

Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

**Metabolismo energético, composição corporal
e consumo alimentar na cirurgia bariátrica**

Michele Novaes Ravelli

Tese apresentada ao programa de
Pós-graduação em Alimentos e
Nutrição para obtenção do título de
doutora em Alimentos e Nutrição.

Área de concentração: Ciências
Nutricionais

Orientadora: Profa. Dra. Maria Rita
Marques de Oliveira

Coorientador: Carlos Ducatti

Araraquara

2017

Metabolismo energético, composição corporal e consumo alimentar na cirurgia bariátrica

Michele Novaes Ravelli

Tese apresentada ao programa de
Pós-graduação em Alimentos e
Nutrição para obtenção do título de
doutora em Alimentos e Nutrição.

Área de concentração: Ciências
Nutricionais

Orientadora: Profa. Dra. Maria Rita
Marques de Oliveira

Coorientador: Carlos Ducatti

Araraquara

2017

Ficha Catalográfica

Elaborada por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

R252m Ravelli, Michele Novaes
Metabolismo energético, composição corporal e consumo alimentar na cirurgia bariátrica /
Michele Novaes Ravelli. – Araraquara, 2017.
228 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e
Nutrição. Área de pesquisa em Ciências nutricionais.

Orientadora: Maria Rita Marques de Oliveira.
Coorientador: Carlos Ducatti.

1. Obesidade. 2. Cirurgia Bariátrica. 3. Metabolismo Energético. 4. Composição Corporal.
I. Oliveira, Maria Rita Marques de, orient. II. Ducatti, Carlos, coorient. III. Título.

CAPES: 50700006

MICHELE NOVAES RAVELLI

“METABOLISMO ENERGÉTICO, COMPOSIÇÃO CORPORAL E CONSUMO ALIMENTAR NA
CIRURGIA BARIÁTRICA”

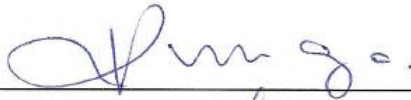
Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual
Paulista – UNESP, Campus de Araraquara como
requisito para a obtenção do título de Doutora em
Alimentos e Nutrição.

Araraquara, 24 de agosto de 2017.

BANCA EXAMINADORA



MARIA RITA MARQUES DE OLIVEIRA



ROZANGELA VERLENGIA



THABATA KOESTER WEBER

KARINA PFRIMER

Membro Titular participante por meio de vídeo-conferência

ELLEN CRISTINI DE FREITAS

Membro Titular participante por meio de vídeo-conferência

DEDICATÓRIA

Ao Sr. Jesus Cristo e Nossa Senhora,

Aqueles a quem busco pedindo intercessão junto a Deus para proteção e saúde para a minha família e a mim, e os quais agradeço pelas inúmeras bênçãos que recebemos diariamente. Por meio da fé, ato de acreditar em algo que nos foi prometido e ainda não vemos, busquei conforto ao meu coração e aos meus pensamentos nos momentos de angústia, insegurança e solidão, nos quais clamei ao Senhor e a Nossa Senhora e, sem hesitar, senti Vossas presenças. Obrigada pelo amparado nos momentos difíceis e por ter me abençoado com paciência e sabedoria na conclusão desta etapa profissional.

“O Senhor é a minha luz e a minha salvação, a quem temerei? O Senhor é a força da minha vida, de quem me recearei?” (Salmos 27:1).

Pois,

“Ainda que eu andasse pelo vale da sombra da morte, não temeria mal algum, porque Tu estás comigo; a Tua vara e o Teu cajado me consolam.” (Salmos 23:2-4).

Aos meus pais,

Pessoas que amo imensa e incondicionalmente, as quais me deram apoio, confiança e afeto, me fortalecendo para alcançar este objetivo. Dedico esses anos de estudo e aperfeiçoamento profissional a vocês, meus exemplos de vidas dignas, conquistadas com muito esforço. Sinto-me orgulhosa por ter vocês como meus pais!

“Honra a teu pai e a tua mãe, para que se prolonguem os teus dias na terra que o Senhor teu Deus te dá.” (Êxodo 20:12).

AGRADECIMENTOS PESSOAIS

Aos meus pais, José Carlos Ravelli e Vera Duarte Novaes Ravelli:

São tantas as coisas que gostaria de agradecer a vocês, que são meus melhores amigos, os alicerces de minha vida e a maior benção de Deus sobre mim. Agradeço imensamente pela valiosa educação baseada em amor e respeito. Por estarem sempre ao meu lado, me incentivando e me norteando em todas as escolhas que até hoje fiz, mostrando que tudo acontece por algum motivo e que este nos faz amadurecer. É grande a saudade que sinto de vocês quando estamos distantes, no entanto, é um sacrifício que eu sei que será recompensado e que vocês muito se orgulharão. A força e a coragem que me fazem seguir em frente, superando obstáculos e buscando novas conquistas, vem de vocês, minha família. Obrigada por tudo, sem vocês nada seria! Amo muito vocês, mãezinha e paizinho!

À minha amada irmã, Fabiana, seu marido Márcio e meu amado sobrinho e afilhado Davi:

Fá, morarmos em cidades distantes fez com que nossa amizade e cumplicidade aumentassem. Com ela percebi a imensidão do amor que sinto por você e por nossos pais e quão necessária e importante é a minha família na minha essência. Eu agradeço a você, minha irmã, por todos os momentos de alegria, ternura, amizade e diversão que compartilhamos, por confiar e se orgulhar de mim, vibrando com minhas conquistas. Também me sinto grata por compartilhar a presença do Davi, meu sobrinho e afilhado, o qual preenche meus dias de alegria, ternura, pureza e amor que só uma criança pode proporcionar. Agradeço ao Márcio por zelar pela alegria, união e cuidado a esta família.

“Como é bom e agradável quando os irmãos convivem em união!”

(Salmos 133:1).

Aos meus primos Camila e Carlos Bragaia:

Sou grata pelos momentos de infância compartilhados como irmãos. Agradeço especialmente pela presença em um dos momentos mais difíceis que passei durante esses anos de estudo, ajudando a conduzir da melhor forma possível a internação e tratamento da minha mãe. Serei eternamente grata pelo cuidado, amor, atenção e zelo com a saúde dela. Vocês foram essenciais! Obrigada!

Aos demais familiares:

Momentos divertidos e afetuosos passo ao lado de vocês, minhas tias (Fran, Ball, Marina e Isabel) e primas (Camila, Débora, Monique e Jéssica). Sou grata pelo apoio e incentivo de sempre, na busca pelos meus objetivos. Tenho um carinho especial por todas vocês!

AGRADECIMENTOS AOS AMIGOS

“A amizade é um sentimento mais nobre do que o amor, eis que permite que o objeto dela se divida entre outros afetos, enquanto o amor tem intrínseco o ciúme, que não admite a rivalidade. E eu poderia suportar, embora não sem dor, que tivessem morrido todos os meus amores, mas enlouqueceria se morressem todos os meus amigos! (...). A alguns deles não procuro, basta-me saber que eles existem. Esta mera condição me encoraja a seguir em frente pela vida. (...). Mas é delicioso que eu saiba e sinta que os admiro, adoro, os amo, embora não declare.”
(Amigos - Vinicius de Moraes)

Minhas queridas amigas: Ana Cristina Stradiotti, Bárbara Fernandes, Beatriz Garcia, Cibele Regina de Souza Kruliski, Mariana Aparecida Ramos, Mariana Sasso Andreasi, Nádia Carvalho, Paola Cristina Faccin, Rhani Ducatti. Agradeço por todas as deliciosas risadas, pelos momentos de descontração e união que compartilhamos. Obrigada por estarem ao meu lado nos momentos de felicidade e também nos de dificuldade e tristeza. Sou imensamente grata pela amizade, pelas palavras de força, perseverança e fé, as quais me deram sustento para seguir minha jornada. Amo vocês.

Aos amigos que fiz no meu estágio no exterior: Eveline Bueno Alves, Jéssica Nora Drum, Luiz R. F. Marçal, Natalie Racine. O tempo longe da minha família e amigas não teria sido fácil se não fosse pela presença e amizade de vocês. Obrigada pelas companhias nas festas, pelas conversas animadas, pelas danças, pelas emoções compartilhadas e pela amizade sincera. Eveline, minha *roommate*, aquela que levantava meu ânimo e sacudia minha rotina! Com você aprendi a viver a vida leve, sem exigências e com mais paciência. Luiz, te conhecer foi uma surpresa muito agradável e inesperada. Desde o início se mostrou muito atencioso e acima de tudo, muito animado e divertido, me proporcionando momentos de felicidade plena. Obrigada por ser tão incrível e sempre me apoiar. Natalie, obrigada por sua amizade além da profissional, todos os momentos que tivemos foram divertidíssimos! *Thank you my American sister!*

Ao meu parceiro de pesquisa e amigo, Alex: obrigada por compartilhar momentos de alegria e descontração durante as atividades de coleta de dados, por transmitir otimismo e tranquilidade em momentos de dificuldades e por compartilhar seu conhecimento ao longo dos anos de parceira.

A presença de vocês ilumina meus dias com a satisfação de tê-los como amigos queridos. Cada um de vocês é uma benção de Deus em minha vida, fazendo parte da minha essência!

AGRADECIMENTOS AOS RESPONSÁVEIS POR ESTE APERFEIÇOAMENTO PROFISSIONAL

A minha orientadora, Maria Rita:

Mais uma vez, sinto-me honrada por ser aluna de uma cientista com forte referência na área da nutrição, a qual exerce um trabalho valioso e admirável. Nas reuniões para discutir os dados da pesquisa, me peguei pensando inúmeras vezes: *“será que um dia vou chegar a ter esses insights de discussão de resultados iguais aos dela? Será que um dia as ideias para novas pesquisas vão surgir em minha mente, em meio a um desprezioso café da tarde?”*.

Professora Maria Rita, acho que finalizamos com chave de ouro a ideia de eu aprender a trabalhar com a técnica da água duplamente marcada. Uma jornada desafiadora, com estudos envolvendo física, química e fisiologia em ciências nutricionais, na qual você me proporcionou a oportunidade de estudar com outros grandes cientistas da área de isótopos estáveis, prof. Ducatti e prof. Schoeller. Sou imensamente grata por confiar esta tarefa a mim, pela credibilidade depositada em meu potencial e em minha capacidade profissional. Obrigada por me orientar nos desafios da pesquisa, os quais são muito bem vindos, pois é estimulante aprender sobre novas e complexas ciências.

