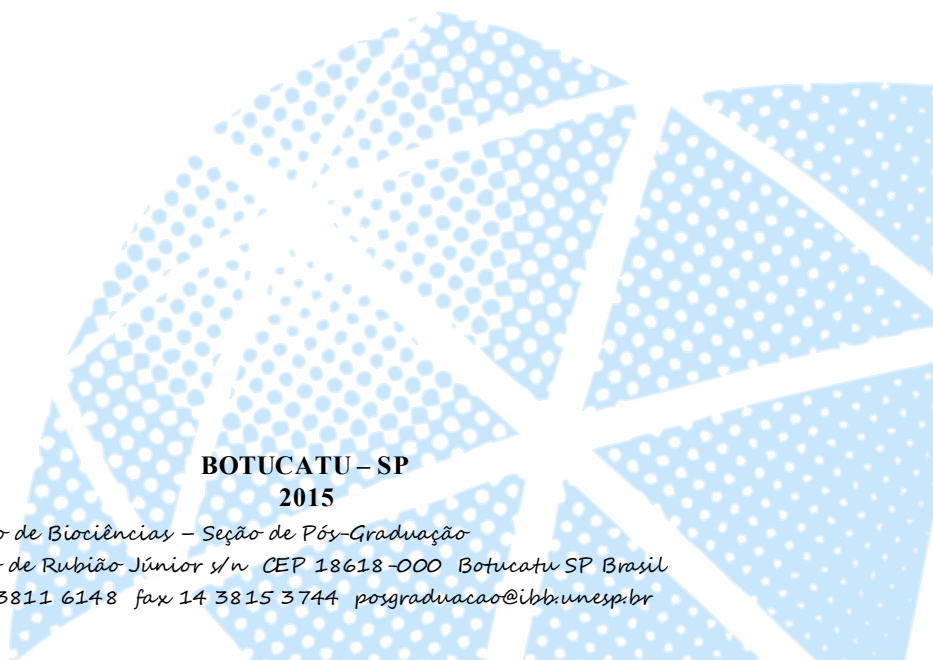


RELAÇÃO ENTRE A INGESTÃO DE MICRONUTRIENTES,
PERFIL DE CITOCINAS PLASMÁTICAS E EXPRESSÃO DOS
GENES *IL-6*, *IL-10* e *TNF- α* NA OBESIDADE MÓRBIDA

JOARA DE PAULA CAMPOS

**BOTUCATU – SP
2015**

*Instituto de Biociências – Seção de Pós-Graduação
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-000 Botucatu SP Brasil
Tel 14 3811 6148 fax 14 3815 3744 posgraduacao@ibb.unesp.br*



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Julio de Mesquita Filho"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

RELAÇÃO ENTRE A INGESTÃO DE MICRONUTRIENTES,
PERFIL DE CITOCINAS PLASMÁTICAS E EXPRESSÃO DOS
GENES *IL-6*, *IL-10* e *TNF- α* NA OBESIDADE MÓRBIDA

JOARA DE PAULA CAMPOS

ORIENTADOR: Dr^a DAISY MARIA FAVERO SALVADORI

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética).

**BOTUCATU – SP
2015**

Instituto de Biociências – Seção de Pós-Graduação
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-000 Botucatu SP Brasil
Tel 14 3811 6148 fax 14 3815 3744 posgraduacao@ibb.unesp.br

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Campos, Joara de Paula.

Relação entre a ingestão de micronutrientes, perfil de citocinas plasmáticas e expressão dos genes IL-6, IL-10 e TNF- α na obesidade mórbida / Joara de Paula Campos. - Botucatu, 2015

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Daisy Maria de Favero Salvadori

Capes: 20200005

1. Cirurgia bariátrica. 2. Elementos traços na nutrição. 3. Nutrição. 4. Obesidade mórbida. 5. Citocinas. 6. Expressão gênica.

Palavras-chave: Cirurgia bariátrica; Genômica; Processo inflamatório; Suplementação nutricional.

“Não é na ciência que está a felicidade, mas na aquisição da ciência.”
Edgar Allan Poe

Dedicatória

Dedico esse trabalho à minha família.

Aos meus pais, Manoel Campos e Suely de Paula Campos, que sempre me apoiaram em minhas decisões e me deram suporte para ir atrás dos meus sonhos.

À minha irmã, Janaína de Paula Campos, que sempre confiou na minha capacidade e esteve ao meu lado.

Aos meus avós, Jayme Pinto de Paula e Gessy Cleto de Paula, que mesmo não estando mais entre nós foram minha força para atingir meus objetivos.

Aos meus tios, Antônio Carlos de Paula e Lis Teresa Morais de Paula, sempre empolgados com minhas conquistas e torcendo por mim.

Aos meus primos, Lucas e Laura Morais de Paula, sempre presentes nas alegrias e dificuldades, me apoiando em todas as minhas jornadas.

Agradecimientos

Primeiramente, agradeço a Daisy Maria Favero Salvadori, por ter me dado a oportunidade de participar desse projeto tão bonito e importante, pelo qual me apaixonei. Pelos ensinamentos, paciência e orientação.

Ao Bruno Cesar Ottoboni Luperini, pela co-orientação, parceria e amizade. Sempre disposto a me ensinar e ajudar, nunca mediu esforços para que o projeto fosse finalizado. Mais do que um mentor, também um melhor amigo, sempre presente. Sem ele nada disso seria possível, agradeço pela confiança.

A todos os integrantes do Laboratório OMICS, uma equipe excepcional. Uma honra ter conhecido e trabalhado com cada um.

A Helenice de Lego Marcello e Bruna Jeronimo pela ajuda nos experimentos. Ao André Savio e Maruhen Datsch Silveira pela ajuda na expressão gênica.

À Juliana Lara Padovani, vizinha de mesa, confidente, amiga e mãe.

Ao Renato Paschoal Prado, colega de laboratório, de casa, amigo para todas as horas.

Ao João Paulo Marcondes por sempre estar disponível para ensinar e tirar dúvidas.

Aos colegas da República Só-Kanela, importantes não só nos momentos de descontração, mas também dispostos a ajudar, ensinar e discutir assuntos do projeto. Especialmente ao Alexandre da Silveira Chagas pela ajuda na análise da expressão gênica.

Ao meu namorado, Rafael Ferreira Ribeiro, meu parceiro de todos os momentos. Ajudou-me nos experimentos nos fins de semana, na discussão e elaboração da dissertação, mostrando sua vocação de professor. Presente nos momentos de estresse, sempre solucionando problemas e me deixando mais calma. Contribuiu de forma inestimável não só nesse trabalho como na minha vida.

A todos os amigos e colegas que de alguma forma contribuíram com esse trabalho, e confiaram no meu potencial.

E principalmente a todas as participantes do estudo e à FAPESP pelo auxílio.

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 também estão relacionadas à presença de comorbidades como a hipertensão arterial, diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares, sendo considerada pela Organização Mundial da Saúde como uma epidemia global. A obesidade é definida como uma doença associada à inflamação crônica de baixo grau, caracterizada pelos elevados níveis circulantes de citocinas inflamatórias e proteínas de fase aguda e ao excesso de adipocinas no tecido adiposo. A cirurgia bariátrica, importante forma de tratamento para a obesidade mórbida, tem dentre seus efeitos positivos a melhora do perfil inflamatório devido à redução do tecido adiposo. Contudo, esse procedimento produz alterações na anatomia e fisiologia gastrointestinal, as quais têm consequências na absorção de alimentos, podendo resultar em deficiências de micronutrientes como vitaminas e sais minerais. Sabe-se que vários micronutrientes podem contribuir para a redução de distúrbios associados à obesidade devido à habilidade de regular a expressão gênica, modular a adipogênese e o processo inflamatório. Diante desse cenário, o presente estudo teve como objetivo avaliar a relação entre a ingestão de micronutrientes, o perfil de citocinas plasmáticas circulantes e o padrão de expressão dos genes *IL-6*, *IL-10* e *TNF- α* em mulheres com obesidade mórbida (n =30), antes e após suplementação nutricional com as vitaminas A, B6, B12, C, E e D3, ácido fólico, ferro, selênio e zinco, e a cirurgia bariátrica. Os dados obtidos mostraram que apenas para as vitaminas C e D3 foram detectadas concentrações séricas abaixo dos valores de referência após a suplementação e cirurgia bariátrica. Com relação às citocinas *TNF- α* , *VEGF* e *MCP-1*, todas apresentaram concentrações mais altas nas mulheres obesas em relação às eutróficas, confirmando o estado inflamatório associado à obesidade. Para a *IL-6*, *TNF- α* e o *VEGF* foram detectadas reduções significativas após a cirurgia bariátrica, resultado também encontrado para a expressão dos genes *IL-6* e *TNF- α* . A concentração sérica de *IL-10* e sua expressão gênica não mostraram diferença significativa entre os grupos. Concluindo, a suplementação nutricional foi efetiva para a manutenção da concentração sérica de micronutrientes dentro dos padrões normais após a cirurgia e, juntamente com o procedimento cirúrgico, foi capaz de reduzir as concentrações das citocinas inflamatórias *IL-6*, *TNF- α* e *VEGF*.

Palavras-chave: cirurgia bariátrica; genômica; processo inflamatório; suplementação nutricional.

ABSTRACT

Obesity is a multifactorial disorder involving hereditary and environmental factors and lifestyle, its adverse effects are not only social or psychological, but are also related to the presence of comorbidities such as hypertension, type 2 diabetes and cardiovascular disease, being considered by World Health Organization as a global epidemic. Obesity is defined as a disease associated with chronic low-grade inflammation characterized by elevated levels of circulating cytokines and acute phase proteins and excess of adipokines in adipose tissue. Bariatric surgery, important treatment for morbid obesity, has among its positive effects the improvement of inflammatory profile promoted by the reduction of adipose tissue. However, this procedure leads to changes in the gastrointestinal anatomy and physiology and, consequently, alters the absorption process, which may result in micronutrient deficiencies such as vitamins and minerals. It is known that several micronutrients may contribute to the reduction of obesity-related disorders due to the ability to regulate gene expression, modulate adipogenesis and inflammation. In this context, the present study aimed to evaluate the relationship between micronutrient intake, the expression pattern of IL-6, IL-10 and TNF- α genes and the profile of circulating plasma cytokines in women with morbid obesity (n = 30) before and after dietary supplementation with vitamins A, B6, B12, C, D3, and E, folic acid, iron, selenium, zinc, and bariatric surgery. The data showed that only vitamin D3 and C serum concentrations were detected below reference values after supplementation and bariatric surgery. The circulation levels of TNF- α , VEGF and MCP-1 cytokines were significant higher in obese women compared to normal weight women, confirming the inflammatory state associated with obesity. IL-6, TNF- α and VEGF circulation levels were significant decreased after bariatric surgery. Gene expression data also showed a significant reduction for *IL-6* and *TNF- α* after bariatric surgery. The serum concentration of IL-10 and its gene expression showed no significant difference between groups. In conclusion, the nutritional supplementation was effective in maintaining the concentration of micronutrients within the normal range after surgery, and associated with the surgical procedure was able to reduce the concentration of the inflammatory cytokines IL-6, TNF- α and VEGF.

