de sangue como os dados pessoais serão processados e armazenados no Laboratório de Toxicogenômica e Nutrigenômica do Depto. de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

3. **Benefícios que poderão ser obtidos:** Não haverá benefício imediato ao participante do estudo. Contudo, os resultados poderão contribuir para novas formas de tratamento e prevenção da obesidade e das doenças associadas a ela.

4. **Procedimentos vantajosos para o indivíduo:** O participante do estudo não terá vantagens imediatas. Sua participação contribuirá para o entendimento das causas da obesidade e, conseqüentemente, para futura prevenção dessa disfunção em outros indivíduos.

Declaro ter sido esclarecido sobre os seguintes pontos:

12. para a participação no presente estudo, terei que assinar uma autorização em duas vias, sendo uma entregue a mim e outra será mantida em arquivo pelo pesquisador;
13. a minha participação como voluntário deverá ter a duração de aproximadamente 20 minutos, ocasião em que serão feitos os esclarecimentos e será coletada amostra do meu sangue;
14. ao participar deste estudo como indivíduo do grupo controle (dentro dos parâmetros considerados normais) estarei contribuindo para esclarecer os resultados da cirurgia sobre o estado nutricional, doenças associadas e qualidade de vida de indivíduos indivíduos obesos após a cirurgia bariátrica;

15. terei a liberdade de responder ou não qualquer pergunta;
16. fui esclarecido que não receberei qualquer remuneração financeira por participar desta pesquisa;
17. meu nome será mantido em sigilo, assegurando, assim, a minha privacidade. Se desejar, deverei ser informado sobre os resultados da pesquisa e ter acesso, a qualquer momento, às informações sobre procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa, a fim de esclarecer eventuais dúvidas;
18. fui esclarecido sobre a disponibilidade de assistência no HCFMUNESP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa;
19. poderei me recusar a participar ou mesmo retirar meu consentimento a qualquer momento da realização da pesquisa, sem nenhum prejuízo ou penalização;
20. fui informado que os pesquisadores que participam desta pesquisa estarão à minha disposição para esclarecimento de qualquer questão relacionada ao estudo;
21. qualquer dúvida ou solicitação de esclarecimentos poderei entrar em contato com a equipe científica da Profª Dra. Daisy Maria Fávero Salvadori pelo telefone (14) 3811-7210 Ramal 220;
22. qualquer dúvida adicional, poderei entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa, através do fone: (14) 3811-6143.

Diante dos esclarecimentos prestados, concordo em participar, como voluntária(o), do estudo “Relação entre a ingestão de micronutrientes e alterações citogenéticas e genômicas na obesidade mórbida”.

Botucatu, ____ / ____ / ____

Assinatura do Voluntário

Assinatura do Pesquisador

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

Nome do Pesquisador: Bruno Cesar Ottoboni Luperini

Endereço: Rua Humberto Milanesi Nº 159 Pq. Res. Primavera Botucatu - SP

Telefone: (14) 8108-3443 (14) 3354-3739

E-mail: bruno_luperini@yahoo.com.br

Nome da Orientadora: Profª Dra. Daisy Maria Fávero Salvadori

Endereço: R. Antonio Sabino Santa Rosa, 70, ap 34C – Vila Santana – Botucatu - SP

Telefone: (14) 3811-7263

E-mail: dfavero@fmb.unesp.br