Todas as palavras de agradecimento ainda não expressam a gratidão que lhe é de direito. Sua participação em meu aperfeiçoamento pessoal e profissional foi valiosa e ainda pretendo desfrutar sabiamente do seu vasto conhecimento em outras parcerias da vida acadêmica.

Obrigada!

Ao meu coorientador, professor Carlos Ducatti:

Pela fé, eu creio que este agradecimento chegará até você!

Prof. Ducatti, eu sinto um orgulho enorme por ter sido sua aluna e por ter tido o privilégio de aprender com você, uma verdadeira enciclopédia humana sobre a técnica de isótopos estáveis. Um cientista por amor!

Foi por causa do seu contagiante entusiasmo, amor e vibração ao compartilhar o conhecimento sobre isótopos estáveis, que me tornei apaixonada por esta técnica. Pelas inúmeras vezes que, com paciência, sentado frente a sua mesa no corredor do CIE, me explicou sobre as equações, me mostrando as inúmeras aplicações e o quão fascinante é trabalhar com isótopos. De fato, meus olhos brilhavam porque estava entusiasmada com tanto conhecimento e por ver que estava aprendendo algo tão inovador. Fiquei orgulhosa por aprender algo desafiador, principalmente depois que o prof. Schoeller disse que eu fui a aluna com mais conhecimento em isótopos estáveis e equações que apareceu no laboratório dele. Eu queria te contar isso, pois você foi o responsável por me prover conhecimento nessa área. Imaginei você sorrindo todo orgulhoso quando te contasse. E eu sinto que assim você fez, onde quer que esteja. Obrigada por confiar em meu potencial e por me estimular constantemente a aprender sobre água duplamente marcada com o pesquisador pioneiro desta técnica. Realmente professor, foi incrível! Como você diria, voltei com a bagagem cheia!

Além do vasto ensinamento profissional, ainda se mostrou como um pai e um amigo, me orientando e ajudando a enfrentar dificuldades da vida. Obrigada pelas palavras de apoio, pela força nos momentos de dificuldade e angústia e por me incentivar a nunca desistir.

Tudo o que aprendi com o senhor, sem dúvida, faz parte da minha essência pessoal e profissional.

A você prof. Ducatti, meu eterno agradecimento e admiração!

**Ao professor Dale A. Schoeller e seus assistentes de laboratório
Natalie Racine e Timothy Shriver:**

Foi uma grande surpresa e emoção ser aceita para o estágio no laboratório do mais conceituado cientista da área de obesidade e metabolismo energético, prof. Dr. Dale A. Schoeller, quem idealizou a aplicação da técnica da água duplamente marcada em humanos. Um sonho que se iniciou pelos incentivos promovidos pelo prof. Ducatti e profa. Maria Rita, quem me fizeram acreditar que eu poderia estudar com o principal autor dos inúmeros artigos e livros bases dos meus estudos.

Prof. Schoeller, obrigada por compartilhar seu o valioso conhecimento com paciência e cordialidade, sempre buscando a melhor forma de me passar as informações, facilitando a comunicação e compreensão. Obrigada pelas ideias sobre pesquisas, artigos, análises de dados e tudo mais que uma mente brilhante de um cientista como você pode oferecer ao aluno.

Natalie e Tim, dividir um espaço no laboratório com vocês foi engrandecedor e essencial para meu aperfeiçoamento profissional e do idioma. Foi entusiasmante conduzir um experimento com vocês, aprender a manusear os espectrômetros de massa, a utilizar as planilhas de análise de dados, a analisar criticamente os resultados. Agradeço imensamente por compartilharem com simplicidade e entusiasmo todo o conhecimento de vocês.

Além das atividades profissionais, sou grata pela amizade que se iniciou. Foi incrível participar de eventos familiares, passeios de barcos, *tours* pela cidade e *happy hours* com a equipe.

Obrigada por tornarem este estágio tão rico e especial.

AGRADECIMENTOS AOS COLEGAS DE ESTUDO E PESQUISA

Ao Centro de Isótopos Estáveis Ambientais “Prof. Dr. Carlos Ducatti” – IBB/UNESP: Agradeço ao prof. Dr. Carlos Ducatti, criador desta unidade, o qual será sempre lembrado por seu feito na ciência, e à todas as pessoas que ali trabalham: Vladimir, Cibele, Nádia, Mariana, Paulo, Evandro, Edson, pessoas maravilhosas que me receberam com afeição e compartilham comigo seus conhecimentos e a amizade. Agradeço aos alunos (as) Ana Cristina, Luciane, Paola, Barbara, Beatriz, Thais, Gabriel Eva, Gabriel Beato, Nathalia, Ana Hansted, Ana Beatriz, Vânia entre outros, com os quais fiz amizade e compartilhamos momentos alegres e de cumplicidade profissional.

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição – UNESP, Araraquara/SP: agradeço à profa. Dra. Juliana Álvares Duarte Bonini Campos, coordenadora do curso de pós-graduação em alimentos e nutrição, pelo empenho na manutenção e melhora da qualidade da ciência neste curso. Aos funcionários da secretaria da pós-graduação, em especial Cláudia e Christiane, agradeço pela atenção e carinho nos atendimentos, esclarecimento de dúvidas e ajuda na resolução destas. Agradeço aos alunos e companheiros de pesquisa: Alex, Paulina, Mayara e Gabriel Beato pelo apoio a pesquisa e pelos inúmeros momentos de descontração que tornaram essa etapa mais leve.

Ao Laboratório de Espectrometria de Massas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP: agradeço ao prof. Dr. Eduardo Ferriolli e a profa. Dra. Karina Pfrimer pelo conhecimento e experiências compartilhadas e pela parceria na pesquisa. Profa. Karina, você foi crucial na base do meu conhecimento sobre água duplamente marcada, obrigada!

Ao Laboratório de Ecologia Isotópica do Centro de Energia Nuclear na Agricultura – CENA – USP: agradeço ao prof. Dr. Marcelo Zacharias Moreira pelo conhecimento e experiências compartilhadas e pela parceria na pesquisa desde o início das atividades de padronização da técnica da água duplamente marcada. Obrigada por me ajudar com as equações e sanar minhas dúvidas sempre quando preciso.

A Clínica Bariátrica de Piracicaba/SP: Agradeço ao Dr. Irineu Rases Junior e sua equipe multidisciplinar por aceitarem a realização deste trabalho em sua clínica. Obrigada por permitir acesso aos pacientes, à condução das orientações e a execução desta pesquisa com a organização inigualável do seu sistema de atendimento ao paciente bariátrico.

As pacientes participantes: obrigada pela disposição e paciência na execução das tarefas, pela consideração com a pesquisa e, acima de tudo, obrigada pela amizade. Sem a participação de vocês, este sonho não seria possível de se realizar.

As Agências financiadoras: Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelos auxílios às pesquisas (processos nº: 2011/18243-1 e 2013/04420-4) bolsa de doutorado no Brasil (processo nº: 2013/ 03998-2) e bolsa de estágio e pesquisa no exterior (BEPE processo nº: 2016/02306-8). Também agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado (duração de 6 meses) concedida no período inicial do programa de doutoramento.

Enfim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a concretização deste trabalho. Muito Obrigada

*“Lembre-se que as pessoas podem tirar tudo de
você, menos o seu conhecimento.”*

Albert Einstein

Resumo

Objetivo: verificar a influência do *bypass* gástrico em Y-de-Roux (BGR) nas mudanças de composição corporal, gasto energético total (GET) e na acurácia das equações preditivas de GET, nos momentos pré e 6 e 12 meses após a cirurgia bariátrica. **Métodos:** Participaram da pesquisa 20 mulheres (IMC: 40 e 50 kg/m²; idade de 20 a 45 anos). As variáveis do estudo foram coletadas nos momentos pré, 6 e 12 meses pós-cirurgia. O GET, massa livre de gordura (MLG) e massa gorda (MG) foram mensurados pela técnica da água duplamente marcada. O nível de atividade física (NAF) e o gasto de energia em atividade física (GEAF) foram obtidos por meio acelerômetro. O consumo energético foi obtido por três registros alimentares. Foram selecionadas as seguintes equações preditivas de gasto energético: Harris e Benedict (1819), *World Health Organization* (WHO-1985), Mifflin–St Jeor et al (1990), De Lorenzo et al (2001), por Müller et al (2004), Henry (Oxford - 2005), *Dietary Reference Intake* (DRI - 2005) e Lazzer et al (2007). **Resultados:** A perda ponderal (6 meses: -31 ± 4 kg; 12 meses: -38 ± 6 kg) teve contribuição de 17% e 16% da perda de MLG nos momentos 6 e 12 meses, respectivamente. O valor da razão MLG/MG passou de $0,93 \pm 0,12$ kg do momento pré-cirurgia para $1,54 \pm 0,4$ kg e $1,98 \pm 0,6$ kg nos momentos 6 e 12 meses pós-operatórios ($p < 0,05$). O GET reduziu 20% (-612 ± 317 kcal.dia⁻¹) aos 6 meses -10% (-447 ± 516 kcal.dia⁻¹) aos 12 meses de cirurgia, em relação ao valor pré-cirúrgico ($p < 0,05$). Quando corrigido pela MLG, o GET/MLG não apresentou diferença significativa ao final do primeiro ano. A partir dos dados de GET mensurado em relação aos valores preditos por equação desenvolvida para estas pacientes, foi evidenciada a termogênese adaptativa (TA) aos 6 meses pós-operatórios em 39% das participantes, enquanto que aos 12 meses, uma melhor eficiência metabólica foi verificada em 50% das pacientes. A análise de regressão sugeriu que, aos 6 meses após a cirurgia, as mudanças GET se explicam pela alteração no GEAF ($r^2=0,60$; $p=0,00$), porém, não houve associação com as alterações de composição corporal e IE ($P > 0,05$). Aos 12 meses pós-cirurgia, foram destacadas as associações entre alterações do GET com as do peso corporal ($r^2=0,29$; $p=0,02$), da MG ($r^2=0,28$; $p=0,02$) e do GEAF ($r^2=0,49$; $p=0,00$). Quanto à acurácia das fórmulas, as equações de Harris e Benedict (acurácia= 65%; viés= 0%) e DRI (acurácia= 60%; viés= 5%) apresentaram os melhores resultados na predição dos valores de GET, pré-cirurgia. No sexto mês pós-operatório, a maioria das equações apresentou redução na acurácia da predição. Apenas a equação de Harris e Benedict manteve a acurácia de predição do GET acima de 50%. Aos 12 meses pós-cirurgia, as equações que apresentavam baixa acurácia nos períodos anteriores, tiveram um aumento na predição, porém se mantiveram abaixo de 45% de acurácia. Apenas a equação proposta por Lazzer e col. considerando MLG e MG apresentou melhor predição (acurácia= 50%; viés= 9%) neste período. **Conclusão:** aos seis meses pós-operatórios evidenciou-se uma TA referente às restrições energéticas atribuídas pela cirurgia, no entanto, após um ano da cirurgia, uma maior eficiência metabólica foi associada ao GEAF, provavelmente pelo aumento da razão MLG/MG. Essas alterações do metabolismo energético, ocorridas ao longo de um ano do procedimento cirúrgico, podem explicar a grande variabilidade nos resultados das equações preditivas encontradas neste estudo.