Keywords: bariatric surgery; genomics; inflammation; nutritional supplementation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTB: Beta actina;

AP-1: Ativador de Proteína 1;

C: Grupo controle;

cDNA: DNA complementar;

Ct: Cycle Threshold (limiar de detecção de ciclo);

DGYR: Derivação Gástrica em Y de Roux;

DRI: Dietary References Intakes (recomendação de ingestão diária);

FABP4: Proteína de ligação de ácido graxo do tecido adiposo;

HDL: Lipoproteína de alta densidade;

HPLC: Cromatografia líquida de alta performance;

IL-1: Interleucina 1;

IL-1 β : Interleucina 1 beta;

IL-2: Interleucina 2;

IL-6: Interleucina 6;

IL-8: Interleucina 8;

IL-10: Interleucina 10;

IL-12: Interleucina 12;

IMC: Índice de massa corporal;

MiNu: Micronutriente;

MCP-1: Proteína quimiotática de monócitos 1;

M1: Momento 1;

M2: Momento 2;

M3: Momento 3;

NF- κ B: Fator de transcrição nuclear kappa B;

PAI-1: Inibidor do ativador do plasminogênio;

PCR: Proteína C reativa;

PKC: Proteína quinase C;

PLP: Piridoxal-5' - fosfato;

qPCR: Reação em cadeia da polimerase em tempo real;

SAA3: Proteína amilóide sérica A3;

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa;

UI: Unidade internacional;

VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular;

VEGFR: Receptor de fator de crescimento endotelial vascular;

VR: Valor de referência;

Zn: Zinco;

1,25(OH)2D3: 1,25-diidroxivitamina D3;

25(OH)D3: 25-hidroxivitamina D3.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	2
1.1 Considerações iniciais	2
1.2 Citocinas e obesidade	3
1.3 Cirurgia bariátrica	5
1.4 Nutrição, micronutrientes e obesidade	6
1.4.1 Vitamina A	7
1.4.2 Vitamina B6.....	8
1.4.3 Vitamina B12 e folato	8
1.4.4 Vitamina C.....	9
1.4.5 Vitamina D	9
1.4.6 Vitamina E.....	10
1.4.7 Zinco	10
1.4.8 Ferro	10
1.4.9 Selênio.....	11
2. OBJETIVOS.....	14
2.1. Objetivo geral.....	14
2.2. Objetivos específicos.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1 Casuística	16
3.2 Suplementação nutricional.....	17
3.3 Coleta de material biológico	17
3.4 Análise de micronutrientes	18
3.5 Perfil de citocinas plasmáticas	18
3.6 Extração de RNA e síntese do cDNA.....	18
3.7 PCR quantitativo em tempo real (qPCR).....	19
3.8 Análise estatística	19
4. RESULTADOS	21
4.1 Caracterização da população do estudo	21
4.2 Análise de micronutrientes	21
4.3 Análise das citocinas	22
4.4 Análise da expressão gênica	24
4.5 Teste de correlação	24
5. DISCUSSÃO	27
6. CONCLUSÃO.....	34
7. REFERÊNCIAS	36
8. ANEXO 1.....	44

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações iniciais

A obesidade é definida como aumento do tecido adiposo corporal, resultante do desequilíbrio da homeostase de energia devido à ingestão excessiva de alimentos em relação ao gasto energético¹. É uma doença multifatorial, que compreende a interação entre a genética e fatores psicossociais e ambientais². Segundo dados da Organização Mundial da Saúde, a obesidade atingiu proporções epidêmicas em todo o mundo, com 2,8 milhões de mortes/ano, devido às inúmeras comorbidades associadas, como o diabetes tipo 2, doenças cardíacas, síndrome metabólica, hipertensão arterial, infarto e vários tipos de câncer^{3,4}.

O tecido adiposo é o primeiro local de armazenamento do excesso energético em forma de triglicerídeos, e um sistema de autodefesa essencial à sobrevivência em períodos de inanição⁴. Mais do que armazenamento de energia, o tecido adiposo é um órgão endócrino que secreta uma variedade de substâncias conhecidas como adipocinas, as quais podem atuar como agentes pró ou anti-inflamatórios⁵. Entre as adipocinas estão a leptina, adiponectina, resistina, visfátina, apelina, omentina e hepcidina, que são produzidas principalmente no tecido adiposo, e as citocinas, como as interleucinas IL-6, IL-8, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), a proteína amilóide sérica A3 (SAA3), a proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1), o inibidor do ativador do plasminogênio 1 (PAI-1) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)⁶. Portanto, o aumento do tecido adiposo tem efeitos pleiotrópicos nos eventos endócrinos e metabólicos, que podem contribuir para a patogênese das comorbidades associadas à obesidade^{7,8}.

Um conceito mais recente define a obesidade como uma doença associada à inflamação crônica de baixo grau, caracterizada por secreção anormal de mediadores da resposta imune e pela ativação de vias de sinalização de processos inflamatórios⁹. O estado inflamatório observado na obesidade é resultado das elevadas concentrações de citocinas

inflamatórias circulantes, de proteínas de fase aguda e do excesso de adipocinas no tecido adiposo⁵. Os hormônios secretados pelo tecido adiposo interferem na homeostase energética, no metabolismo lipídico e da glicose, na homeostase vascular e na resposta imune. Ocorrem aumentos das concentrações de adipocinas pró-inflamatórias, como IL-6, IL-8, TNF- α e PAI-1, de leptina e resistina e diminuição da taxa de adiponectina, a qual possui atividade anti-inflamatória^{10,11}.

As citocinas inflamatórias, como o TNF- α , a IL-6 e a IL-1, que são importantes fatores de risco para doenças crônicas, são principalmente produzidas nos adipócitos por meio de vias de sinalização, e suas concentrações circulantes estão diretamente relacionadas ao tamanho e número de adipócitos¹². A produção das citocinas IL-6, TNF- α e leptina no tecido adiposo desempenha papel decisivo no desenvolvimento da obesidade e na resistência à insulina¹³, sendo os macrófagos infiltrados nesse tecido a maior fonte de TNF- α e de quantidades significativas de IL-6. O tecido adiposo em indivíduos obesos contém número muito maior de macrófagos do que o de pessoas sem sobrepeso, e esses macrófagos parecem estar ativados produzindo citocinas¹⁴.

1.2 Citocinas e obesidade

Sabe-se que indivíduos obesos, ou com síndrome metabólica, apresentam perfil alterado de citocinas ou adipocinas¹⁵. Atualmente, é de amplo conhecimento que diversas citocinas são expressas ou secretadas pelo tecido adiposo. Dentre elas, a primeira a ser identificada foi o TNF- α , citocina pró-inflamatória secretada por células do sistema imune, como monócitos, macrófagos, linfócitos, células *natural killer* e leucócitos, assim como por adipócitos¹⁶. Sua função inclui a indução de apoptose, toxicidade em células tumorais e ativação e diferenciação de monócitos¹⁷. Sabe-se que o TNF- α é amplamente expresso no tecido adiposo e que sua ação pode interferir no armazenamento de gordura corporal. Variações na expressão de TNF- α nas células de gordura podem alterar processos como a

lipólise, sensibilidade à insulina e apoptose¹⁸. Há evidências que sugerem que variações nos genes que codificam o TNF- α podem modificar o risco para obesidade e suas complicações. Vários polimorfismos foram identificados na região promotora do gene *TNF- α* . O polimorfismo 308G/A (rs1800629) foi relacionado ao aumento da atividade de transcrição e produção do TNF- α , assim como foi positivamente associado à obesidade¹⁹. Outra variante na região promotora do gene, a 238G/A (rs361525), também foi associada ao aumento de gordura corporal e à resistência à insulina²⁰. Alguns estudos mostram que o aumento na concentração de TNF- α promove a expressão de outras citocinas pró-inflamatórias e reduz a expressão de citocinas anti-inflamatórias, resultando em um estado pró-inflamatório global²¹.

A interleucina 10 (IL-10), citocina secretada por linfócitos, macrófagos e monócitos ativados, possui propriedades anti-inflamatórias e antiaterogênicas, e atua na modulação da resposta imune e inflamatória por vários mecanismos, dentre os quais a supressão de outras citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF- α)²². Sabe-se, que a IL-10 está negativamente relacionada ao Índice de Massa Corporal (IMC) e à hiperglicemia, e que baixas concentrações de IL-10 estão associados à obesidade e à síndrome metabólica^{23,24}. É, também, de amplo conhecimento a existência de um forte componente genético envolvido no controle dos mecanismos de produção e atividade da IL-10²⁵. Apesar de muitas variantes gênicas terem efeitos funcionais, o alelo G-1082 tem sido associado a diversos processos inflamatórios, incluindo câncer gástrico, e considerado um dos polimorfismos mais importantes devido à sua associação à maior expressão de IL-10^{26,27}.

Outra importante adipocina produzida e secretada pelo tecido adiposo e também pelos tecidos muscular, hematopoiético e hepático, é a IL-6²⁸. Concentrações elevadas dessa citocina foram observadas em pacientes obesos, com relação positiva entre as concentrações de IL-6 e o IMC, o que ressalta a associação entre a citocina e a obesidade mórbida²⁹. Há estudos que mostram a associação entre variantes do gene da IL-6 e fenótipos relacionados à

obesidade, como a resistência à insulina e a dislipidemia³⁰. Dentre as variantes gênicas mais estudadas, o polimorfismo C-174G/C (rs1800795) no promotor do gene *IL-6* tem se mostrado como tendo grande influência nos níveis de expressão e secreção dessa citocina em obesos³¹. Há dados que sugerem que o polimorfismo *IL6-174* pode afetar, de forma direta ou indireta, a regulação transcricional do gene antes e após a cirurgia bariátrica³².

1.3 Cirurgia bariátrica

A cirurgia bariátrica é um método eficiente para a redução do peso corpóreo, e efetivamente reduz a morbidade e mortalidade de pacientes com obesidade grave, com altas taxas de remissão do diabetes, hipertrigliceridemia e hipertensão³³. Os efeitos positivos da cirurgia bariátrica estão predominantemente relacionados à melhora do perfil inflamatório, devido à redução do tecido adiposo³⁴. Contudo, este procedimento cirúrgico produz alterações na anatomia e fisiologia gastrointestinal que podem resultar em deficiências vitamínicas e de sais minerais para o paciente³⁵. A maioria das deficiências nutricionais resultantes da cirurgia bariátrica é multifatorial, ocorrendo devido à combinação de fatores como a redução da ingestão alimentar, perdas excessivas secundárias à reconfiguração da motilidade gastrointestinal e espaço de armazenamento, pH, perfil enzimático e má absorção³⁶. Dentre as principais complicações nutricionais estão as anemias (ferro, ácido fólico, vitaminas B12, A e E, cobre, zinco), a doença óssea metabólica (cálcio, vitamina D), a desnutrição protéico-calórica, esteatorréia, encefalopatia de Wernicke (tiamina), polineuropatia e miopatia (tiamina, cobre, vitaminas B12 e E), distúrbios visuais (vitaminas A e E, tiamina), erupção cutânea (zinco, ácidos graxos essenciais, vitamina A) e uma variedade de deficiências clinicamente silenciosas³⁷.

Informações na literatura evidenciam que as complicações nutricionais decorrentes da cirurgia podem permanecer por mais de 20 anos, limitando a qualidade de vida. Estima-se que aproximadamente 30% dos pacientes que passam por cirurgia bariátrica irão desenvolver

alguma complicação relacionada à nutrição (tipicamente deficiência de micro ou macronutrientes, ou ambos) em algum momento após o procedimento cirúrgico. Apenas a suplementação de rotina, com complexo multivitamínico padrão, não impede a ocorrência de deficiências nutricionais após a cirurgia bariátrica. É necessário o acompanhamento rigoroso dos pacientes no pós-operatório a fim de detectar as possíveis carências³⁸. Essa orientação é reforçada com a indicação de acompanhamento em curtos intervalos de tempo, para assegurar o diagnóstico precoce e a correção das deficiências e suas possíveis consequências³⁹. Iniciar a suplementação antes da cirurgia bariátrica tem sido uma alternativa para a melhor evolução dos pacientes e diminuição de futuras complicações^{40,41}. Por esta razão, a avaliação nutricional, na qual se inclui a verificação das concentrações séricas de vitaminas e sais minerais, deve ser iniciada antes da cirurgia para evitar, retardar ou minimizar as complicações no período pós-cirúrgico^{42,43,44}.

1.4 Nutrigenômica, micronutrientes e obesidade

A manutenção da saúde humana exige dieta equilibrada, com a ingestão de macro e micronutrientes. Determinar a composição dos alimentos e entender como podem modular a saúde humana são informações importantes para a prevenção e o tratamento de várias doenças. Na última década, a utilização de técnicas de biologia molecular abriu uma nova era nas pesquisas médicas e de nutrição, dando origem a Nutrigenômica, área da ciência que avalia os efeitos da dieta e dos nutrientes no controle da expressão gênica, e como alguns genes podem influenciar a conversão metabólica de alimentos em nutrientes e compostos bioativos⁴⁵.

A ingestão de micronutrientes é fator importante para a saúde de obesos, especialmente para o sucesso da manutenção da perda de peso em longo prazo. Os metabólitos provenientes dos micronutrientes podem trazer benefícios à regulação do apetite e da fome, à absorção de nutrientes, metabolismo lipídico e de carboidratos, funções da tireóide

e glândulas supra-renais, armazenamento de energia, homeostase da glicose, atividades neurais, entre outros⁴⁶. O estresse oxidativo, que pode causar lesões irreversíveis em lipídios, proteínas e no DNA, também é um estado fisiopatológico comum em obesos e que poderia ser minimizado com a ingestão de elementos com atividade antioxidante⁴⁷. Além disso, vários micronutrientes que atuam como parte da estrutura de proteínas, são cofatores enzimáticos importantes nas reações de síntese, reparo e metilação do DNA, além de atuarem no processo de apoptose⁴⁸. Outro aspecto que vem sendo bastante explorado é a potencial atividade anticarcinogênica de alguns micronutrientes, por meio da redução de processos inflamatórios, estresse oxidativo e de danos no DNA, e pela melhoria da resposta imune^{49,50}.