Palavras-chave: Obesidade; Cirurgia Bariátrica; Metabolismo Energético, Composição Corporal.

Abstract

Objective: To verify the influence of *Roux-en-Y* gastric bypass (RYGP) on changes in body composition (BC), total energy expenditure (TEE) and in the accuracy of the predictive equations of TEE, at the moments before and six and twelve months after bariatric surgery. **Methods:** Twenty women (BMI: 40 and 50 kg/m²; aged 20 to 45 years) participated in the study. The study variables were collected at pre, 6 and 12 months postoperatively. TEE, fat-free mass (FFM) and fat mass (FM) were measured by the doubly labeled water technique. The physical activity levels (PAL) and energy expenditure in physical activity (EEPA) were obtained through accelerometer. Energy intake (EI) was calculated using 3 days of dietary diaries. The following predictive energy expenditure equations were selected: Harris and Benedict (1819), *World Health Organization* (WHO-1985), Mifflin–St Jeor et al (1990), De Lorenzo et al (2001), Müller et al (2004), Henry (Oxford - 2005), *Dietary Reference Intake* (DRI - 2005), and Lazzer et al (2007). **Results:** The weight loss (6 months: -31 ± 4kg, 12 months: -38 ± 6kg) had a contribution of 17% and 16% of FFM loss at moments 6 and 12 months, respectively. The FFM/FM ratio increased from 0.93 ± 0.12kg from preoperative time to 1.54 ± 0.4kg and 1.98 ± 0.6kg at moments 6 and 12 months postoperative months (p<0.05). The TEE reduced at 6 months 20% (-612 ± 317 kcal.dia⁻¹) and -10% (-447 ± 516 kcal.dia⁻¹) at 12months after surgery, in relation to the preoperative value (p <0.05). When corrected for lean mass, TEE/FFM showed no significant difference at the end of the first year. From the TEE data measured in relation to the predicted values by an equation developed for these patients, the adaptive thermogenesis was evidenced at 6 months postoperatively in 39% of the participants, whereas at 12 months, a better metabolic efficiency was verified in 50% of patients. Regression analysis suggested at six months after surgery, TEE changes are explained by EEPA change (r²= 0.60, p= 0.00), but there was no association with BC and EI changes (P> 0.05). Twelve months after surgery, the associations between TEE changes and those of body weight (r²= 0.29, p= 0.02), FM (r²= 0.28, p= 0.02) and EEPA (r² = 0.49; p= 0.00) were highlighted. For accuracy of the formulas, the Harris and Benedict equations (accuracy= 65%; bias= 0%) and DRI (accuracy= 60%; bias= 5%) presented the best results in predicting TEE values at pre-surgery. In the sixth postoperative month, most of the equations presented a reduction in the accuracy of the TEE prediction. Only the Harris and Benedict equation maintained the prediction accuracy of TEE above 50%. At 12 months after surgery, the equations that presented low accuracy in previous periods had an increase in the prediction, but remained below 45% of accuracy. Only the equation proposed by Lazzer et al, considering FFM and FM showed better prediction (accuracy= 50%; bias= 9%) in this period. **Conclusion:** At six months postoperatively, there was an adaptive thermogenesis related to the energy restrictions attributed by the surgery, however, after one year of surgical treatment, a higher metabolic efficiency was associated with EEPA, probably due to the increase in the FFM/FM ratio. These energy metabolism changes, occurring within one year of the surgical procedure, may explain the great variability in the results of the predictive equations found in this study.

Key-words: Obesity; Bariatric Surgery; Energy Metabolism; Body Composition.

Lista de abreviações e siglas

^{13}C	Isótopo estável natural do carbono
^{15}N	Isótopo estável natural do nitrogênio
^{18}O	Isótopo estável natural do oxigênio
^2H	Isótopo estável natural do hidrogênio
$^2\text{H}_2\text{O}$	Molécula de água marcada no deutério
ACT	Água Corporal Total
ADM	Água Duplamente Marcada
BGYR	<i>Bypass</i> Gástrico em Y-de-Roux
CI	Calorimetria Indireta
CO₂	Dióxido de Carbono
DRI	<i>Dietary Reference Intake</i>
ETA	Efeito Térmico do Alimento
FA	Fator Atividade
GE	Gasto Energético
GEAF	Gasto Energético em Atividade Física
GIP	<i>Gastric Inhibitory Peptide</i>
GLP-1	<i>Glucagon-Like Peptide-1</i>
H_2^{18}O	Molécula de água marcada no oxigênio
IMC	Índice de Massa Corporal
Kg	Quilograma
M	Metro
MG	Massa Gorda
mL	Mililitro
MLG	Massa Livre de Gordura
NAF	Nível de Atividade Física
O²	Molécula de oxigênio
PEP	Peso em Excesso Perdido
PYY	Peptídeo YY
RAF	Registro de Atividade Física
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
VCO₂	Volume de dióxido de carbono
VO₂	Volume de oxigênio
WHO	<i>World Health Organization</i>

Sumário

1. Introdução Expandida	21
Artigo 1	42
Artigo 2	64
2. Considerações Finais.....	90
Referências	92
APÊNDICES.....	100
APÊNDICE A – Casuística e Método.....	100
APÊNDICE B - Padronização da técnica da água duplamente marcada	121
APÊNDICE C - Teste piloto da água duplamente marcada	163
APÊNDICE D - Bolsa de Estágio e Pesquisa no Exterior – BEPE	173
ANEXOS	225
ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	225
ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	227

1. INTRODUÇÃO EXPANDIDA

1. Introdução Expandida

A obesidade vem ganhando proporções alarmantes em nível mundial e nacional (1). A última atualização da *World Health Organization* – WHO (2) evidenciou mais de 1,9 bilhões (39%) de indivíduos acima de 18 anos com sobrepeso, sendo 600 milhões (13%) destes classificados em algum grau de obesidade. De acordo com dados recentes do Sistema de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL), nos últimos 10 anos, a obesidade aumentou 60% no Brasil, classificando 18,9% da população com Índice de Massa Corporal (IMC) maior que 30kg/m² (3). O crescimento dos índices de sobrepeso e obesidade induz ao aumento da procura por tratamentos clínicos e cirúrgicos para redução de peso, porém, nem sempre esses cuidados levam aos resultados efetivos e duradouros (4-7).

Os cuidados clínicos, que englobam a modificação do estilo de vida com reeducação alimentar e exercícios físicos, e os tratamentos medicamentosos, realizados individualmente ou associados, induzem à perda ponderal de 5 a 25% do peso inicial (8-10). No entanto, a redução da massa gorda (MG) pode causar mudanças compensatórias no gasto energético (GE) e no apetite, favorecendo a recuperação do peso (4,5,11-13).

Diante disso, a cirurgia bariátrica está sendo considerada o tratamento mais efetivo na perda ponderal e na melhora das comorbidades de pacientes que apresentam insucesso da perda de peso por meio de tratamento clínico (6,7). Estas cirurgias envolvem procedimentos restritivos, disabsortivas ou mistos (14) que vêm mostrando não desencadear o mecanismo fisiológico compensatório observado nos tratamentos clínicos, e também, favorecendo os mecanismos hormonais de controle do peso (15-18).

No entanto, mesmo sendo considerada uma terapêutica efetiva na perda e manutenção ponderal, é verificado que uma parcela dos pacientes apresentam menores benefícios proporcionados pela técnica cirúrgica, perdendo menos peso que o esperado ou mesmo, recuperando parte do peso perdido (19-21).

A compreensão da fisiopatologia que contribui para a recuperação do peso pós-cirurgia da obesidade é complexa, multifatorial e muitas vezes se sobrepõem. Dúvidas são suscitadas quanto aos resultados metabólicos envolvendo o consumo de energia e o gasto energético total (GET) e seus componentes. A falta de informação limita a elucidação de questões acerca desta recuperação, restringe a discriminação de quais pacientes bariátricos estão predispostos à recuperação do peso e dificulta o desenvolvimento de abordagens terapêuticas para estes casos (22).

A determinação do metabolismo energético de pacientes obesos e dos submetidos à cirurgia bariátrica por meio de técnicas que apresentem boa precisão e acurácia, como a calorimetria indireta (CI) e água duplamente marcada (ADM) com isótopos estáveis, facilitaria a identificação daqueles pacientes metabolicamente propensos à recuperação do peso e facilitaria a intervenção nutricional com objetivo de reversão do fluxo epidêmico da obesidade (23), no entanto, essas técnicas apresentam elevado custo, necessidade de laboratórios adequados e equipe com elevado conhecimento técnico (24), o que dificulta a aplicação na prática clínica.

As equações preditivas são alternativas viáveis e práticas para a determinação do GE no âmbito ambulatorial. Desenvolvidas para grupos de pessoas com diferentes IMC (25-32), as equações vêm sendo testadas em grupos de pessoas com obesidade grave, porém, apresentando resultados controversos, uma

vez que o grau de excesso de peso leva à uma considerável variabilidade dos resultados (33).

Estudos relacionados ao metabolismo energético e aos fatores subjacentes (consumo energético, gasto de energia em atividade física, fatores genéticos e hormonais, etc.) ao processo de recuperação de peso após a cirurgia bariátrica são necessários para elucidar as causas que levam a este desfecho no tratamento da obesidade. Adicionalmente, a validação de equações preditivas para esse grupo populacional também é de grande interesse no âmbito clínico. Os resultados referentes às alterações metabólicas e a melhor equação preditiva de GE do paciente obeso mórbido e bariátrico poderão respaldar estratégias multiprofissionais com o intuito de evitar a incidência de recuperação do peso ou promover abordagens de tratamento mais efetivo aos que atinge essa condição (21,22).

Como introdução ao tema, nesta tese será apresentada uma breve revisão sobre obesidade e alterações do metabolismo energético, composição corporal e consumo alimentar na cirurgia bariátrica, sobre as equações preditivas do gasto de energia em indivíduos obesos, bem como uma revisão sobre a aplicação da técnica da ADM. A metodologia desenvolvida para a execução da pesquisa está descrita detalhadamente no apêndice A. Os resultados deste estudo estão apresentados na forma de dois artigos. Os artigos abordarão a influência do by-pass gástrico em Y de Roux no metabolismo energético, composição corporal e na acurácia das equações preditivas do gasto energético.

1.1 Obesidade

Metabolismo Energético, composição corporal e consumo alimentar na cirurgia bariátrica.

Fatores ambientais, metabólicos e genéticos estão associados à prevalência de sobrepeso e obesidade. No entanto, o balanço energético entre o consumo de alimentos e dispêndio metabólico ainda é a chave para a elucidação de questões acerca do ganho e perda ponderal (34).

A recuperação do peso após os tratamentos clínicos está fortemente evidenciada nas pesquisas científicas. As restrições no consumo energético impostas pelos tratamentos clínicos induzem a mudanças no peso e na composição corporal, com redução da massa metabolicamente ativa, e consequente diminuição dos componentes do GE (4,11,35). Ainda não existe na literatura científica atual, informações que relacionem alterações no consumo de macro e micronutrientes que levem a diminuição dos componentes do GE.

A recuperação de peso após o tratamento clínico de indivíduos previamente obesos pode ocorrer devido a uma menor taxa de oxidação dos lipídeos como fontes energéticas (36) e uma atividade elevada da lipase lipoproteica, induzindo a uma maior captação e estoque dos triglicerídeos nos adipócitos (37), o que caracterizam a adaptação metabólica. No estudo realizado por Leibel et al. (4), no qual indivíduos obesos e não obesos foram submetidos ao tratamento clínico para perda de peso de 10% ou mais em relação ao valor inicial, foi verificado uma redução significativa do GET, do gasto energético em repouso (GER) e do gasto de energia em atividade física (GEAF), corrigidos pela composição corporal, sendo que a redução da massa

livre de gordura (MLG) foi associada aos três componentes avaliados (GET, GER e GEAF) e a da MG aos GET e ao GER. Nesse estudo foi evidenciado um estado hipometabólico pós-restrição alimentar, quando comparado aos valores iniciais, o que poderia explicar a recuperação de peso em obesos que emagreceram. A mesma diminuição dos valores dos componentes energéticos corrigidos pela composição corporal foi encontrada no estudo de Redman et al. (11) no entanto, os autores relataram que os pacientes que realizavam exercício físico não apresentaram adaptação metabólica no GEAF (5), indicando que, possivelmente, indivíduos ativos não desenvolvem adaptação metabólica.

Contraditoriamente, as restrições no consumo energético causadas por métodos cirúrgicos têm mostrado resultados controversos quanto à adaptação metabólica negativa. A cirurgia bariátrica, além da restrição no consumo alimentar ocasionada pela diminuição da câmara gástrica e da diminuição na absorção de nutrientes devido ao desvio intestinal, também favorece a perda ponderal por meio de alteração nas redes neurais do sistema digestivo e alterações hormonais que controlam fome e saciedade (6,38).

O BGYR influencia na função do nervo vago aferente que está conectado ao cérebro, principalmente hipotálamo e bulbo raquidiano, os quais são responsáveis por mecanismos de controle do apetite e saciedade (38). Após o procedimento cirúrgico, os hormônios *Glucagon-Like Peptide-1* (GLP-1) e *Peptide YY* (PYY) apresentam níveis aumentados, enquanto que a grelina e o *Gastric Inhibitory Peptide* (GIP) exibem níveis reduzidos, cada qual desempenhando seus papéis individuais, favorecem a diminuição da sensação de fome e aumento da saciedade, além de atuarem na regulação da homeostase energética e da glicose (38,39).

A regulação do metabolismo energético após a cirurgia bariátrica não foi amplamente estudada, a ponto de justificar a perda de peso menor que o esperado e/ou a recuperação do peso após a cirurgia. Estudos com pacientes submetidos ao procedimento cirúrgico evidenciaram que não houve diferença entre os valores de GER corrigidos por quilo de MLG nos períodos pré, 1, 3 e 6 meses pós-cirúrgico que justificassem a recuperação de peso após o procedimento (40,41). Em pesquisa realizada por Oliveira et al. (42) foi verificado que o GER não foi um determinante para os resultados de recuperação de peso após a cirurgia bariátrica.

A MLG é considerada o tecido metabolicamente mais ativo que a MG. Entre os tecidos que compõe a MLG, o cérebro e órgãos viscerais são os que contribuem com uma maior porcentagem do GER (70 a 80%), porém, correspondem apenas a 5% do peso corporal, enquanto que o tecido muscular contribui com apenas 20% do GER, no entanto, corresponde a 35% do peso corporal (33). Devido ao tecido muscular, o qual tem uma atividade metabólica moderada, estar maior proporção na MLG quando comparados aos órgãos, os quais tem uma atividade metabólica elevada, a manutenção ou mesmo o aumento deste tecido (músculos) por meio de exercícios físicos e consumo adequado de proteínas, pode favorecer uma menor redução do GET e de seus componentes, em períodos de perda de peso intensa (43). Mesmo sendo considerada metabolicamente menos ativa, a MG contribui para o aumento do gasto energético como um todo, uma vez que, na obesidade, esse tecido aumenta em proporções consideravelmente maiores que a MLG, levando ao aumento do GER em valores absolutos, quando comparado aos valores de indivíduos com peso normal (43,33). Porém, quando o GER é expresso por quilo de peso corporal, os valores são menores que os dos indivíduos com peso normal (43,33).

Alguns autores afirmam que não há uma correlação linear entre o GER e a MLG (44-46). Outros se referem à diminuição do GER como um preditor da perda de massa metabolicamente ativa (47,48,35,49). Ainda existem dúvidas sobre estas discrepâncias nos resultados, as quais podem ser explicadas por erros nas técnicas de mensuração das variáveis avaliadas, pelas diferenças nos períodos em que são realizadas as avaliações com os indivíduos atingindo ou não a estabilização do peso, ou mesmo referente à atuação do GEAF sobre as outras variáveis (5,47,48,50).

Comparada ao tratamento clínico, a cirurgia bariátrica tem sido evidenciada como um procedimento efetivo no controle do peso corporal e das comorbidades associadas. No entanto, uma parcela dos pacientes bariátricos obtém emagrecimento menor que o esperado e até mesmo recuperação de parte do peso perdido. Estima-se que em longo prazo, aproximadamente 10% a 20% dos pacientes submetidos à cirurgia bariátrica recuperam o peso corporal perdido (51), diminuindo de 66% de perda do excesso de peso corporal no primeiro e segundo ano pós-cirúrgico para 50% nos 10 anos seguintes (52). Cinco possíveis fatores vêm sendo descritos como os principais responsáveis pela recuperação de peso após cirurgia da obesidade, sendo eles o não cumprimento das orientações nutricionais, saúde mental, alterações endócrino-metabólicas, inatividade física e problema na anatomia dos órgãos devido à cirúrgica (22).

Uma avaliação eficiente do GET e de seus componentes é essencial para a verificação da atuação destes fatores sobre o controle do peso e adaptação metabólica. Os estudos do GER, realizados pela CI, mesmo quando realizadas sob condições estritamente padronizadas, não tem considerado os valores de GEAF, o que afeta significativamente o valor do GET devido sua ampla variação (28). O

mesmo problema é observado quando se avalia o GET em câmaras metabólicas, pois não permitem que os participantes realizem suas atividades normais devido ao confinamento a um ambiente restrito, podendo levar a viés nos dados obtidos.

Em contraste, o uso da técnica da ADM nos isótopos estáveis de deutério (^2H) e no oxigênio-18 (^{18}O) permite a avaliação do GET com o indivíduo em vida livre. Além disso, a diluição destes isótopos estáveis no ambiente aquoso corporal permite a avaliação dos compartimentos corporais (MG e MLG) com maior precisão que os obtidos por métodos indiretos. Desta maneira, a aplicação dos isótopos estáveis tem forte potencial para levar a uma elucidação mais precisa e acurada das questões referentes às alterações metabólicas e de composição corporal, ocasionadas pela cirurgia da obesidade.

Apesar dos esforços para a determinação do metabolismo energético de pacientes obesos e daqueles submetidos à cirurgia bariátrica, as técnicas disponíveis para este fim apresentam elevado custo, necessidade de laboratórios específicos e equipe com conhecimento técnico apurado (24). Com o intuito de tornar essa avaliação viável para a prática clínica, equações preditivas do GE vêm sendo testadas nesse grupo populacional.

Equações preditivas do gasto de energia em obesos

As equações preditivas de GE foram desenvolvidas a partir de valores do metabolismo de energia mensurados por meio de calorimetria direta, indireta ou uso da técnica da ADM. Essas equações são rotineiramente utilizadas na prática ambulatorial e hospitalar com o intuito de elaborar condutas nutricionais específicas ao paciente (53).

O desenvolvimento das equações por métodos de regressão estatística considera variáveis como gênero, peso corporal, altura, idade, etnia e eventualmente a composição corporal em MG e MLG, uma vez que são os principais fatores que influenciam no GE (33,54).

A composição corporal em MG e MLG são os maiores determinantes do GER. Mesmo sendo considerada metabolicamente menos ativa, a MG contribui para o aumento do GE como um todo, uma vez que, na obesidade, esse tecido aumenta em proporções consideravelmente maiores que a MLG, levando ao aumento do GER em valores absolutos quando comparado aos valores de indivíduos com peso normal (33). No entanto, quando expressada por quilo de peso corporal, os valores de GER são menores, o que impacta na acurácia das equações preditivas baseadas em peso corporal (53).

O GET também pode ser influenciado por dois mecanismos opostos relacionados à obesidade. Enquanto que o aumento do GET pode estar associado a contribuição energética positiva ocasionada pelo deslocamento de maior quantidade de tecido adiposo, a redução deste componente pode ser resultante de menores níveis de atividade física, ocasionada pela dificuldade na realização das atividades na presença do excesso de peso (33). Portanto, a adequada avaliação do nível de atividade física (NAF) favorece a determinação do GET com maior acurácia (28).