As deficiências de micronutrientes lipofílicos, como as vitaminas A e K, são frequentemente reportadas em pessoas obesas⁵¹. Esses micronutrientes podem afetar diretamente a modulação da expressão de genes em células do tecido adiposo e, conseqüentemente, a biologia do tecido. Assim, os micronutrientes podem contribuir para a redução da obesidade e dos distúrbios associados, devido à habilidade em regular a expressão gênica e modular a adipogênese e o processo inflamatório⁵². Atualmente, o maior desafio para a prevenção de doenças é definir as quantidades individuais adequadas de micronutrientes para otimizar o desempenho celular e do organismo⁵³. Entender os mecanismos biológicos específicos, ligando a nutrição a doenças que podem surgir no futuro, permitirá intervenções nutricionais que podem, em longo prazo, proporcionar melhorias à saúde.

1.4.1 Vitamina A

A vitamina A é um nutriente essencial para muitas funções fisiológicas, incluindo imunidade, visão, diferenciação celular, desenvolvimento embrionário, crescimento, além de atuar como antioxidante e ter efeitos positivos na regulação da expressão da leptina e de mediadores inflamatórios como adiposina e resistina^{54,55,56,57}. A alta concentração de vitamina A está associada a menores concentrações de IL-1 e IL-2⁵⁸. Depois do fígado, o tecido

adiposo é o segundo órgão mais importante de reservatório de vitamina A e a deficiência desta vitamina na dieta pode acarretar o aumento desse tecido e também do peso corporal^{59,60}.

1.4.2 Vitamina B6

A vitamina B6 inclui os compostos piridoxina, piridoxamina e piridoxal, que funcionam como cofatores essenciais para enzimas envolvidas no metabolismo de aminoácidos, gordura e glicose⁶¹. A suplementação de vitamina B6 atua como fator de proteção para doenças cardiovasculares, enquanto baixas concentrações plasmáticas estão relacionadas a condições com fortes bases inflamatórias, como o diabetes, a obesidade e também o estresse oxidativo^{62,63,64}. A concentração plasmática de piridoxal-5'-fosfato (PLP) foi inversamente associada à concentração de marcadores de inflamação, como a proteína C reativa (PCR) e o fibrinogênio^{65,66}.

1.4.3 Vitamina B12 e folato

A vitamina B12 é produzida por microrganismos, e pequenas quantidades podem ser encontradas em alimentos de origem animal. É um nutriente essencial para a transferência do grupo metil nas reações que requerem metionina sintase, enzima que converte a homocisteína em metionina. Altas concentrações plasmáticas de homocisteína são característicos da deficiência de vitamina B e folato, e estão associados ao maior risco para doenças vasculares^{67,68}.

O folato, por sua vez, é um componente fundamental para a síntese de purinas e pirimidinas, especialmente durante períodos de estresse, rápido crescimento celular e para a síntese de RNA e DNA⁶⁹. A deficiência deste micronutriente está relacionada ao aumento da expressão dos mediadores inflamatórios IL-1 β , IL6, TNF- α e MCP-1⁷⁰. É importante destacar que tanto a vitamina B12 como o folato estão envolvidos em mecanismos epigenéticos de regulação gênica, como a metilação do DNA^{69,70}.

1.4.4 Vitamina C

A vitamina C, ou ácido ascórbico, é um importante agente antioxidante, cuja concentração sanguínea é menor em indivíduos obesos, e que, portanto, foi associada ao maior depósito de gordura abdominal^{71,72,73}. Dados na literatura mostram que a suplementação de ácido ascórbico reduziu o peso corporal e o depósito de adipócitos em ratos alimentados com dieta rica em gordura, e que essas reduções estavam associadas à regulação de genes envolvidos na adipogênese, diferenciação de adipócitos e no metabolismo de glicocorticóide^{74,75}. A deficiência de vitamina C, além de poder alterar a expressão de leptina aumentando o risco de adiposidade e de obesidade⁷⁶, pode comprometer o sistema antioxidante do organismo, aumentando o risco de comorbidades associadas à obesidade, tais como doenças do coração, certos tipos de câncer e resistência à insulina⁷⁷.

1.4.5 Vitamina D

A vitamina D, produzida principalmente na pele pela exposição à radiação ultravioleta B, pode também ser suprida pela dieta. Para ser ativa, a vitamina D3 (coleciferol) deve ser inicialmente hidroxilada no fígado a 25-hidroxivitamina D3 (25(OH)D₃), sua principal forma circulante, e posteriormente nos rins, transformando-se em 1,25-diidroxivitamina D3 (1,25(OH)₂D₃)⁷⁸. A ligação da 1,25(OH)₂D ao seu receptor permite que atue como fator de transcrição, induzindo a ativação ou repressão de genes responsivos à vitamina D⁷⁹.

O tecido adiposo é considerado o maior reservatório de vitamina D, e a deficiência dessa vitamina em obesos pode ser explicada por sua diluição no tecido⁸⁰. Foi relatado aumento da 25(OH)D no plasma de obesos após a cirurgia bariátrica, sugerindo que a redução da massa de tecido adiposo poderia levar à liberação da vitamina D depositada nesse tecido⁸¹. Como a 1,25(OH)₂D diminui significativamente a liberação de citocinas pró-inflamatórias (MCP-1, IL-8 e IL-6) dos pré-adipócitos, foi sugerido que a vitamina D poderia proteger contra inflamação, quebrando o ciclo de recrutamento dos macrófagos⁸².

1.4.6 Vitamina E

O termo genérico vitamina E engloba dois grupos de moléculas, os tocoferóis e os tocotrienóis, que são encontradas em vários órgãos, porém amplamente armazenadas no tecido adiposo⁵². Além do efeito antioxidante, a vitamina E é capaz de modular a expressão de genes por meio de vias de sinalização e receptores nucleares⁸³. O α -tocoferol, que atua como inibidor da atividade da proteína quinase C (PKC) modulando o grau de fosforilação⁸⁴, é capaz de modular a ativação de fatores de transcrição como fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) e o ativador de proteína 1 (AP-1)⁸⁵. Adicionalmente, a vitamina E (α e γ -tocoferol) é também capaz de regular a expressão de genes dependentes do receptor nuclear PPAR γ ⁸⁶ e possui ação anti-inflamatória por meio do aumento da expressão de adiponectina, que pode ser mediada pela inibição da via de NF- κ B, e pela inibição da expressão de citocinas inflamatórias (IL-6 e MCP-1) em resposta à estimulação de TNF- α ⁸⁷.

1.4.7 Zinco

A literatura descreve a existência de relação entre a deficiência de zinco (Zn) e a obesidade, adiposidade central e inflamação, em ratos⁸⁸. A deficiência desse elemento químico pode levar à redução da massa magra e ao aumento da gordura corporal, fatores de risco para doenças cardíacas e diabetes⁸⁹. A relação entre as concentrações de zinco e a adiposidade pode ser devida à correlação entre concentração do Zn no tecido adiposo e a concentração de leptina sérica⁹⁰. A deficiência de Zn aumenta o estresse oxidativo e a resposta inflamatória em indivíduos obesos^{91,92}, enquanto altas concentrações plasmáticas estão associadas a concentrações reduzidas de citocinas inflamatórias, como TNF- α , IL-6 e IL-12⁵⁸.

1.4.8 Ferro

Foi demonstrado que a baixa concentração de ferro no sangue e a anemia por deficiência desse elemento químico são mais comuns em crianças obesas, sendo essas duas vezes mais propensas a apresentar deficiência de ferro do que aquelas dentro do padrão

normal de peso^{93,94}. A deficiência em indivíduos obesos pode ocorrer devido à baixa ingestão, redução da absorção e à capturação de ferro como resultado de inflamação crônica^{95,96}. A hepcidina, que regula a homeostase de ferro por inibição da absorção por enterócitos e sequestro por macrófagos, pode ser a molécula-chave para explicar a ligação entre obesidade e a deficiência desse microelemento⁹⁷. A inflamação crônica observada em obesos, resultado do aumento das concentrações das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α , aumenta a expressão da hepcidina⁹⁸.

1.4.9 Selênio

O selênio possui propriedades antioxidantes que desempenham papel fundamental na diminuição da resposta inflamatória⁹⁹. Baixas concentrações plasmáticas desse micronutriente podem se refletir em baixa síntese de selenoproteínas resultantes da ação de proteínas inflamatórias. A expressão da selenoproteína-P é inibida por citocinas pró-inflamatórias e pela insulina, cujas concentrações são elevadas em indivíduos obesos¹⁰⁰. No caso da selenoproteína-M, sua redução pode causar ganho de peso, aumento da deposição de tecido adiposo e diminuição da sensibilidade hipotalâmica à leptina¹⁰¹. Em obesos, as concentrações de selênio são positivamente relacionados à lipoproteína de alta densidade (HDL) e à proteína de ligação de ácido graxo do tecido adiposo (FABP4)¹⁰². O selênio induz, também, a inibição da hipertrofia dos adipócitos, o acúmulo de gordura abdominal e a supressão da formação de gordura no fígado pela regulação diferencial da expressão do gene responsável pela β -oxidação de ácido graxo¹⁰³.

Embora inúmeros estudos relacionem alterações genéticas a diversas enfermidades, as alterações na expressão gênica e o perfil nutricional e inflamatório em indivíduos com obesidade mórbida permanecem como fatores patogênicos a serem explorados. O conhecimento do perfil de expressão gênica em indivíduos obesos pode fornecer informações

relevantes sobre a complexa rede de eventos moleculares associados a essa disfunção e, conseqüentemente, contribuir para o estabelecimento de estratégias terapêuticas e de prevenção.

A identificação dos fatores moleculares subjacentes aos distúrbios metabólicos observados na obesidade é também um passo fundamental para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas. Cada fase do desenvolvimento da obesidade, ou seja, o ganho de peso e a manutenção do peso e da resposta variável ao tratamento para a perda de peso estão, provavelmente, relacionados a mecanismos moleculares distintos. Portanto, a identificação do perfil de expressão gênica pode ser uma estratégia auxiliar para a caracterização da resposta molecular de indivíduos obesos diante de intervenção nutricional ou mesmo tratamento cirúrgico e medicamentoso¹⁰⁴.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Este estudo objetivou avaliar a relação entre a suplementação de micronutrientes, o perfil de citocinas plasmáticas e o padrão de expressão dos genes *IL-6*, *IL-10* e *TNF- α* em mulheres com obesidade mórbida submetidas à cirurgia bariátrica.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Comparar o perfil de citocinas plasmáticas (*IL-6*, *IL-10*, MCP-1, VEGF e *TNF- α*) circulantes, antes e após suplementação nutricional e antes e após cirurgia bariátrica;
- ✓ Relacionar as concentrações de micronutrientes (vitaminas A, B6, B12, C, E, D3, ácido fólico, ferro sérico, selênio e zinco) ao perfil de citocinas plasmáticas, antes e após suplementação nutricional e antes e após cirurgia bariátrica;
- ✓ Avaliar o padrão de expressão dos genes *IL-6*, *IL-10* e *TNF- α* em células de sangue periférico de mulheres obesas, antes e após suplementação nutricional e antes e após a cirurgia bariátrica.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Casuística

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP (ANEXO I).

Foram incluídas no estudo 30 mulheres com obesidade mórbida ($IMC \geq 40 \text{ kg/m}^2$), com idade entre 25 e 45 anos, que foram submetidas à cirurgia bariátrica pela técnica de DGYR por laparotomia ou laparoscopia com anel de contenção. As mulheres foram selecionadas entre aquelas na fila de espera do Sistema Único de Saúde (SUS), da Clínica Bariátrica – ICE (*International Center of Excellence for Bariatric Surgery*), vinculada ao Hospital dos Fornecedores de Cana de Piracicaba – SP. Todas as participantes responderam a um questionário de triagem para a obtenção de informações sobre o estilo de vida, uso de medicamentos e história clínica. Foram utilizados como critério de exclusão: etilismo crônico; tabagismo recente (nos últimos seis meses); presença de síndromes genéticas associadas à obesidade; Síndrome de *Cushing* (quando do ponto de vista clínico houve sinais da doença e quando o teste de depressão com uso de dexametasona 1 mg *overnight* acusou concentrações de cortisol maiores que 1 $\mu\text{g/dL}$); hipotireoidismo; insuficiência renal ou hepática; neoplasias; HIV positivo; uso de corticoesteróides e climatério com reposição estrogênica; coronariopatia; cirurgia gástrica ou intestinal prévia, exceto colecistectomia; presença de hemoglobinopatias e de neuropatia autonômica grave, de doenças inflamatórias crônicas e de processos agudos (tromboses, processos infecciosos que necessitaram de internação) nos últimos seis meses. Como grupo controle, foram incluídas 30 mulheres saudáveis recrutadas da população de Botucatu, com IMC entre 18,5 e 24,9 kg/m^2 e pareadas por idade com a população de obesas. Além disso, foram critérios de inclusão no grupo controle: ausência de histórico familiar de obesidade mórbida; ausência de prática extenuante de exercícios físicos; ausência dos parâmetros para a exclusão do grupo das obesas.