O NAF é um coeficiente do GER ($NAF = GET/GER$), que traduz o quanto de energia um indivíduo gasta para realizar as tarefas do dia sendo, portanto, o componente mais variável do GET (28). A determinação do GEAF demanda elevados custos referentes às técnicas da CI e ADM (24), porém, pode ser obtido por métodos diretos mais acessíveis como pelo uso de acelerômetros e pedômetros ou de forma indireta como na aplicação de Registros de Atividade Física (RAF) (55).

No entanto, ambas as técnicas apresentam limitações que levam a subnotificação ou supernotificação do NAF (55-57) sendo esta última comumente relatada na população com excesso de peso (58), levando a erros na predição do GET.

As equações preditivas de GE, desenvolvidas para pessoas com peso normal, sobrepeso (25-27,29-31) e específicas para indivíduos obesos (31,32), apresentam resultados controversos quando testadas em indivíduos com obesidade grave ou submetidos à cirurgia bariátrica (59,33). A grande variabilidade nos resultados das equações preditivas pode estar associada à termogênese adaptativa ocasionada pelas alterações na composição corporal e dietéticas bem como alterações hormonais e interação cirúrgica (43), evidenciando a necessidade de avaliações adequadas do GET e seus componentes, bem como do consumo energético e alterações hormonais, que possam ajudar na elucidação dos motivos que levam às alterações no GE de indivíduos obesos e bariátricos, e desta forma contribuir na determinação da melhor equação preditiva para utilização ambulatorial para este público.

1.2 Água duplamente marcada

A aplicação dos isótopos estáveis em ciências nutricionais vem se destacando no meio científico em pesquisas relacionadas à composição corporal (60), ao GET (61-63), ao *turnover* proteico (64), à biodisponibilidade de nutrientes (65) e para a determinação do padrão alimentar de grupos específicos ou populações (66-68).

Devido sua inocuidade, a utilização dos isótopos estáveis como traçadores metabólicos podem ser utilizados em gestantes, crianças, idosos e pessoas

enfermas e saudáveis, sem que se desenvolva qualquer alteração clínica, permitindo o estudo dos aspectos dinâmicos do organismo, ou seja da sua atividade metabólica (69-71).

Os estudos com os traçadores metabólicos se iniciaram em 1935, onde os pesquisadores Shoenheimer e Rittenberg (72) utilizaram o isótopo estável do hidrogênio, conhecido como deutério (^2H), para analisar o metabolismo lipídico de ratos, e a glicina marcada com nitrogênio-15 (^{15}N) para descrever a dinâmica proteica do corpo (73). Estudos com carbono-13 (^{13}C) e oxigênio-18 (^{18}O) também foram realizados naquele período (74,75). A aplicação conjunta de ^2H e ^{18}O foi idealizada por Lifson e colaboradores no início dos anos 50 (76). A técnica, denominada de Água Duplamente Marcada (ADM), possibilitou a descoberta do equilíbrio isotópico do oxigênio presente no dióxido de carbono expirado com o oxigênio presente na água corporal (76). Com esta descoberta, surgiu um novo método para determinação do GET em adição à determinação da composição corporal pela diluição do óxido de deutério nos líquidos corporais.

Em meados dos anos 70, a utilização dos isótopos estáveis como traçadores metabólicos *in vivo* retomou o espaço no meio científico em relação aos isótopos radioativos, que estavam amplamente difundidos nas pesquisas metabólicas (77). Isso ocorreu não apenas pela inocuidade dos isótopos estáveis, mas principalmente devido ao aumento da sensibilidade e acurácia na mensuração com a evolução dos equipamentos, e ao progresso na tecnologia computacional que permitiram a aplicação de doses enriquecidas em menor quantidade, reduzindo o custo (78). Desde então, a determinação do GET por meio da ADM pôde ser validada com a ajuda de modelos matemáticos desenvolvidos por grupos de estudo com bons resultados quanto a acurácia e precisão (79,80).

A primeira pesquisa com aplicação da água ADM em humanos foi reportada em 1982 (81) e se mantém em forte expansão nos centros de estudos. Dados de pesquisas com esta técnica foram utilizados pelo *Institute of Medicine* (28) para a determinação das equações de GET para indivíduos saudáveis. Estas equações estão descritas nos documentos da *Dietary Reference Intake* (DRI), que são utilizados com guias pelos profissionais para a avaliação e planejamento dietético de indivíduos, de acordo as necessidades específicas de energia e nutrientes destes (28).

Uma vez que todas as premissas acerca da metodologia estão adequadas, o GE pode ser mensurado com 2% de acurácia e 2 a 10% de precisão usando o protocolo tradicional (70). Porém, alterações em variáveis fisiológicas e ambientais podem levar a alterações mensuráveis nas abundâncias naturais, induzindo à erros no cálculo de enriquecimento e conseqüentemente, no cálculo do GET (69).

Adicionalmente à avaliação do GET pela ADM, a composição corporal do indivíduo também pode ser mensurada com precisão pela diluição dos isótopos estáveis na água corporal (69,70). A avaliação da composição corporal dos indivíduos é um importante indicador do estado nutricional uma vez que favorece a diferenciação dos tecidos corporais, especialmente MG e MLG (71).

A determinação da composição corporal baseia-se no princípio da constante de hidratação da massa magra, que afirma que em adultos esse componente corporal é composto por 73,2% de água, invariável em situações de saúde. A partir desta afirmativa, o uso dos isótopos, possibilita a determinação da água total presente no organismo e, então, a quantidade de MLG do indivíduo, quando utilizada fórmulas específicas (71).

Teoria da técnica da água duplamente marcada

A técnica da ADM permite estimar a produção de dióxido de carbono (CO_2) por meio da cinética da troca de água no organismo (70,77,82). Constantemente, as células corporais são irrigadas por meio do sistema circulatório com o objetivo de nutrição dos tecidos e remoção dos resíduos. Desta forma ocorre a distribuição equilibrada do compartimento aquoso corporal, no qual, as moléculas de água constantemente entram no sistema por meio de alimentos e bebidas ingeridas e saem por meio de vapor de água escapando dos pulmões e pele ou como parte urinária, fecal e outros fluidos (70).

Quando a ADM é introduzida no compartimento aquoso corporal, ela se distribui uniformemente ao longo das 3 primeiras horas (70,77,82). Uma observação fundamental subjacente à técnica da ADM comprovou fisiologicamente que o oxigênio da água corporal rapidamente entra em equilíbrio isotópico com o oxigênio do bicarbonato ou do dióxido de carbono expirado por meio da enzima anidrase carbônica presente nas células vermelhas e em outros tecidos (70,77,83). Este fato evidenciou que a molécula de H_2^{18}O não apenas irá se misturar com a água corporal e sair do corpo do mesmo modo como a molécula de deutério, mas também irá se misturar e sair do corpo com o C^{18}O_2 expirado (70,77). Portanto, será eliminada mais rapidamente do que o isótopo de deutério.

Enquanto que a taxa de eliminação do ^2H presente no corpo reflete o *turnover* da água corporal, a taxa de eliminação do ^{18}O representa tanto o *turnover* da água corporal quanto o da produção de CO_2 (70,77,82). O cálculo (equação 1) que evidenciou a utilização da técnica da ADM para determinação do GET é baseado em um modelo de um único *pool*, na qual a taxa de perda a partir deste *pool* é igual a

uma taxa constante k (ou taxa de *turnover* fracional), vezes o tamanho do *pool* (77). Portanto, a taxa de perda de água (r_{H_2O}) é a taxa de *turnover* fracional do 2H_2O (k_D), vezes o tamanho do *pool* da água corporal total (N) (77,83).

$$r_{H_2O} = k_D N \quad (1)$$

Onde:

r_{H_2O} = Taxa de perda de água (moléculas/tempo).

k_D = *Turnover* fracional do deutério (tempo^{-1}).

N = tamanho do *pool* da água corporal total (n° de moléculas).

Enquanto que, para o $H_2^{18}O$ (equação 2), a taxa de perda de água (r_{H_2O}) mais a taxa de eliminação do CO_2 (r_{CO_2}) é o produto da taxa de *turnover* fracional do oxigênio da água corporal (k_O) vezes o tamanho do *pool* da água corporal total (N) (77,83):

$$r_{H_2O} + 2 r_{CO_2} = k_O N \quad (2)$$

Onde:

r_{H_2O} = Taxa de perda de água (moléculas/tempo).

r_{CO_2} = Taxa de eliminação do CO_2 (moléculas/tempo).

k_O = *Turnover* fracional do oxigênio (tempo^{-1}).

N = tamanho do *pool* da água corporal total (n° de moléculas).

O fator 2 é necessário pois cada molécula de CO₂ expirado remove 2 átomos de oxigênio, enquanto que a molécula de água remove apenas um átomo de oxigênio (77,83).

A equação 3 é obtida a partir da substituição do rH₂O da equação 1 para a equação 2:

$$k_D N + 2 r_{CO_2} = k_O N \quad (3)$$

Onde:

k_D = *Turnover* fracional do deutério.

k_O = *Turnover* fracional do oxigênio.

N = tamanho do *pool* da água corporal total.

r_{CO_2} = Taxa de eliminação do CO₂.

Resolvendo para o r_{CO_2} (equação 4), a diferença entre os dois produtos (dividido por 2) é igual a taxa de produção do dióxido de carbono (70,77,83) :

$$r_{CO_2} (mol. d^{-1}) = \frac{k_O \cdot N - k_D N}{2} \quad (4)$$

Onde:

k_D = *Turnover* fracional do deutério.

k_O = *Turnover* fracional do oxigênio.

N = tamanho do *pool* da água corporal total.

r_{CO_2} = Taxa de eliminação do CO₂.

Simplificando, têm-se a equação 5:

$$r_{CO_2}(\text{mol. d}^{-1}) = \frac{N}{2} (k_O - k_D) \quad (5)$$

Onde:

k_D = *Turnover* fracional do deutério.

k_O = *Turnover* fracional do oxigênio.

N = tamanho do *pool* da água corporal total.

r_{CO_2} = Taxa de eliminação do CO₂.

A partir do r_{CO_2} é possível determinar o gasto energético total de um indivíduo.

No entanto, o oxido de deutério e o oxigênio-18 não transcrevem exatamente o comportamento fisiológico do hidrogênio (¹H) e do oxigênio (¹⁶O) devido a troca isotópica e ao fracionamento isotópico, levando a correções na equação proposta inicialmente (70,77,83).