3.2 Suplementação nutricional

A suplementação com vitaminas e sais minerais foi iniciada aproximadamente 9 semanas antes da cirurgia bariátrica e seguida por 6 meses na fase pós-operatória. O suplemento de micronutrientes foi manipulado por profissional especializado (serviço terceirizado) e fornecido a todas as participantes obesas, com base nas quantidades recomendadas pela DRI – *Dietary References Intakes* - do Instituto Americano de Medicina. Os sais minerais presentes no suplemento estavam quelados a um aminoácido, a fim de reduzir a interação entre os nutrientes no processo de absorção e, conseqüentemente, melhorar a biodisponibilidade. O suplemento de vitaminas e minerais foi fornecido na forma de sachês de 5g, administrados 2 vezes/dia, totalizando a dose diária de 5000 UI de vitamina A (retinol); 400 UI vitamian D3 (colecaciferol); 30 mg vitamina E (α -tocoferol); 180 mcg vitamina K; 150 mg ácido ascórbico; 2,2 mg tiamina; 2,2 riboflavina; 28 mg nicotinamida; 10 mg ácido pantotênico; 2,6 mg piridoxina; 800 mcg ácido fólico; 60 mcg biotina; 4,8 mcg cianocobalamina; 350 mg magnésio; 2000 mg cálcio; 16 mg zinco; 1800 mcg cobre; 50 mcg cromo; 36 mg ferro; 110 mcg selênio; 3,6 mg manganês; 300 mcg iodo; 10 mcg silício e 10 mcg vanádio.

3.3 Coleta de material biológico

De cada voluntária do estudo foram coletados por profissional habilitado e utilizando material descartável 10 mL de sangue periférico em três diferentes momentos. A primeira coleta (M1) foi realizada uma semana antes do início da suplementação vitamínica (10 semanas antes da cirurgia bariátrica); a segunda (M2), 8 semanas após o início da suplementação (1 semana antes do procedimento cirúrgico); a terceira (M3), seis meses após a cirurgia bariátrica. A coleta de sangue das voluntárias do grupo controle foi realizada uma única vez.

3.4 Análise de micronutrientes

As concentrações séricas dos micronutrientes foram mensuradas no Laboratório VITAE Cromatografia Líquida em Análises Clínicas LTDA (São Paulo, SP), e os valores de referência foram os mesmos utilizados pelo laboratório que realizou as análises. As concentrações de ácido fólico e de vitamina B12 foram medidos utilizando-se o método de quimioluminescência; para o ferro, o método foi colorimétrico; para o selênio e zinco foi utilizada espectrofotometria de absorção atômica; e para as vitaminas A (retinol), B6, C, D3 (colecalciferol) e E as análises foram feitas por cromatografia líquida de alta performance (HPLC).

3.5 Perfil de citocinas plasmáticas

Para a avaliação do perfil de citocinas circulantes foi utilizado o método de imunoenensaio 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 da concentração sérica de IL-6, IL-10, *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1), *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) e *vascular endothelial growth factor* (VEGF).

3.6 Extração de RNA e síntese do cDNA

A extração de RNA mensageiro (mRNA) de células de sangue total foi realizada utilizando-se o *PAXgene™ Blood RNA kit* (PreAnalytiX, QIAGEN, Alemanha), de acordo com o protocolo do fabricante. Para a síntese do DNA complementar (cDNA) foi utilizado o sistema de pré-amplificação *Taq Man High Capacity* (Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD, EUA), com iniciadores (*primers*) de oligo(dT)20.

3.7 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

A PCR quantitativa em tempo real foi realizada para avaliação da expressão dos genes *IL-6*, *IL-10* e *TNF- α* . As etapas da PCR foram realizadas em termociclador automático (*ABI Prism 7500 Sequence Detection System, Applied Biosystems*), utilizando-se *primers* Hs00985639_m1 para *IL-6*, Hs00961622_m1 para *IL-10* e Hs01113624_g1 para *TNF- α* (Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD, EUA). Para a amplificação foi utilizado o sistema *TaqMan* (Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey, EUA), que é composto por um *PCR Master Mix* universal e uma sonda específica para cada gene, marcada com o fluorocromo FAM. A sonda foi delineada de modo que ficasse intercalada pelos *primers*, tornando-a altamente específica ao *amplicon* desejado, não ocorrendo, portanto, ligações inespecíficas. A quantificação relativa foi realizada utilizando-se valores médios de Ct das amostras, que foram normalizados pelos níveis de expressão do gene *β -actina (ACTB)*.

3.8 Análise estatística

Os testes *Shapiro-Wilk* e *Kolmogorov-Smirnov* foram utilizados para verificar se a distribuição dos dados referentes às citocinas circulantes seguia 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, das concentrações de micronutrientes e da qPCR foram utilizados os testes t de *Student* e ANOVA em medidas repetidas seguidos do teste de *Tukey*. Para análise de correlação foi usado o teste de correlação canônica. O valor de $p < 0,05$ foi adotado para significância estatística.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização da população do estudo

A Tabela 1 apresenta os dados das populações (grupo de mulheres com obesidade mórbida e grupo controle) estudadas, em relação às médias de peso corpóreo e IMC. Os dados mostraram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) de peso entre as obesas nos três momentos de coleta das informações ($M1 > M2 > M3$) e também em relação a essas e o grupo controle. Houve redução de peso corpóreo em M2 e M3 e redução do IMC em M3.

Tabela 1. Características demográficas dos grupos de mulheres obesas e controle em relação ao peso corpóreo e Índice de Massa Corporal (IMC)

Parâmetro/Grupo	Controle	Obesas - M1	Obesas - M2	Obesas - M3
Peso (Kg)	60,6 ± 6,4 ^A	124,6 ± 10,5 ^B	118,0 ± 11,1 ^C	89,6 ± 8,7 ^D
IMC (Kg/m ²)	24,3 ± 4,5 ^A	47,2 ± 5,1 ^B	44,8 ± 5,1 ^B	33,9 ± 3,4 ^C

Dados expressos como média ± desvio padrão; M1, M2, M3: momentos da coleta das informações, respectivamente, antes do início da suplementação nutricional, dois meses após a suplementação nutricional e antes da cirurgia bariátrica, e seis meses após a cirurgia; letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os momentos de análise (M1, M2 e M3) e grupo controle.

4.2 Análise de micronutrientes

A Tabela 2 mostra os resultados referentes à dosagem dos micronutrientes no sangue periférico. Antes do início da suplementação nutricional (M1), apenas as vitaminas C e E encontravam-se abaixo dos valores de referência. A vitamina C permaneceu abaixo do valor (30 – 150 pg/mL) após a suplementação, tanto em M2 como em M3. A vitamina E atingiu o valor de referência em M2, permanecendo neste em M3. A vitamina D3 apresentou-se abaixo do valor de referência apenas em M3. Todos os demais micronutrientes estavam dentro dos valores de referência nos três momentos avaliados, embora tenham sido observadas diferenças significativas em suas concentrações plasmáticas entre os três momentos (Tabela 2). As

vitaminas E, B12 e o ácido fólico apresentaram aumento significativo após a suplementação nutricional, enquanto a concentração de B6 diminuiu em todos os momentos. A vitamina D3 não apresentou resposta à suplementação antes da cirurgia e teve queda após o procedimento cirúrgico.

Tabela 2. Concentrações de micronutrientes (MiNu) no sangue de mulheres com obesidade mórbida, avaliados em três momentos (M) do estudo

M/MiNu	Vit A	Vit B6	Vit B12	Vit C	Vit E
VR	De 1,2 a 4,2 μmol/L	De 8 a 105 nmol/L	De 111 a 522 pg/mL	De 30 a 150 μmol/L	De 15 a 40 μmol/L
M1	2,40 ± 1,20	16,89 ± 9,90 ^A	226,04 ± 140,0 ^A	6,37 ± 2,50*	14,00 ± 8,0 ^{*.A}
M2	2,01 ± 1,10	14,79 ± 5,00 ^B	277,96 ± 138,0 ^B	8,96 ± 2,00*	16,09 ± 9,30 ^B
M3	2,23 ± 0,86	10,95 ± 2,60 ^C	320,96 ± 271,20 ^B	8,47 ± 10,12*	16,84 ± 3,65 ^B

M/MiNu	Vit D3	Ac. fólico	Ferro sérico	Selênio	Zinco
VR	De 14 a 80 ng/mL	> 3,10 ng/mL	De 37 a 145 mcg/dL	De 46 a 143 microg/L	De 70 a 120 mcg/dL
M1	22,81 ± 12,30 ^A	7,73 ± 2,30 ^A	60,78 ± 24,00	70,51 ± 50,40	105,50 ± 64,10
M2	24,16 ± 8,10 ^A	13,51 ± 6,40 ^B	60,61 ± 29,00	77,50 ± 49,80	105,8 ± 74,30
M3	13,62 ± 5,14 ^{*.B}	13,92 ± 6,98 ^B	71,18 ± 26,27	68,26 ± 22,74	112,01 ± 21,19

Dados expressos como média ± desvio padrão; VR – Valor de Referência; M1, M2, M3: momentos de coleta respectivamente, antes do início da suplementação nutricional, dois meses após a suplementação nutricional e antes da cirurgia bariátrica, seis meses após a cirurgia; * valor menor do que VR; letras diferentes indicam diferenças significativas (p<0,05) entre os momentos.

4.3 Análise das citocinas

Os dados apresentados na Tabela 3 mostram que as concentrações séricas das citocinas TNF-α, VEGF e MCP-1 apresentaram maiores valores nas pacientes obesas em relação ao grupo controle em todos os momentos avaliados. TNF-α, VEGF e IL-6 apresentaram redução significativa na concentração seis meses após a cirurgia (M3).

Tabela 3. Níveis séricos de citocinas nos grupos de mulheres com obesidade mórbida e controle

Citocina (pg/ml)	Controle	Obesas - M1	Obesas - M2	Obesas - M3
IL-6	0,35 [0,17-0,85] ^A	0,38 [0,10-170,11] ^A	0,27 [0,16-108,18] ^A	0,23 [0,11-33,18] ^B
IL-10	0,34 [0,14-1,34] ^A	0,29 [0,18-5,20] ^A	0,30 [0,22-19,08] ^A	0,31 [0,13-3,29] ^A
TNF-α	1,12 [0,62-2,00] ^A	2,97 [1,29-9,44] ^B	3,77 [1,17-9,17] ^B	2,61 [1,09-5,34] ^C
VEGF	27,82 [5,20-146,29] ^A	112,35 [19,57-318,98] ^B	92,25 [18,61-327,11] ^{BC}	63,98 [17,69-267,50] ^C
MCP-1	161,77 [122,67-352,74] ^A	486,16 [48,38-1122] ^B	583,29 [33,18-940,56] ^B	456,46 [20,06-964,52] ^B

Dados expressos como mediana [min-máx]; M1, M2, M3: momentos de coleta das informações, respectivamente, antes do início da suplementação nutricional, dois meses após a suplementação nutricional e antes da cirurgia bariátrica, seis meses após a cirurgia; letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os momentos de análise (M1, M2 e M3) e o grupo controle.

4.4 Análise da expressão gênica

A Figura 1 mostra os dados referentes à expressão dos genes *IL-6*, *IL-10* e *TNF- α* em células do sangue periférico. O *TNF- α* em M2 e o *IL-6* em M3 apresentaram, respectivamente, expressão significativamente maior e menor em relação ao grupo controle. Por outro lado, tanto o *TNF- α* quanto o *IL-6* tiveram redução significativa na expressão de M2 para M3. O gene *IL-10* não apresentou diferença significativa de expressão entre os momentos avaliados.