A troca isotópica é o processo no qual o ²H e o ¹⁸O trocam com o ¹H e o ¹⁶O presentes em outros tecidos além da água corporal, aumentando assim o espaço de diluição do traçador em relação à diluição destes isótopos apenas na água corporal (77). No caso do deutério ocorre um aumento do espaço de diluição de 4,1%, sendo que a maior troca não aquosa ocorre com os ácidos de hidrogênio das proteínas e em outros compostos bioquímicos menos abundantes (70). O oxigênio-18 tem seu espaço de diluição aumentado em 0,7%, e sua maior troca com o espaço não

aquoso é com os compostos inorgânicos, como o oxigênio do fosfato e em menor grau com o carbonato na massa óssea (70). Portanto, a equação 6 é desenvolvida considerando a correção dos espaços de diluição não aquosos dos compostos marcados, sendo 1.007 para o ^{18}O e 1.041 para o ^2H e obtendo-se o valor da Água Corporal Total (ACT).

$$r_{\text{CO}_2}(\text{mol. d}^{-1}) = \frac{\text{ACT}}{2} (1,007 k_{\text{O}} - 1,041 k_{\text{D}}) \quad (6)$$

Onde:

r_{CO_2} = Taxa de eliminação do CO_2 .

ACT = Quantidade de água corporal total obtida após a correção do espaço de diluição com isótopos com tecidos não aquosos.

1,007 = correção dos espaços de diluição não aquosos do ^{18}O .

k_{O} = *Turnover* fracional do oxigênio.

1,041 = correção dos espaços de diluição não aquosos do ^2H .

k_{D} = *Turnover* fracional do deutério.

Outra correção realizada na equação é referente ao fracionamento isotópico, que é um fenômeno físico que descreve mudanças na abundância isotópica de um composto marcado em relação a um natural, sob determinadas condições físico-químicas (78). No que diz respeito a ADM, os fracionamentos isotópicos de importância são aqueles entre a água corporal e o vapor de água perdido e entre a água corporal e o dióxido de carbono deixando o corpo, sendo que as moléculas de água com compostos marcados evaporam mais lentamente que as moléculas não enriquecidas, no entanto, a conversão do H_2^{18}O (líquido) em C^{18}O_2 (gás) é

favorecida, quando comparada a água natural (77). Portanto, existem 3 fatores de fracionamento: f_1 (0,941): fracionamento entre o ^2H da água e o ^2H presente no vapor de água; f_2 (0,992): fracionamento entre o ^{18}O da água e o ^{18}O presente no vapor de água; e f_3 (1,039): fracionamento entre o ^{18}O da água e o ^{18}O presente no C^{18}O_2 (77). Valores estes referentes à temperatura de 35°C .

Esses fatores de fracionamento são considerados e resolvidos na equação 7 simplificada para determinação da taxa de produção de CO_2 , com o objetivo de corrigir as pequenas diferenças entre as perdas dos isótopos marcados e o fluxo de CO_2 .

$$r_{\text{CO}_2}(\text{mol. d}^{-1}) = 0,455 \cdot \text{ACT} (1,007 k_{\text{O}} - 1,041 k_{\text{D}}) \quad (7)$$

Onde:

r_{CO_2} = Taxa de eliminação do CO_2 .

0,455 = Fatores de fracionamento (f_1 , f_2 , f_3) resolvidos.

ACT = Quantidade de água corporal total obtida após a correção do espaço de diluição com isótopos com tecidos não aquosos.

1,007 = correção dos espaços de diluição não aquosos do ^{18}O .

k_{O} = *Turnover* fracional do oxigênio.

1,041 = correção dos espaços de diluição não aquosos do ^2H .

k_{D} = *Turnover* fracional do deutério.

Com isso, a determinação da taxa de produção de CO_2 se torna mais acurada (1%) e precisa (5%) quando comparada a outros métodos (70).

Determinada a taxa de produção de CO₂, o GET do indivíduo pode ser obtido por meio de uma equação padrão de calorimetria indireta (8), chamada equação de Weir modificada (84).

$$GET (Kcal. d^{-1}) = rCO_2(L. d^{-1}) \times \left(1,10 + \frac{3,90}{R}\right) \quad (8)$$

Onde:

$GET (Kcal. d^{-1})$ = Gasto Energético Total em kcal por dia.

r_{CO_2} = Taxa de eliminação do CO₂ em litros por dia.

1,10 = constante.

3,90 = Constante

R = Coeficiente Respiratório.

Baseado na teoria da técnica da ADM e nas evoluções metodológicas e das equações pode-se concluir que a aplicação desta tecnologia é uma ferramenta precisa e acurada na determinação do GET e da composição corporal, podendo ser aplicada na elucidação de questionamentos acerca do metabolismo energético e de fatores que possam alterar os requerimentos de energia.

Hipóteses

Resultados do nosso grupo de pesquisa (85) obtidos por meio de CI e registros de consumo alimentar mostraram que o GER e o consumo energético relatado não foram fatores determinantes para os efeitos da cirurgia bariátrica no que se refere à perda e/ou recuperação de peso após o procedimento, uma vez que não houve diferença entre os grupos de sucesso e insucesso na perda ponderal. Considerando esses achados, levantamos a hipótese de que os resultados de insucesso de perda ponderal podem estar ligados a questões referentes à atuação do GET, uma vez que a adaptação metabólica pode interferir na perda de peso após a cirurgia. Adicionalmente, questionamos a validade das equações preditivas do gasto energético utilizadas na avaliação clínica do paciente, uma vez que possíveis alterações do GET podem não acompanhar os valores preditos por equações, levando a superestimação da necessidade energética do paciente e conseqüentemente à elaboração de um plano alimentar que induza a manutenção ou ganho ponderal.

Para testarmos nossas hipóteses, tivemos como objetivos: (1) verificar a influência do *bypass* gástrico em Y de Roux nas mudanças de composição corporal e GET aos seis e doze meses após a cirurgia; e (2) testar a acurácia dos valores de GET obtido por meio de equações preditivas do gasto energético em repouso (GER), considerando o NAF e efeito térmico do alimento (ETA), tomando como referência o GET mensurado por ADM, durante a perda ponderal induzida por *bypass* Gástrico em Y-de-Roux, aos seis e doze meses pós-operatório.

Artigo 1

Influência do *bypass* gástrico em Y-de-Roux sobre o gasto energético total e a composição corporal: estudo com água duplamente marcada.

Artigo 1

Influência do *bypass* gástrico em Y-de-Roux sobre o gasto energético total e a composição corporal: estudo com água duplamente marcada.

Resumo

Objetivo: investigar a influência do *bypass* gástrico em Y-de-Roux (BGRY) sobre as alterações da composição corporal (CC) e do gasto energético total (GET), mensurados pela técnica da água duplamente marcada (ADM), 6 e 12 meses após o procedimento. **Métodos:** Dezoito mulheres obesas (IMC ≥ 40 e ≤ 50 kg/m², idade 20 a 45 anos) participaram deste estudo. As variáveis estudadas foram coletadas pré, seis e doze meses pós-cirurgia. A ADM foi utilizada para mensurar o GET, massa livre de gordura (MLG) e massa gorda (MG). Variáveis do gasto energético em atividade física (GEAF) foram obtidas por meio de acelerômetro triaxial. A ingestão energética relatada (IERel) foi obtida por meio de três registros alimentares não consecutivos. **Resultados:** A perda ponderal (6 meses: -31 ± 4 kg; 12 meses: -38 ± 6 kg) teve contribuição de 17% e 16% da perda de MLG nos momentos 6 e 12 meses, respectivamente. O valor da razão MLG/MG passou de $0,93 \pm 0,12$ kg do momento pré-cirurgia para $1,54 \pm 0,4$ kg e $1,98 \pm 0,6$ kg nos momentos 6 e 12 meses pós-operatórios ($p < 0,05$). O GET reduziu 20% (-612 ± 317 kcal.dia⁻¹) no primeiro semestre e de -10% (-447 ± 516 kcal.dia⁻¹) no segundo semestre, em relação ao valor pré-cirurgia ($p < 0,05$). Quando corrigido pela massa magra, o GET/MLG não apresentou diferença significativa ao final do primeiro ano. A partir dos dados de GET mensurado em relação aos valores preditos, foi evidenciada a termogênese adaptativa aos 6 meses pós-operatórios em 39% das participantes, enquanto que aos 12 meses, uma melhor eficiência metabólica foi verificada em 50% das pacientes. A análise de regressão sugeriu que, aos seis meses após a cirurgia, as mudanças GET se explicam pela alteração no GEAF ($r^2 = 0,60$; $p = 0,00$), porém, não houve associação com as alterações de CC e IE ($P > 0,05$). Aos doze meses pós-cirurgia, foram destacadas as associações entre alterações do GET com as do peso corporal ($r^2 = 0,29$; $p = 0,02$), da MG ($r^2 = 0,28$; $p = 0,02$) e do GEAF ($r^2 = 0,49$; $p = 0,00$). **Conclusão:** aos seis meses pós-operatórios evidenciou-se uma termogênese adaptativa, em 39% das participantes, referente às restrições energéticas atribuídas pela cirurgia, no entanto, após um ano do tratamento cirúrgico, uma maior eficiência metabólica, em 50% das pacientes, foi associada ao GEAF, provavelmente pelo aumento da razão da MLG/MG.

Palavras-chave: Cirurgia Bariátrica; Metabolismo Energético; Composição Corporal; Adaptação Metabólica; Água Duplamente Marcada.

1. Introdução

A obesidade vem persistindo como um grave problema de saúde pública, de complexa etiologia e difícil controle. De acordo com a *World Health Organization* – WHO,¹ a prevalência mundial de obesidade mais do que duplicou entre 1980 e 2014. Com isso, a busca por tratamentos efetivos, como os procedimentos cirúrgicos, também apresentou aumento da demanda mundial, passando de 40.000 em 1997 para 468.609 em 2013.² Entre os tipos de cirurgia bariátrica, o *bypass* gástrico em Y-de-Roux (BGYR) é o tratamento com melhores índices de sucesso,³ no entanto, estima-se que uma parcela dos pacientes bariátricos (37%) apresentam recuperação de parte do peso perdido (21 – 29%),⁴ levantando questionamentos quanto a influência de uma possível termogênese adaptativa após o procedimento.