4.5 Teste de correlação

Não foram observadas correlações entre as variáveis estudadas. Isso pode ser devido à alta variabilidade dos dados e ao número de participantes do estudo não ser suficiente para mostrar diferença estatística nesse tipo de análise.

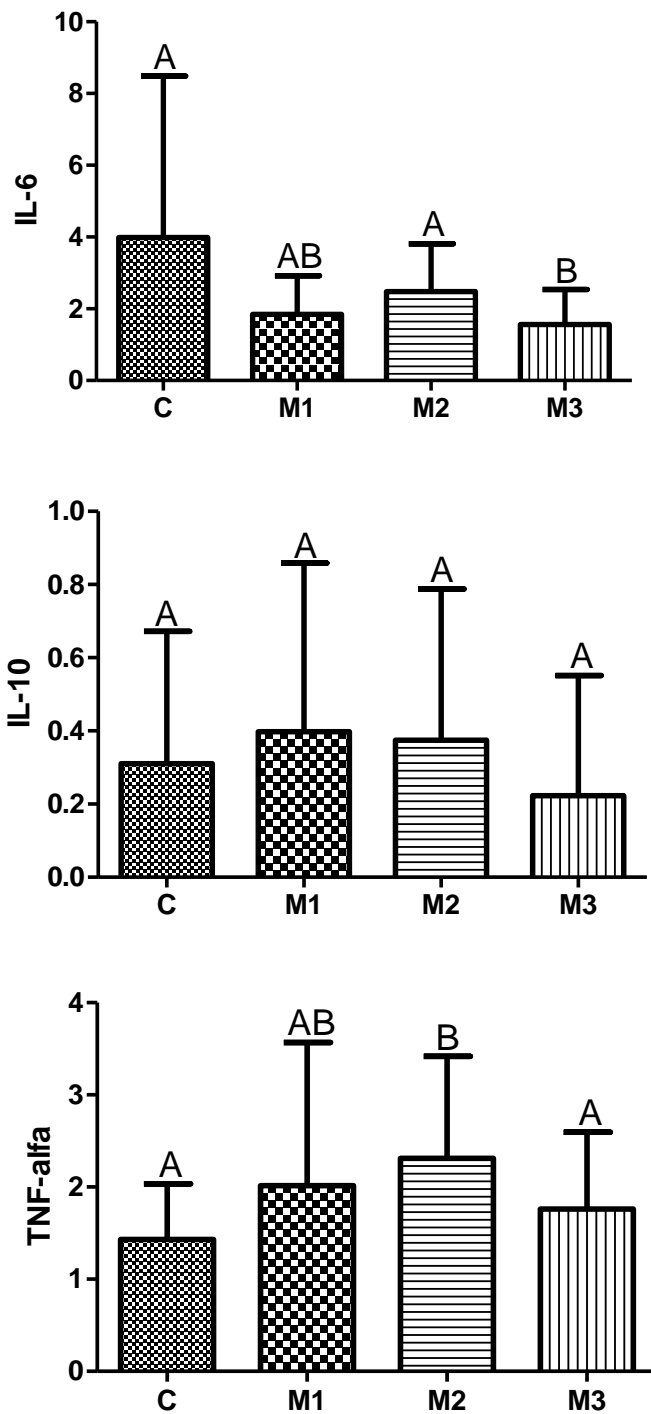


Figura 1. Expressão relativa do mRNA ($\Delta\Delta CT$) dos genes *IL-6*, *IL-10* e *TNF- α* em células do sangue periférico de mulheres com obesidade mórbida e eutróficas (grupo controle). Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão; M1, M2, M3: momentos de coleta das informações, respectivamente, antes do início da suplementação nutricional, dois meses após a suplementação nutricional e antes da cirurgia bariátrica, seis meses após a cirurgia; C: grupo controle (eutróficas); letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os momentos de análise (M1, M2 e M3) e o grupo controle (C).

Discussão

5. DISCUSSÃO

No tratamento da obesidade mórbida, a cirurgia bariátrica tem se mostrado o método mais eficaz e recomendado para a efetiva perda de peso. Esse tipo de procedimento cirúrgico proporciona, também, benefícios a longo prazo, como a reversão do diabetes tipo 2, a melhora da hipertensão, de doenças cardiovasculares e da apneia do sono, além de uma melhor qualidade de vida ao paciente¹⁰⁵. Com isso, o número de cirurgias bariátricas cobertas pelo Sistema Público de Saúde do Brasil tem aumentado consideravelmente, passando de 63 procedimentos em 1999 para 2.500 em 2006¹⁰⁶. Em 2011, foram realizados no país 65.000 procedimentos bariátricos, a segunda mais alta taxa anual do mundo¹⁰⁷. No presente estudo foi confirmada a eficácia desse tipo de procedimento, pois foi constatada a redução do peso corpóreo após a cirurgia. A perda de peso observada antes da cirurgia, após a suplementação nutricional, é devido à recomendação médica de perda de peso com intuito de diminuir o volume do fígado e a gordura abdominal para facilitar a cirurgia e reduzir os riscos associados ao procedimento cirúrgico¹⁰⁸.

Contudo, apesar do alto consumo energético, indivíduos com obesidade mórbida podem apresentar deficiências nutricionais antes da cirurgia bariátrica, e essas, associadas às restrições e à má absorção de nutrientes induzidas pela cirurgia, podem levar a deficiências importantes no período pós-operatório¹⁰⁹. Diante desse aspecto, a prescrição de suplementação nutricional tem sido recomendada para início antes e persistindo até meses após a cirurgia. A avaliação das concentrações séricas dos micronutrientes nas mulheres com obesidade mórbida mostrou que antes da suplementação, com exceção das vitaminas C e E, as vitaminas A, B6, B12 e D3, o ácido fólico, ferro, selênio e zinco apresentavam-se dentro dos valores de referência. Contudo, após a suplementação vitamínica, a vitamina E apresentou concentrações dentro do valor de referência tanto uma semana antes (M2) como 6 meses após a cirurgia (M3), fato que não ocorreu com a vitamina C, que se manteve abaixo do valor de

referência em todos os momentos avaliados. De fato, outros pesquisadores também relataram menor concentração sérica da vitamina C em obesos e atribuíram esse fato ao maior depósito de gordura abdominal⁷³. A reação inflamatória causada pelo excesso de tecido adiposo na obesidade contribui para o estresse oxidativo no qual as vitaminas C e E têm importante papel como agentes antioxidantes¹¹⁰. Outro estudo demonstra, ainda, que a perda de peso associada à suplementação vitamínica completa foram eficazes para elevar as concentrações dessas duas vitaminas um ano após a cirurgia, diminuindo os níveis de estresse oxidativo e parâmetros pró-inflamatórios, como a glutathione redutase e metabólitos de óxido nítrico.¹¹³ No entanto, esse mesmo estudo mostrou que, três meses após a cirurgia, mais de 50% dos pacientes ainda apresentavam concentrações inadequadas das vitaminas C e E, apesar da suplementação nutricional¹¹¹. É importante destacar que os eventos pró-inflamatórios e o estresse oxidativo estão presentes em pacientes obesos mesmo após a cirurgia bariátrica, devido ao próprio procedimento e porque ainda persiste excesso de tecido adiposo¹¹². Assim, concentrações séricas de vitamina C abaixo do valor de referência poderiam ser explicadas pela alta demanda por agentes antioxidantes em resposta ao estresse oxidativo.

Outro efeito do excesso de tecido adiposo é a menor disponibilidade de vitaminas lipossolúveis na circulação, explicada pela diluição dessas substâncias nesse tecido⁸⁰. O presente trabalho mostra que muitos micronutrientes tiveram resposta positiva somente com a suplementação, exceto as vitaminas A e D3, o que pode ser devido à sua lipossolubilidade e sequestro pelo tecido adiposo^{59,80}. E foi observada diminuição significativa na concentração de vitamina D3 após a cirurgia, o que poderia ser explicado pela menor absorção desse micronutriente devido às alterações na anatomia e fisiologia gastrointestinal resultantes da técnica cirúrgica.

Com relação à vitamina B12 e ao ácido fólico, embora estivessem dentro dos valores de referência, suas concentrações aumentaram significativamente com a suplementação,

permanecendo estável mesmo após a cirurgia bariátrica. Em estudo realizado com pacientes obesos, foi demonstrado que aqueles submetidos ao procedimento cirúrgico apresentaram maiores concentrações das vitaminas B6, B12 e E e do ácido fólico, quando comparados com os que perderam peso apenas mudando o estilo de vida. Esse contraste foi atribuído à suplementação alimentar, que somente foi prescrita para os pacientes tratados cirurgicamente¹¹². No entanto, para a vitamina B6, nossos resultados foram diferentes, uma vez que esta apresentou redução significativa após a suplementação e a cirurgia, embora tenha se mantido na faixa de referência.

Os resultados deste estudo também confirmaram a relação entre obesidade e inflamação, uma vez que foram observadas maiores concentrações de TNF- α , VEGF e MCP-1 no sangue periférico das mulheres com obesidade mórbida (M1, M2 e M3) comparadas ao grupo controle. Além disso, nossos dados demonstraram que apenas a suplementação vitamínica não foi capaz ou suficiente para reduzir as concentrações circulantes dessas citocinas pró-inflamatórias. No entanto, com exceção da MCP-1 e da IL-10, as demais citocinas tiveram suas concentrações diminuídas após a cirurgia (M3).

O VEGF é abundantemente secretado por adipócitos na situação de hipóxia gerada pela pequena quantidade de capilares sanguíneos no tecido adiposo, desempenhando papel fundamental na regulação da angiogênese^{113,114}. Portanto, o motivo para a redução na concentração de VEGF observada após a cirurgia bariátrica poderia ser a diminuição da hipóxia, gerada pela grande perda de peso após o procedimento cirúrgico. Da mesma forma, outros estudos demonstraram correlação positiva entre as concentrações de VEGF e o IMC e a diminuição de VEGF após cirurgia bariátrica^{115,116}. A suplementação de vitamina E também pode ter influenciado a redução da concentração dessa citocina, uma vez que compostos desta vitamina, especialmente o tocotrienol, são também capazes de inibir a angiogênese por meio da regulação da expressão do receptor de VEGF (VEGFR)¹¹⁷.

Na obesidade, a citocina MCP-1 atua na manutenção e instauração de inflamação crônica, pois contribui substancialmente para a infiltração de macrófagos no tecido adiposo, para a resistência à insulina e na esteatose hepática¹¹⁸. Apesar de haver expressão de MCP-1 nos adipócitos, esta é predominantemente produzida por macrófagos que infiltram o tecido adiposo no processo inflamatório^{14,119}. Nossos resultados evidenciaram concentrações aumentadas da MCP-1 nas mulheres obesas e nenhuma alteração nas concentrações dessa citocina após a suplementação nutricional e/ou cirurgia bariátrica. Diferentemente, foi anteriormente descrito que a redução de peso em pessoas com obesidade mórbida estaria também relacionada ao decréscimo das concentrações de MCP-1 circulante¹²⁰. Além disso, foi relatada correlação positiva entre a produção de óxido nítrico e a expressão e secreção de MCP-1, e que a vitamina C foi eficaz na redução tanto da expressão como da secreção dessa citocina¹²¹. Sabe-se que o NF- κ B é um dos principais indutores da MCP-1, e que a vitamina C, por sua vez, tem capacidade de inibir a ativação do NF- κ B induzido pelo TNF- α ^{122,123}. Desta forma, a suplementação de vitamina C poderia reduzir o recrutamento de macrófagos pela diminuição das concentrações de MCP-1. Contudo, as mulheres obesas participantes do presente estudo, nos três momentos avaliados (M1, M2 e M3), apresentaram concentrações de vitamina C abaixo do valor de referência. Talvez essa deficiência mesmo após a suplementação e a cirurgia, tenha sido uma das responsáveis pela ausência de redução da concentração de MCP-1 circulante. Além da vitamina C, é reportado que a forma ativa da vitamina D (1 α ,25-dihidroxicolecalciferol) também atenua a produção da MCP-1 em adipócitos e a expressão de VEGF em células de linhagens tumorais, e atua como moduladora da expressão de TNF- α e IL-6^{124,125,126}. Vale lembrar, no entanto, que no presente estudo não foi observado aumento da concentração sérica da vitamina D3 mesmo após a suplementação. Pelo contrário, após a cirurgia, o nível desta vitamina esteve abaixo do valor de referência.

O TNF- α , principalmente secretado por de monócitos, macrófagos e adipócitos, atua na absorção de ácidos graxos, lipogênese e lipólise nos adipócitos¹²⁷. Foi relatado que indivíduos obesos apresentam maior expressão de TNF- α no tecido adiposo do que aqueles com peso dentro dos padrões normais, e que essa produção aumenta quando as células de gordura aumentam de volume¹²⁸. Macrófagos do tecido adiposo são muito mais ativos do que os adipócitos na produção de TNF- α e outras citocinas pró-inflamatórias¹⁶. Dessa forma, pode-se supor que a redução na concentração do TNF- α observada 6 meses após a cirurgia bariátrica estaria relacionada à perda de peso, a qual teria levado à diminuição da quantidade de macrófagos infiltrados no tecido adiposo e, conseqüentemente, à menor produção dessa citocina. De fato, o recrutamento de macrófagos tem papel essencial na produção das citocinas TNF- α e MCP-1¹⁴. As possíveis causas do recrutamento pelo tecido adiposo são a resposta alterada à sinalização de adipocinas e o tamanho celular, a hipóxia do tecido adiposo local e a endotoxemia nutricional¹²⁹. Há evidências que sugerem que pré-adipócitos podem ser convertidos a macrófagos em condições adequadas, como o contato entre pré-adipócitos e macrófagos peritoniais¹³⁰. Foi também relatado que perdas significativas de peso decorrentes da cirurgia bariátrica e da intervenção no estilo de vida reduziram significativamente o número de macrófagos e a expressão de marcadores específicos de macrófagos no tecido adiposo, incluindo o TNF- α ^{131,132}. Nossos dados de expressão gênica confirmam esses achados, uma vez que a expressão do gene *TNF- α* diminuiu após a cirurgia bariátrica (M3) em relação ao segundo momento (M2).

A IL-6 apresentou redução significativa apenas após a cirurgia bariátrica. Sabe-se que a concentração de IL-6 tem maior diminuição quando ocorre uma perda de peso acentuada e que, além disso, está positivamente correlacionada com a porcentagem de gordura corporal em mulheres obesas¹³³. A concentração de IL-6 já foi negativamente relacionada com a concentração de glutathiona peroxidase, que é importante na proteção ao estresse oxidativo,

mostrando que a perda de peso e melhora do perfil inflamatório tem ação também no estresse oxidativo¹³⁴. Um estudo mostrou que indivíduos obesos tinham concentrações mais altas de IL-6 e TNF- α em comparação aos eutróficos, e que a IL-6 diminuiu significativamente 12 meses após a cirurgia bariátrica¹³⁵. Portanto, a redução dos valores de IL-6 observada após a cirurgia bariátrica no presente estudo pode ser devido à grande perda de peso ocasionada pelo procedimento. Na expressão do gene da IL-6, houve diminuição após a cirurgia bariátrica comparado ao segundo momento, atingindo valores menores do que o grupo controle.

Para a IL-10, tanto a dosagem sérica, como a análise de expressão gênica mostraram que não houve diferença entre os três momentos avaliados (M1, M2 e M3) e com relação ao grupo controle. Resultado semelhante foi encontrado em outro estudo, mostrando similaridade nas concentrações de IL-10 entre obesos, obesos diabéticos e indivíduos eutróficos¹³⁶. Concordante com os nossos achados, outro estudo mostrou que não houve diferença nas concentrações de IL-10 entre obesos antes e após a cirurgia bariátrica, e entre obesos e o grupo controle¹³⁷. Na fase inicial da inflamação crônica, as concentrações de IL-10 podem estar elevadas, o que demonstra uma tentativa do organismo de suprimir a resposta inflamatória. No entanto, as concentrações de IL-10 podem diminuir em fase mais tardia da inflamação crônica, sugerindo falha no controle da inflamação¹³⁸.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo confirmaram a eficácia da cirurgia bariátrica para a redução do peso corpóreo e do IMC, avaliados seis meses após o procedimento cirúrgico. Diferentemente de outros relatos, não houve deficiência nutricional pré-operatória, exceto pelas vitaminas C e E, sendo que para a vitamina E houve correção após a suplementação nutricional. Após o procedimento cirúrgico, houve, ainda, deficiência nutricional para as vitaminas C e D3, sugerindo a eficácia da suplementação nutricional ministrada antes da cirurgia, que também foi capaz de elevar as concentrações das vitaminas E, B12 e ácido fólico.

As mulheres com obesidade mórbida mostraram-se com concentrações aumentadas para as citocinas TNF- α , VEGF e MCP-1 comparadas às eutróficas. A cirurgia bariátrica aliada à suplementação nutricional, ministrada antes mesmo da cirurgia, foi capaz de reduzir as concentrações das citocinas IL-6, TNF- α e VEGF, provavelmente pela diminuição do recrutamento de macrófagos e da hipóxia no tecido adiposo. A expressão dos genes *IL-6* e *TNF- α* apontam as mesmas conclusões, pois houve diminuição de sua expressão após a cirurgia bariátrica comparado ao segundo momento.

Portanto, a cirurgia bariátrica é uma ótima alternativa para a redução de peso e melhora do perfil inflamatório pela sua capacidade de reduzir a gordura corporal e por consequência diminuir a produção de citocinas por adipócitos e macrófagos que contribuem para a inflamação crônica presente na obesidade, diminuindo o recrutamento de macrófagos e a hipóxia do tecido adiposo; e a suplementação nutricional ministrada antes do procedimento cirúrgico pode ser capaz de corrigir algumas das possíveis deficiências nutricionais pós-cirúrgicas causadas pelas alterações na anatomia e fisiologia gastrointestinal, sendo importante para um melhor resultado e continuidade dos benefícios da cirurgia.

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Redinger RN. Is enhanced energy utilization the answer to prevention of excessive adiposity? **J Ky Med Assoc.** 2009 Jun;107(6):211-7.
- 2 Zhu JG, Xia L, Ji CB, et al. Differential DNA methylation status between human preadipocytes and mature adipocytes. **Cell Biochem Biophys.** 2012 May;63(1):1-15.
- 3 World Health Organization (WHO). World Health Statistics 2012. Disponível em: http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/EN_WHS2012_Full.pdf
- 4 Matsuzawa Y, Shimomura I, Kihara S, Funahashi T. Importance of adipocytokines in obesity-related diseases. **Horm Res.** 2003;60Suppl 3:56-9.
- 5 Vieira-Potter VJ. Inflammation and macrophage modulation in adipose tissues. **Cell Microbiol.** 2014 Oct;16(10):1484-92.
- 6 Lago F, Dieguez C, Gómez-Reino J, Gualillo O. Adipokines as emerging mediators of immune response and inflammation. **Nat Clin Pract Rheumatol.** 2007 Dec;3(12):716-24.
- 7 Singla P, Bardoloi A, Parkash AA. Metabolic effects of obesity: A review. **World J Diabetes.** 2010 Jul 15;1(3):76-88.
- 8 Bray GA. Medical consequences of obesity. **J Clin Endocrinol Metab.** 2004 Jun;89(6):2583-9.
- 9 Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. **Annu Rev Immunol.** 2011;29:415-45.
- 10 Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. **Endocrinology.** 2004 May;145(5):2273-82.
- 11 Ouchi N, Walsh K. Adiponectin as an anti-inflammatory factor. **Clin Chim Acta.** 2007 May 1;380(1-2):24-30.
- 12 Esteve E, Ricart W, Fernández-Real JM. Adipocytokines and insulin resistance: the possible role of lipocalin-2, retinol binding protein-4, and adiponectin. **Diabetes Care.** 2009 Nov;32 Suppl 2:S362-7.
- 13 Lopes HF. Hipertensão e inflamação: papel da obesidade. **Rev Bras Hipertens.** 2007; 14(4):239-44.
- 14 Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **J Clin Invest.** 2003 Dec;112(12):1796-808.
- 15 Deng Y, Scherer PE. Adipokines as novel biomarkers and regulators of the metabolic syndrome. **Ann N Y Acad Sci.** 2010 Nov;1212:E1-E19.
- 16 Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science.** 1993 Jan 1;259(5091):87-91.
- 17 Ramírez Alvarado MM, Sánchez Roitz C. [Tumor necrosis factor- α , insulin resistance, the lipoprotein metabolism and obesity in humans]. **Nutr Hosp.** 2012 Nov-Dec;27(6):1751-7.
- 18 Proença AR, Sertié RA, Oliveira AC, Campaña AB, Caminhoto RO, Chimin P, Lima FB. New concepts in white adipose tissue physiology. **Braz J Med Biol Res.** 2014 Feb;47(3):192-205.
- 19 Sookoian SC, González C, Pirola CJ. Meta-analysis on the G-308A tumor necrosis factor alpha gene variant and phenotypes associated with the metabolic syndrome. **Obes Res.** 2005 Dec;13(12):2122-31.
- 20 Fontaine-Bisson B, Wolever TM, Chiasson JL, et al. Tumor necrosis factor alpha -238G>A genotype alters postprandial plasma levels of free fatty acids in obese individuals with type 2 diabetes mellitus. **Metabolism.** 2007 May;56(5):649-55.
- 21 Baker RG, Hayden MS, Ghosh S. NF- κ B, inflammation, and metabolic disease. **Cell Metab.** 2011 Jan 5;13(1):11-22.
- 22 Pereira S, Teixeira L, Aguilar E, Oliveira M, et al. Modulation of adipose tissue inflammation by FOXP3+ Treg cells, IL-10, and TGF- β in metabolically healthy class III obese individuals. **Nutrition.** 2014 Jul-Aug;30(7-8):784-90.
- 23 Hong EG, Ko HJ, Cho YR, Kim HJ, et al. Interleukin-10 prevents diet-induced insulin resistance by attenuating macrophage and cytokine response in skeletal muscle. **Diabetes.** 2009 Nov;58(11):2525-35.

-
- 24 Esposito K, Pontillo A, Giugliano F, et al. Association of low interleukin-10 levels with the metabolic syndrome in obese women. **J Clin Endocrinol Metab.** 2003 Mar;88(3):1055-8.
 - 25 Westendorp RG, Langermans JA, Huizinga TW, et al. Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease. **Lancet.** 1997 Jan 18;349(9046):170-3.
 - 26 Omrani MD, Bushehri B, Bagheri M, et al. Role of IL-10 -1082, IFN-gamma +874, and TNF-alpha -308 genes polymorphisms in suicidal behavior. **Arch Suicide Res.** 2009;13(4):330-9.
 - 27 Ni P, Xu H, Xue H, Lin B, Lu Y. A meta-analysis of interleukin-10-1082 promoter polymorphism associated with gastric cancer risk. **DNA Cell Biol.** 2012 Apr;31(4):582-91.
 - 28 Andersson CX, Gustafson B, Hammarstedt A, Hedjazifar S, Smith U. Inflamed adipose tissue, insulin resistance and vascular injury. **Diabetes Metab Res Rev.** 2008 Nov-Dec;24(8):595-603.
 - 29 Cruz-Domínguez MP, Cortés DH, Zarate A, Tapia-González Mde L, et al. Relationship of ghrelin, acid uric and proinflammatory adipocytokines in different degrees of obesity or diabetes. **Int J Clin Exp Med.** 2014 May 15;7(5):1435-41.
 - 30 Curti ML, Jacob P, Borges MC, Rogero MM, Ferreira SR. Studies of gene variants related to inflammation, oxidative stress, dyslipidemia, and obesity: implications for a nutrigenetic approach. **J Obes.** 2011;2011:497401.
 - 31 Cardellini M, Perego L, D'Adamo M, Marini MA, et al. C-174G polymorphism in the promoter of the interleukin-6 gene is associated with insulin resistance. **Diabetes Care.** 2005 Aug;28(8):2007-12.
 - 32 Poitou C, Lacorte JM, Coupaye M, et al. Relationship between single nucleotide polymorphisms in leptin, IL6 and adiponectin genes and their circulating product in morbidly obese subjects before and after gastric banding surgery. **Obes Surg.** 2005 Jan;15(1):11-23.
 - 33 Sjöström L, Lindroos AK, Peltonen M, Torgerson J, Bouchard C, Carlsson B et al. Lifestyle, diabetes, and cardiovascular risk factors 10 years after bariatric surgery. **N Engl J Med.** 2004 Dec 23;351(26):2683-93.
 - 34 Illán-Gómez F, González-Ortega M, Orea-Soler I, Alcaraz-Tafalla MS, Aragón-Alonso A, Pascual-Díaz M, et al. Obesity and inflammation: change in adiponectin, C-reactive protein, tumour necrosis factor-alpha and interleukin-6 after bariatric surgery. **Obes Surg.** 2012 Jun;22(6):950-5.
 - 35 Shankar P, Boylan M, Sriram K. Micronutrient deficiencies after bariatric surgery. **Nutrition.** 2010 Nov-Dec;26(11-12):1031-7.
 - 36 Dalcanale L, Oliveira CP, Faintuch J, Nogueira MA, Rondó P, Lima VM, et al. Long-term nutritional outcome after gastric bypass. **Obes Surg.** 2010 Feb;20(2):181-7.
 - 37 Fujioka K, DiBaise JK, Martindale RG. Nutrition and metabolic complications after bariatric surgery and their treatment. **JPEN J Parenter Enteral Nutr.** 2011 Sep;35(5 Suppl):52S-9S.
 - 38 Gasteyer 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 May;87(5):1128-33.
 - 39 Bavaresco M, Paganini S, Lima TP, Salgado W Jr, Ceneviva R, Dos Santos JE, Nonino-Borges CB. Nutritional course of patients submitted to bariatric surgery. **Obes Surg.** 2010 Jun;20(6):716-21.
 - 40 deLuis DA, Pacheco D, Izaola O, Romero A, Marcos JL, Pelaz J, et al. Early clinical and surgical results of biliopancreatic diversion. **Obes Surg.** 2005 Jun-Jul;15(6):799-802.
 - 41 de Luis DA, Pacheco D, Izaola O, Terroba MC, Cuellar L, Martín T. Clinical results and nutritional consequences of biliopancreatic diversion: three years of follow-up. **Ann NutrMetab.** 2008;53(3-4):234-9.
 - 42 Alvarez-Leite JJ. Nutrient deficiencies secondary to bariatric surgery. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care.** 2004 Sep;7(5):569-75.
 - 43 Bal BS, Finelli FC, Koch TR. Origins of and recognition of micronutrient deficiencies after gastric bypass surgery. **Curr Diab Rep.** 2011 Apr;11(2):136-41.
 - 44 Bordalo LA, Teixeira TF, Bressan J, Mourão DM. [Bariatric surgery: how and why to supplement]. **Rev Assoc Med Bras.** 2011 Jan-Feb;57(1):113-20.