O BGYR induz a uma intensa perda de peso relacionada à diminuição da câmara gástrica e ao desvio intestinal, os quais favorecem a restrição do consumo alimentar e da absorção de nutrientes, e também, devido às alterações nas redes neurais do sistema digestivo com alterações nas liberações hormonais, que controlam o processo de fome e saciedade.^{3,5} Após a cirurgia, os hormônios *Glucagon-Like Peptide-1* (GLP-1) e *Peptide YY* (PYY) apresentam níveis aumentados, enquanto que a grelina e o *Gastric Inhibitory Peptide* (GIP) exibem níveis reduzidos, cada qual desempenhando seus papéis individuais, favorecem a diminuição da sensação de fome e aumento da saciedade, além de atuarem na regulação da homeostase energética e da glicose.^{5,6}

A regulação do metabolismo energético após a cirurgia bariátrica não foi amplamente estudada a ponto de justificar a perda de peso menor que o esperado e/ou a recuperação do peso após a cirurgia. Enquanto alguns autores,^{7,8} afirmam que a restrição no consumo energético ocasionada pelo tratamento cirúrgico pode

alterar a termogênese induzida pela dieta e, conseqüentemente, o gasto energético total (GET), outros autores não evidenciam esses resultados.^{9,10} Adicionalmente, pesquisadores,^{9,11} demonstram que as alterações na composição corporal após a cirurgia bariátrica apresentaram associação com a redução dos valores de gasto energético em repouso (GER).

Entre os compartimentos corporais, a massa livre de gordura (MLG) é considerada o tecido metabolicamente mais ativo que a massa gorda (MG). Cérebro e órgãos viscerais (5% do peso corporal) contribuem para 70 a 80% do GER, enquanto o tecido muscular (35% do peso corporal) demanda 20% do GER.¹³ Porém, mesmo sendo considerada metabolicamente menos ativa, a massa gorda (MG) contribui para o aumento do gasto energético como um todo, uma vez que, na obesidade, esse tecido aumenta em proporções consideravelmente maiores que a MLG, levando ao aumento do GER em valores absolutos, quando comparado aos valores de indivíduos com peso normal.^{12,13} No entanto, quando o GER é expresso por quilo de peso corporal, os valores são menores que os dos indivíduos eutróficos.^{12,13}

O metabolismo energético também pode ser influenciado por dois mecanismos opostos relacionados à obesidade. Enquanto que o aumento do GET pode estar associado à contribuição energética positiva ocasionada pelo deslocamento de maior quantidade de tecido adiposo, a redução deste componente pode ser resultante de menores níveis de atividade física, ocasionada pela dificuldade na realização das atividades na presença do excesso de peso.^{12,13}

Considerando a possibilidade de uma adaptação metabólica ocasionada pelas alterações na composição corporal e dietéticas bem como alterações hormonais e interação cirúrgica,¹² e levando em conta o elevado número de

pacientes que apresentam insucesso no tratamento cirúrgico, o objetivo desta pesquisa foi investigar a influência do BGYR sobre as alterações da composição corporal e do gasto energético total, mensurados pela técnica da água duplamente marcada (ADM), seis e doze meses após o procedimento.

2. Sujeitos e métodos

a. Desenho do estudo

Foi realizado um estudo clínico autocontrolado no qual, informações sobre o GET, gasto de energia em atividade física (GEAF), ingestão energética relatada (IErel) e dados antropométricos foram coletados nos momentos pré, seis e doze meses após a realização do BGYR (Tabela 1). As coletas de dados foram realizadas pelo mesmo avaliador, durante visitas a uma clínica de atendimento à pacientes do sistema de saúde público no Brasil. Nas primeiras visitas de cada momento, foram realizadas apenas orientações verbais quanto ao estudo e as coletas de amostras / informações. Nas segundas visitas, foram realizadas as coletas de urina basal para análise isotópica e ofertada uma dose de ADM para avaliação do GET e da composição corporal, adicionalmente informações gerais e antropométricas foram obtidas, bem como realizadas orientações para o preenchimento adequado do R24h e uso do acelerômetro. Na terceira visita (15 dias após a primeira visita), as amostras de urina, os registros alimentares e os acelerômetros foram coletados e conferidos pelo pesquisador (Tabela 1).

Tabela 1. Descrição dos procedimentos metodológicos desenvolvidos em cada fase do estudo.

Pré-cirurgia	1º visita
	<ul style="list-style-type: none"> • Convite à Pesquisa. • Assinatura do TCLE. • Orientações verbais e escritas para o segundo encontro.
	2º visita
6 e 12 meses pós-cirurgia	<ul style="list-style-type: none"> • Urina (basal). • Dose de ADM (GET e composição corporal). • Orientações para coleta de urina na casa durante 14 dias consecutivos • Informações antropométricas. • Orientações para preenchimento adequado do registro alimentar de 24 horas. • Orientações para uso adequado do acelerômetro.
	3º visita
	<ul style="list-style-type: none"> • Recolhimento das amostras de urina coletadas pelas pacientes. • Recolhimento e conferência do registro alimentar de 24 horas. • Recolhimento do acelerômetro.
6 e 12 meses pós-cirurgia	1º visita
	<ul style="list-style-type: none"> • Recordação da data, horário e preparo para os procedimentos do 2º encontro.
	2º visita
6 e 12 meses pós-cirurgia	<ul style="list-style-type: none"> • Urina (basal). • Dose de ADM (GET e composição corporal). • Orientações para coleta de urina na casa durante 14 dias consecutivos • Informações antropométricas. • Orientações para preenchimento adequado do registro alimentar de 24 horas. • Orientações para uso adequado do acelerômetro.
	3º visita
	<ul style="list-style-type: none"> • Recolhimento das amostras de urina coletadas pelas pacientes. • Recolhimento e conferência do registro alimentar de 24 horas. • Recolhimento e conferência do acelerômetro.

TCLE= Termo de Consentimento Livre e Esclarecido; ADM= Água Duplamente Marcada.

b. Sujeitos

Foram selecionadas para participar da pesquisa 22 mulheres obesas grau III que aguardavam para a cirurgia bariátrica e que concordaram e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, aprovado pelo comitê de ética em pesquisa local (nº do protocolo: 306.538). Os critérios de inclusão foram: idade entre 20 e 45 anos, férteis, com índice de massa corporal (IMC) de 40 kg/m² a 50 kg/m²; que não apresentassem edema e doenças relacionadas às alterações no metabolismo

energético e que não fizessem uso de medicamentos que levasse alterações metabólicas e absorptivas. Foram excluídas duas pacientes aos seis meses de cirurgia devido à desistência e outras duas pacientes aos 12 meses pós-operatórios devido à resultados de análise isotópica inadequados, sendo analisados estatisticamente os dados de 18 mulheres que completaram todas as etapas ao final do estudo.

c. Consumo alimentar e Ingestão energética relatada (IErel)

O consumo de nutrientes e de energia foram obtidos por meio de registros alimentares de 24 horas (Rg24h) preenchidos em três dias não consecutivos, sendo dois durante a semana e um de final de semana, para cada período de coleta de dados. As medidas caseiras,^{14,15} do consumo diário de alimentos, bebidas e suplementos alimentares (incluindo proteicos e de micronutrientes, quando consumidos) foram tabuladas e o consumo de nutrientes e a IErel foi calculada baseada nas informações referentes ao consumo em 100 g de alimento da tabela de consumo alimentar da população brasileira,¹⁶ ou referentes à tabela de composição nutricional dos suplementos alimentares citados nos registros alimentares. Os valores dos nutrientes e da energia consumida foram corrigidos pela variação do consumo intra- e interindividual por meio da estatística ANOVA fator único. Após verificarmos que não houve associação entre as alterações no consumo de macro e micronutrientes e as alterações do GET entre os períodos, esses dados não foram apresentados em tabelas e discutidos.

d. Antropometria e composição corporal

Sob condições padronizadas as medidas de peso corporal e estatura foram obtidas pela balança acoplada à bioimpedância InBody 230[®] e antropômetro vertical da marca SECA[®], respectivamente. As coletas foram realizadas no período da manhã, com as pacientes utilizando vestimentas leves e sem sapatos, após jejum de 8 horas. O IMC foi calculado pelo peso corporal dividido pela altura ao quadrado.

A quantidade de massa gorda (MG) e massa livre de gordura (MLG) foram calculadas por meio da técnica de diluição de isótopos estáveis ($^2\text{H}_2^{18}\text{O}$), de acordo com protocolo proposto por Schoeller.¹⁷ A partir da determinação de água corporal total, calculamos a MLG usando a constante de hidratação de mamíferos (73.2%) e, subtraindo este valor do peso total, obtivemos a quantidade de MG.

e. Gasto de energia total (GET)

O GET foi determinado pelo *turnover* isotópico dos compostos enriquecidos na água corporal. Uma dose de 2g de ^{18}O à 10,8 átomos% por quilo de água corpórea e 0,12g de óxido de deutério a 99,8 átomos% por quilo de água corpórea foi ofertada à cada participante. Amostras de urina, coletadas pré e após 14 dias da ingestão da dose foram analisadas em triplicata em espectrômetro de massa de razão isotópica (modelos Hydra 20-20 e Hydra 20-22, Europe Scientific – Cheshire/UK). O protocolo de múltiplos pontos proposto por Schoeller,¹⁷ foi utilizado na determinação do GET.

f. Gasto de energia em atividade física (GEAF)

Durante 14 dias, as participantes utilizaram o acelerômetro triaxial (ActiGraph modelo GT3X+; ActiGraph, Pensacola, FL, USA) acoplado na região da cintura e calibrado individualmente de acordo com as especificações do fabricante. Informações referentes ao nº de passos diário e nível de atividade física (NAF) obtido por meio da equação proposta por Crouter et al,¹⁸ foram utilizados para o cálculo do GEAF.

g. Cirurgia Bariátrica

Após tratamento clínico comportamental com objetivo de perda ponderal de 10% do peso inicial, o BGYR foi realizado. A cirurgia é descrita como uma laparotomia mediana supraumbelical, no qual um reservatório gástrico de pequena curvatura (8 x 2 cm) foi confeccionado.¹⁹ Houve uma reconstrução do trânsito em Y *de Roux* com alça biliar a 40 cm do ângulo de Treitz e alça alimentar de 150 cm em posição pré-cólica.¹⁹

h. Análise dos dados

As análises estatísticas foram conduzidas no software IBM SPSS *Statistics* (Versão 21.0, Armonk, NY: IBM Corp) e MedCal (versão 11.6.0.0) para Windows. As variáveis foram apresentadas em média e desvio-padrão. Os valores delta (Δ) (diferença da média) descreveram a diferença dos valores das variáveis dos períodos seis (T1) e doze meses (T2) em relação aos valores das variáveis do período pré-operatório (T0).