-
- 45 Masotti A, Da Sacco L, Bottazzo GF, Alisi A. Microarray technology: a promising tool in nutrigenomics. **Crit Rev Food Sci Nutr.** 2010 Aug;50(7):693-8.
 - 46 Allied Health Sciences Section Ad Hoc Nutrition Committee, 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 Sep-Oct;4(5 Suppl):S73-108.
 - 47 Cutler RG. Oxidative stress profiling: part I. Its potential importance in the optimization of human health. **Ann N Y Acad Sci.** 2005 Dec;1055:93-135.
 - 48 Fenech M. Genome health nutrigenomics and nutrigenetics--diagnosis and nutritional treatment of genome damage on an individual basis. **Food Chem Toxicol.** 2008 Apr;46(4):1365-70.
 - 49 Schrauzer GN. Anticarcinogenic effects of selenium. **Cell Mol Life Sci.** 2000 ec;57(13-14):1864-73.
 - 50 Kim YS, Milner J. Molecular targets for selenium in cancer prevention. **Nutr Cancer.** 2001;40(1):50-4.
 - 51 Kimmons JE, Blanck HM, Tohill BC, Zhang J, Khan LK. Associations between body mass index and the prevalence of low micronutrient levels among US adults. **Med Gen Med.** 2006 Dec 19;8(4):59.
 - 52 Landrier JF, Marcotorchino J, Tourniaire F. Lipophilic micronutrients and adipose tissue biology. **Nutrients.** 2012 Nov 6;4(11):1622-49.
 - 53 Fenech MF. Dietary reference values of individual micronutrients and nutriomes for genome damage prevention: current status and a road map to the future. **Am J Clin Nutr.** 2010 May;91(5):1438S-1454S.
 - 54 Antras J, Lasnier F, Pairault J. Adipsin gene expression in 3T3-F442A adipocytes is post transcriptionally down-regulated by retinoic acid. **J Biol Chem.** 1991 Jan 15;266(2):1157-61.
 - 55 Felipe F, Bonet ML, Ribot J, Palou A. Modulation of resistin expression by retinoic acid and vitamin A status. **Diabetes.** 2004 Apr;53(4):882-9.
 - 56 Kumar MV, Scarpace PJ. Differential effects of retinoic acid on uncoupling protein-1 and leptin gene expression. **J Endocrinol.** 1998 May;157(2):237-43.
 - 57 Kumar MV, Sunvold GD, Scarpace PJ. Dietary vitamin A supplementation in rats: suppression of leptin and induction of UCP1 mRNA. **J Lipid Res.** 1999 May;40(5):824-9.
 - 58 Zavala G, Long KZ, García OP, Caamaño MD, Aguilar T, Salgado LM, Rosado JL. Specific micronutrient concentrations are associated with inflammatory cytokines in a rural population of Mexican women with a high prevalence of obesity. **Br J Nutr.** 2012 May 29;1-9.
 - 59 Tsutsumi C, Okuno M, Tannous L, Piantadosi R, Allan M, Goodman DS, Blaner S. Retinoids and retinoid-binding protein expression in rat adipocytes. **J Biol Chem.** 1992 Jan 25;267(3):1805-10.
 - 60 Ribot J, Felipe F, Bonet ML, Palou A. Changes of adiposity in response to vitamin A status correlate with changes of PPAR gamma 2 expression. **Obes Res.** 2001 Aug;9(8):500-9.
 - 61 Coursin DB. Present status of Vitamin B6 metabolism. **Am J Clin Nutr.** 1961 May-Jun;9:304-14.
 - 62 Wang L, Li H, Zhou Y, Jin L, Liu J. Low-dose B vitamins supplementation ameliorates cardiovascular risk: a double-blind randomized controlled trial in healthy Chinese elderly. **Eur J Nutr.** 2014 Jun 11.
 - 63 Okada M, Shibuya M, Yamamoto E, Murakami Y. Effect of diabetes on vitamin B6 requirement in experimental animals. **Diabetes Obes Metab.** 1999 Jul;1(4):221-5.
 - 64 Shen J, Lai CQ, Mattei J, Ordovas JM, Tucker KL. Association of vitamin B-6 status with inflammation, oxidative stress, and chronic inflammatory conditions: the Boston Puerto Rican Health Study. **Am J Clin Nutr.** 2010 Feb;91(2):337-42.
 - 65 Friso S, Jacques PF, Wilson PW, Rosenberg IH, Selhub J. Low circulating vitamin B(6) is associated with elevation of the inflammation marker C-reactive protein independently of plasma homocysteine levels. **Circulation.** 2001 Jun 12;103(23):2788-91.
 - 66 James S, Vorster HH, Venter CS, Kruger HS, Nell TA, Veldman FJ, Ubbink JB. Nutritional status influences plasma fibrinogen concentration: evidence from the THUSA survey. **Thromb Res.** 2000 Jun 1;98(5):383-94.
 - 67 da Silva RP, Kelly KB, Al Rajabi A, Jacobs RL. Novel insights on interactions between folate and lipid metabolism. **Biofactors.** 2014 May-Jun;40(3):277-83.

-
- 68 Kolb AF, Petrie L. Folate deficiency enhances the inflammatory response of macrophages. **Mol Immunol.** 2013 Jun;54(2):164-72.
- 69 Blom HJ, Smulders Y. Overview of homocysteine and folate metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defects. **J Inherit Metab Dis.** 2011 Feb;34(1):75-81.
- 70 Waterland RA, Jirtle RL. Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. **Mol Cell Biol.** 2003 Aug;23(15):5293-300.
- 71 Aasheim ET, Hofsø D, Hjelmessaeth J, Birkeland KI, Bøhmer T. Vitamin status in morbidly obese patients: a cross-sectional study. **Am J Clin Nutr.** 2008 Feb;87(2):362-9.
- 72 Canoy D, Wareham N, Welch A, Bingham S, Luben R, Day N, Khaw KT. Plasma ascorbic acid concentrations and fat distribution in 19,068 British men and women in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition Norfolk cohort study. **Am J Clin Nutr.** 2005 Dec;82(6):1203-9.
- 73 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 Jul;137(7):1757-62.
- 74 Campiñón J, Milagro FI, Fernández D, Martínez JA. Vitamin C supplementation influences body fat mass and steroidogenesis-related genes when fed a high-fat diet. **Int J Vitam Nutr Res.** 2008 Mar;78(2):87-95.
- 75 Campiñón J, Milagro FI, Fernández D, Martínez JA. Differential gene expression and adiposity reduction induced by ascorbic acid supplementation in a cafeteria model of obesity. **J Physiol Biochem.** 2006 Jun;62(2):71-80.
- 76 Garcia-Diaz DF, Campiñón J, Milagro FI, Boque N, Moreno-Aliaga MJ, Martínez JA. Vitamin C inhibits leptin secretion and some glucose/lipid metabolic pathways in primary rat adipocytes. **J Mol Endocrinol.** 2010 Jul;45(1):33-43.
- 77 Bonnefont-Rousselot D. The role of antioxidant micronutrients in the prevention of diabetic complications. **Treat Endocrinol.** 2004;3(1):41-52.
- 78 Jones G, Strugnell SA, DeLuca HF. Current understanding of the molecular actions of vitamin D. **Physiol Rev.** 1998 Oct;78(4):1193-231.
- 79 Haussler MR, Jurutka PW, Mizwicki M, Norman AW. Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{vitamin D}_3$: genomic and non-genomic mechanisms. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.** 2011 Aug;25(4):543-59.
- 80 Drincic AT, Armas LA, Van Diest EE, Heaney RP. Volumetric dilution, rather than sequestration best explains the low vitamin D status of obesity. **Obesity (Silver Spring).** 2012 Jul;20(7):1444-8.
- 81 Earthman CP, Beckman LM, Masodkar K, Sibley SD. The link between obesity and low circulating 25-hydroxyvitamin D concentrations: considerations and implications. **Int J Obes (Lond).** 2012 Mar;36(3):387-96.
- 82 Gao D, Trayhurn P, Bing C. $1,25\text{-Dihydroxyvitamin D}_3$ inhibits the cytokine-induced secretion of MCP-1 and reduces monocyte recruitment by human preadipocytes. **Int J Obes (Lond).** 2013 Mar;37(3):357-65.
- 83 Azzi A. Molecular mechanism of alpha-tocopherol action. **Free Radic Biol Med.** 2007 Jul 1;43(1):16-21.
- 84 Ricciarelli R, Tasinato A, Clément S, Ozer NK, Boscoboinik D, Azzi A. alpha-Tocopherol specifically inactivates cellular protein kinase C alpha by changing its phosphorylation state. **Biochem J.** 1998 Aug 15;334 (Pt 1):243-9.
- 85 Maggi-Capeyron MF, Ceballos P, Cristol JP, et al. Wine phenolic antioxidants inhibit AP-1 transcriptional activity. **J Agric Food Chem.** 2001 Nov;49(11):5646-52.
- 86 Landrier JF, Gouranton E, El Yazidi C, Malezet C, Balaguer P, Borel P, Amiot MJ. Adiponectin expression is induced by vitamin E via a peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent mechanism. **Endocrinology.** 2009 Dec;150(12):5318-25.
- 87 Matsunaga T, Shoji A, Gu N, Joo E, Li S, Adachi T, Yamazaki H, Yasuda K, Kondoh T, Tsuda K. $\gamma\text{-Tocotrienol}$ attenuates TNF- α -induced changes in secretion and gene expression of MCP-1, IL-6 and adiponectin in 3T3-L1 adipocytes. **Mol Med Rep.** 2012 Apr;5(4):905-9.

-
- 88 Liu MJ, Bao S, Bolin ER, Burris DL, et al. Zinc deficiency augments leptin production and exacerbates macrophage infiltration into adipose tissue in mice fed a high-fat diet. **J Nutr.** 2013 Jul;143(7):1036-45.
- 89 García OP, Long KZ, Rosado JL. Impact of micronutrient deficiencies on obesity. **Nutr Rev.** 2009 Oct;67(10):559-72.
- 90 Tallman DL, Taylor CG. Effects of dietary fat and zinc on adiposity, serum leptin and adipose fatty acid composition in C57BL/6J mice. **J Nutr Biochem.** 2003 Jan;14(1):17-23.
- 91 García OP, Ronquillo D, del Carmen Caamaño M, Martínez G, Camacho M, López V, Rosado JL. Zinc, iron and vitamins A, C and e are associated with obesity, inflammation, lipid profile and insulin resistance in Mexican school-aged children. **Nutrients.** 2013 Dec 10;5(12):5012-30.
- 92 Cunningham-Rundles S, McNeeley DF, Moon A. Mechanisms of nutrient modulation of the immune response. **J Allergy Clin Immunol.** 2005 Jun;115(6):1119-28; quiz 1129.
- 93 Pinhas-Hamiel O, Newfield RS, Koren I, Agmon A, Lilos P, Phillip M. Greater prevalence of iron deficiency in overweight and obese children and adolescents. **Int J Obes Relat Metab Disord.** 2003 Mar;27(3):416-8.
- 94 Nead KG, Halterman JS, Kaczorowski JM, Auinger P, Weitzman M. Overweight children and adolescents: a risk group for iron deficiency. **Pediatrics.** 2004 Jul;114(1):104-8.
- 95 Yanoff LB, Menzie CM, Denkinger B, Sebring NG, McHugh T, Remaley AT, anovski JA. Inflammation and iron deficiency in the hypoferremia of obesity. **Int J Obes (Lond).** 2007 Sep;31(9):1412-9.
- 96 Zimmermann MB, Zeder C, Muthayya S, Winichagoon P, Chaouki N, Aeberli I, Hurrell RF. Adiposity in women and children from transition countries predicts decreased iron absorption, iron deficiency and a reduced response to iron fortification. **Int J Obes (Lond).** 2008 Jul;32(7):1098-104.
- 97 Knutson MD, Oukka M, Koss LM, Aydemir F, Wessling-Resnick M. Iron release from macrophages after erythrophagocytosis is up-regulated by ferroportin 1 overexpression and down-regulated by hepcidin. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2005 Feb 1;102(5):1324-8.
- 98 McClung JP, Karl JP. Iron deficiency and obesity: the contribution of inflammation and diminished iron absorption. **Nutr Rev.** 2009 Feb;67(2):100-4.
- 99 Manzanares W, Langlois PL, Hardy G. Update on antioxidant micronutrients in the critically ill. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care.** 2013 Nov;16(6):719-25.
- 100 Fairweather-Tait SJ, Bao Y, Broadley MR, Collings R, Ford D, Hesketh JE, Hurst R. Selenium in human health and disease. **Antioxid Redox Signal.** 2011 Apr;14(7):1337-83.
- 101 Pitts MW, Reeves MA, Hashimoto AC, Ogawa A, Kremer P, Seale LA, Berry MJ. Deletion of selenoprotein M leads to obesity without cognitive deficits. **J Biol Chem.** 2013 Sep 6;288(36):26121-34.
- 102 Mutakin, Meiliana A, Wijaya A, Kobayashi K, Yamazaki C, Kameo S, Nakazawa M, Koyama H. Association between selenium nutritional status and metabolic risk factors in men with visceral obesity. **J Trace Elem Med Biol.** 2013 Apr;27(2):112-6.
- 103 Kim JE, Choi SI, Lee HR, Hwang IS, Lee YJ, An BS, Lee SH, Kim HJ, Kang BC, Hwang DY. Selenium significantly inhibits adipocyte hypertrophy and abdominal fat accumulation in OLETF rats via induction of fatty acid β -oxidation. **Biol Trace Elem Res.** 2012 Dec;150(1-3):360-70.
- 104 Clement K, Langin D. Regulation of inflammation-related genes in human adipose tissue. **J Intern Med.** 2007 Oct;262(4):422-30. Review.
- 105 Costa RC, Yamaguchi N, Santo MA, Riccioppo D, Pinto-Junior PE. Outcomes on quality of life, weight loss, and comorbidities after roux-en-y gastric bypass. **Arq Gastroenterol.** 2014 Sep;51(3):165-70.
- 106 Santos LM, de Oliveira IV, Peters LR, Conde WL. Trends in morbid obesity and in bariatric surgeries covered by the Brazilian public health system. **Obes Surg.** 2010 Jul;20(7):943-8.
- 107 Buchwald H, Oien DM. Metabolic/bariatric surgery worldwide 2011. **Obes Surg.** 2013 Apr;23(4):427-36.

-
- 108 Cassie S, Menezes C, Birch DW, Shi X, Karmali S. Effect of preoperative weightloss in bariatric surgical patients: a systematic review. **Surg Obes Relat Dis.** 2011 Nov-Dec;7(6):760-7; discussion 767.
- 109 Kaidar-Person O, Rosenthal RJ. Malnutrition in morbidly obese patients: fact or fiction? **Minerva Chir.** 2009 Jun;64(3):297-302.
- 110 Kawasaki N, Asada R, Saito A, Kanemoto S, Imaizumi K. Obesity-induced endoplasmic reticulum stress causes chronic inflammation in adipose tissue. **Sci Rep.** 2012;2:799.
- 111 da Silva VR, Moreira EA, Wilhelm-Filho D, de Miranda JX, et al. Proinflammatory and oxidative stress markers in patients submitted to Roux-en-Y gastric bypass after 1 year of follow-up. **Eur J Clin Nutr.** 2012 Aug;66(8):891-9.
- 112 Aasheim ET, Johnson LK, Hofsø D, Bøhmer T, Hjeltnes J. Vitamin status after gastric bypass and lifestyle intervention: a comparative prospective study. **Surg Obes Relat Dis.** 2012 Mar-Apr;8(2):169-75.
- 113 Ledoux S, Queguiner I, Msika S, Calderari S, Rufat P, Gasc JM, Corvol P, Leger E. Angiogenesis associated with visceral and subcutaneous adipose tissue in severe human obesity. **Diabetes.** 2008 Dec;57(12):3247-57.
- 114 Fusaru AM, Pisoschi CG, Bold A, Taisescu C, Stănescu R, Hîncu M, Crăţoiu S, Baniţă IM. Hypoxia induced VEGF synthesis in visceral adipose depots of obese diabetic patients. **Rom J Morphol Embryol.** 2012;53(4):903-9.
- 115 García de la Torre N, Rubio MA, Bordiú E, et al. Effects of weight loss after bariatric surgery for morbid obesity on vascular endothelial growth factor-A, adipocytokines, and insulin. **J Clin Endocrinol Metab.** 2008 Nov;93(11):4276-81.
- 116 Loebig M, Klement J, Schmoller A, Betz S, et al. Evidence for a relationship between VEGF and BMI independent of insulin sensitivity by glucose clamp procedure in a homogenous group healthy young men. **PLoS One.** 2010 Sep 7;5(9):e12610.
- 117 Nakagawa K, Eitsuka T, Inokuchi H, Miyazawa T. DNA chip analysis of comprehensive food function: inhibition of angiogenesis and telomerase activity with unsaturated vitamin E, tocotrienol. **Biofactors.** 2004;21(1-4):5-10.
- 118 Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. **J Clin Invest.** 2006 Jun;116(6):1494-505.
- 119 Fjeldborg K, Pedersen SB, Møller HJ, Christiansen T, Bennetzen M, Richelsen B. Human adipose tissue macrophages are enhanced but changed to an anti-inflammatory profile in obesity. **J Immunol Res.** 2014;2014:309548.
- 120 Christiansen T, Richelsen B, Bruun JM. Monocyte chemoattractant protein-1 is produced in isolated adipocytes, associated with adiposity and reduced after weight loss in morbid obese subjects. **Int J Obes (Lond).** 2005 Jan;29(1):146-50.
- 121 Garcia-Diaz DF, Campion J, Quintero P, Milagro FI, Moreno-Aliaga MJ, Martinez JA. Vitamin C modulates the interaction between adipocytes and macrophages. **Mol Nutr Food Res.** 2011 Sep;55Suppl 2:S257-63.
- 122 Jiao P, Chen Q, Shah S, Du J, Tao B, Tzamelis I, Yan W, Xu H. Obesity-related up regulation of monocyte chemotactic factors in adipocytes: involvement of nuclear factor-kappa B and c-Jun NH2-terminal kinase pathways. **Diabetes.** 2009 Jan;58(1):104-15.
- 123 Cárcamo JM, Pedraza A, Bórquez-Ojeda O, Golde DW. Vitamin C suppresses TNF alpha-induced NF kappa B activation by inhibiting I kappa B alpha phosphorylation. **Biochemistry.** 2002 Oct 29;41(43):12995-3002.
- 124 Lorente-Cebrián S, Eriksson A, Dunlop T, Mejhert N, et al. Differential effects of 1 α ,25-dihydroxycholecalciferol on MCP-1 and adiponectin production in human white adipocytes. **Eur J Nutr.** 2012 Apr;51(3):335-42.
- 125 Ben-Shoshan M, Amir S, Dang DT, Dang LH, Weisman Y, Mabeesh NJ. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 (Calcitriol) inhibits hypoxia-inducible factor-1/vascular endothelial growth factor pathway in human cancer cells. **Mol Cancer Ther.** 2007 Apr;6(4):1433-9.

-
- 126 Giulietti A, van Etten E, Overbergh L, Stoffels K, Bouillon R, Mathieu C. Monocytes from type 2 diabetic patients have a pro-inflammatory profile. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) works as anti-inflammatory. **Diabetes Res Clin Pract.** 2007 Jul;77(1):47-57.
- 127 Cawthorn WP, Sethi JK. TNF-alpha and adipocyte biology. **FEBS Lett.** 2008 Jan 9;582(1):117-31.
- 128 Winkler G, Kiss S, Keszthelyi L, Sápi Z, et al. Expression of tumor necrosis factor (TNF)-alpha protein in the subcutaneous and visceral adipose tissue in correlation with adipocyte cell volume, serum TNF-alpha, soluble serum TNF-receptor-2 concentrations and C-peptide level. **Eur J Endocrinol.** 2003 Aug;149(2):129-35.
- 129 Heilbronn LK, Campbell LV. Adipose tissue macrophages, low grade inflammation and insulin resistance in human obesity. **Curr Pharm Des.** 2008;14(12):1225-30.
- 130 Charrière G, Cousin B, Arnaud E, André M, Bacou F, Penicaud L, Casteilla L. Preadipocyte conversion to macrophage. Evidence of plasticity. **J Biol Chem.** 2003 Mar 14;278(11):9850-5.
- 131 Cancellato R, Henegar C, Viguerie N, Taleb S, et al. Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. **Diabetes.** 2005 Aug;54(8):2277-86.
- 132 Zhang H, Wang Y, Zhang J, Potter BJ, Sowers JR, Zhang C. Bariatric surgery reduces visceral adipose inflammation and improves endothelial function in type 2 diabetic mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 2011 Sep;31(9):2063-9.
- 133 Beavers KM, Ambrosius WT, Nicklas BJ, Rejeski WJ. Independent and combined effects of physical activity and weight loss on inflammatory biomarkers in overweight and obese older adults. **J Am Geriatr Soc.** 2013 Jul;61(7):1089-94.
- 134 Bougoulia M, Triantos A, Koliakos G. Plasma interleukin-6 levels, glutathione peroxidase and isoprostane in obese women before and after weight loss. Association with cardiovascular risk factors. **Hormones (Athens).** 2006 Jul-Sep;5(3):192-9.
- 135 Illán-Gómez F, González-Ortega M, Orea-Soler I, et al. Obesity and inflammation: change in adiponectin, C-reactive protein, tumour necrosis factor-alpha and interleukin-6 after bariatric surgery. **Obes Surg.** 2012 Jun;22(6):950-5.
- 136 Lin E, Gletsu-Miller N. Surgical stress induces an amplified inflammatory response in patients with type 2 diabetes. **ISRN Obes.** 2013 Jan 21;2013:910586.
- 137 Arismendi E, Rivas E, Agustí A, Ríos J, Barreiro E, Vidal J, Rodríguez-Roisin R. The systemic inflammation of severe obesity before and after bariatric surgery. **PLoS One.** 2014 Sep 19;9(9):e107859.
- 138 Chang JS, Bai CH, Huang ZC, Owaga E, Chao KC, Chang CC, Chiou HY. Interleukin 10 and clustering of metabolic syndrome components in pediatrics. **Eur J Clin Invest.** 2014 Apr;44(4):384-94.



Anexo

8. ANEXO 1



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (Dxx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
e-mail coordenadoria: fmb@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

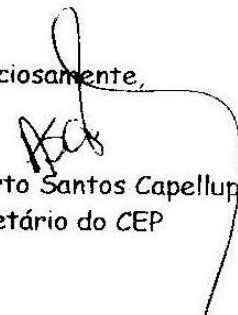
Prezada Prof^ª Daisy,

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