O teste ANOVA *one-way* seguida do teste de Bonferroni foi realizado para análise comparativa das variáveis da composição corporal, gasto energético e

consumo de energia relatada para os três momentos. O teste *t* pareado foi aplicado para a comparação entre os valores de GET mensurado e predito. A interação entre as mudanças nos valores delta das variáveis do estudo, usando as alterações dos valores delta do GET a partir do momento pré-operatório como variável dependente, foi avaliada por análise de regressão linear.

Para investigar quanto a redução do GET foi decorrente das mudanças da composição corporal e do NAF, dados do GET mensurado no momento pré-cirurgia foram utilizados na elaboração de uma equação preditiva, de acordo com método descrito por Knuth e colaboradores,²⁰ considerando MG, MLG, idade e NAF em uma regressão linear múltipla:

$$[GET_{pred} = -2249,7 + (29,5 \times MLG) + (16,8 \times MG) - (11,5 \times Idade) + (1787 \times NAF)]$$

Esta equação qual apresentou correlação positiva ($r^2=0.54$; $p=0.02$) entre os valores mensurados e preditos do momento pré-cirurgia. A adaptação metabólica foi calculada a partir da diferença entre o valor de GET mensurado e o GET predito e comparada antes e após a cirurgia, sendo considerada adaptação termogênica desvios do GET mensurado $\leq 90\%$ e $\geq 110\%$ do valor de GET predito. Um valor acurado a nível individual foi considerada quando o valor do GET medido se encontrava entre $>90\%$ e $<110\%$ do valor predito pela equação. O teste *kappa* foi utilizado para avaliar a concordância dos dados de GET predito e aferido entre os momentos.

3. Resultados

A tabela 2 mostra as alterações de composição corporal, gasto e consumo energético, ao longo de um ano de cirurgia bariátrica. Uma perda de peso de $-31,3 \pm 4,3$ kg; ($\cong -27\%$) foi verificada aos 6 meses de cirurgia e de $-38,2 \pm 6,2$ kg; ($\cong -33\%$) aos 12 meses pós-operatórios. A MLG reduziu $5,3 \pm 2,1$ kg (-10% ; $p < 0,05$) aos seis meses pós-cirúrgico, apresentando-se estável (-11%) ao completar um ano do procedimento ($-6,1 \pm 4,2$ kg). Com um déficit de $\cong -26$ e -32 kg nos momentos seis e doze meses pós-operatórios, respectivamente, a MG reduziu seus percentuais em $\cong -12$ e -17% nos períodos avaliados. A perda de peso total teve contribuição de 17 e 16% provindos da perda de MLG, nos momentos 6 e 12 meses pós-operatórios, respectivamente. A perda de MG ao longo do período favoreceu o aumento significativo (113%) da proporção de MLG em relação a MG ($0,93 \rightarrow 1,98$).

Em relação às variáveis do gasto energético (Tabela 2), verificamos que o GET (2292 ± 430 kcal.dia⁻¹, -20%) aos seis meses pós-operatórios apresentou valores significativamente reduzidos ao serem comparados aos valores pré-cirúrgicos (GET = 2904 ± 547 kcal.dia⁻¹), mantendo-se estável (2538 ± 336 kcal.dia⁻¹, -10%) ao completar um ano do procedimento. O GET relativo à MLG também apresentou valores menores ($p < 0,05$) aos seis meses pós-operatórios (47 ± 9 kcal.kg⁻¹.dia⁻¹) quando comparado ao valor basal (54 ± 8 kcal.kg⁻¹.dia⁻¹), no entanto, aos doze meses pós-cirurgia (53 ± 7 kcal.kg⁻¹.dia⁻¹) se assemelhou aos valores pré-tratamento ($p > 0,05$). A IErel reduziu significativamente após seis meses de cirurgia (-515 ± 521 Kcal.dia⁻¹), mantendo-se sem grandes variações ao final do período de estudo. O NAF, o nº de passos e o GEAF não apresentaram diferença significativa no período avaliado, sendo que o NAF e o nº de passos apresentou excelente correlação pelo teste de *Pearson* no pré-operatório ($r = 0,93$; $p = < 0,001$) e boa

correlação nos momentos pós seis ($r = 0,78$; $p = < 0,001$) e pós doze meses ($r = 0,65$; $p = 0,003$) de cirurgia.

Tabela 2. Composição corporal, gasto energético e ingestão energética relatada, pré e pós-cirurgia bariátrica ($n = 18$).

Variáveis	Pré (T0)	6 meses (T1)	12 meses (T2)	p*	Δ T1-T0 (6 meses)	Δ T2-T0 (12 meses)
Composição Corporal						
Peso corporal (kg)	112,6 \pm 7,3 ^a	81,3 \pm 7,1 ^b	74,4 \pm 7,4 ^c	<0,001	-31,3 \pm 4,3	-38,2 \pm 6,2
IMC (kg/m ²)	45 \pm 2 ^a	32 \pm 3 ^b	30 \pm 3 ^c	<0,001	-12 \pm 2	-15 \pm 5
MLG (kg)	54,2 \pm 4,7 ^a	48,9 \pm 4,6 ^b	48,1 \pm 4,6 ^b	<0,001	-5,3 \pm 2,1	-6,1 \pm 4,2
MG (kg)	58,4 \pm 5,9 ^a	32,4 \pm 7,0 ^b	26,1 \pm 6,4 ^c	<0,001	-26,0 \pm 4,3	-32,3 \pm 5,5
MG (%)	52 \pm 3 ^a	40 \pm 6 ^b	35 \pm 6 ^c	<0,001	-12 \pm 4	-17 \pm 5
MLG (kg) / MG (kg)	0,93 \pm 0,12 ^a	1,54 \pm 0,4 ^b	1,98 \pm 0,6 ^c	<0,001	0,62 \pm 0,32	0,94 \pm 0,72
Energia						
GET (kcal.dia ⁻¹)	2904 \pm 547 ^a	2292 \pm 446 ^b	2538 \pm 336 ^b	0,01	-612 \pm 317	-447 \pm 516
GEAF (kcal.dia ⁻¹)	1126 \pm 367	905 \pm 256	1061 \pm 203	0,065	-221 \pm 220	-29 \pm 423
NAF	1,65 \pm 0,18	1,67 \pm 0,16	1,73 \pm 0,19	0,337	0,00 \pm 0,16	0,01 \pm 0,16
Nº de passos	7669 \pm 2964	8396 \pm 2856	9549 \pm 4008	0,239	727 \pm 3250	1880 \pm 3895
IErel (kcal.dia ⁻¹)	1431 \pm 386 ^a	916 \pm 281 ^b	1115 \pm 402 ^b	<0,001	-515 \pm 521	-317 \pm 533
GET / MLG (kcal.kg ⁻¹ .dia ⁻¹)	54 \pm 8 ^a	47 \pm 9 ^b	53 \pm 7 ^a	<0,001	-6 \pm 5	-1 \pm 12

IMC = índice de massa corporal; MLG = massa livre de gordura; MG = massa gorda; GET = gasto energético total; GEAF = gasto de energia em atividade física; NAF = Nível de atividade física; IErel = ingestão energética relatada; GET / MLG = relação do gasto energético total por unidade de massa livre de gordura. * ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.

Na tabela 3 são apresentadas as diferenças entre os valores medidos e preditos do GET e os resultados referentes ao grau de adaptação metabólica (diferença entre o GET medido versus predito) decorrente das alterações na composição corporal e no NAF. Os valores de GET mensurado em relação ao GET predito não apresentaram diferenças ($p > 0,05$) em nível de grupo, para os momentos

analisados. No entanto, ao nível individual, no primeiro semestre pós-operatório foi verificada uma termogênese adaptativa em 39% das participantes com a redução do GET medido em relação ao predito ($k = 0,28$; $p < 0,05$), enquanto que aos 12 meses, uma melhor eficiência metabólica ($k = 0,39$; $p < 0,05$) foi verificada em 50% das participantes.

Tabela 3. Valores medidos e preditos de GET e adaptação metabólica (Δ GETm – GETp) do GET aos 6 e 12 meses após a cirurgia bariátrica.

	GETm (Kcal/dia)	GETp (Kcal/dia)	Teste <i>t</i> <i>p</i>	Δ GETm – GETp (Kcal/dia)	Acurácia de Predição > 90% < 110% (nº / %)	Abaixo $\leq 90\%$ (nº / %)	Acima $\geq 110\%$ (nº / %)
Pré	2904 \pm 547	2903 \pm 404	0,993	1 \pm 370	14 (78%)	2 (11%)	2 (11%)
6 meses	2292 \pm 446	2361 \pm 348	0,548	-69 \pm 477	9 (50%)	7 (39%)	2 (11%)
Teste Kappa (p-unilateral)						0,28 (0,03)	0,00 (0,5)
12 meses	2538 \pm 336	2372 \pm 353	0,143	166 \pm 459	8 (44%)	1 (6%)	9 (50%)
Teste Kappa (p-unilateral)						0,06 (0,27)	0,39 (0,01)

GETm = Gasto energético total mensurado; GETp = Gasto energético total predito; Δ = diferença entre os valores mensurados e preditos; Kappa: p-unilateral: teste realizado entre os valores dos momentos 6 e 12 meses (obtido) com relação aos encontrados no momento pré (previsto); Acurácia de predição = nº e percentagem de mulheres com valores mensurados de gasto energético > 90% < 110% do valor predito; Abaixo = Porcentagem de mulheres com valores mensurados do gasto energético igual ou abaixo de 90% do valor predito; Acima = Porcentagem de mulheres com valores mensurados do gasto energético igual ou acima de 110% do valor predito.

Na tabela 4 são apresentados os resultados de associação entre as diferenças das médias (valores deltas) das variáveis estudadas aos 6 e 12 meses, respectivamente. A análise de regressão sugere que, seis meses após o procedimento, a diminuição do GEAF se associa positivamente com a redução do GET ($\beta = 1,12$; $r^2 = 0,60$; $p = 0,00$), no entanto, as alterações das variáveis de composição corporal e IErel não apresentam associação com as mudanças do GET, neste período. Na avaliação após um ano de *bypass* gástrico (Tabela 4), verificamos que a redução dos valores de peso corporal passou a mostrar associação positiva

com a redução do GET ($\beta = 56,1$; $r^2 = 0,29$; $p = 0,02$), assim como as alterações da MG explicaram em 28% as mudanças do dispêndio de energia diária ($\beta = 61,9$; $r^2 = 0,28$; $p = 0,02$). Uma associação positiva também foi evidenciada com as alterações do GEAF em relação às mudanças do GET ($\beta = 0,86$; $r^2 = 0,49$; $p = 0,00$), indicando que quanto menor o gasto de energia em atividade, menor o GET da pacientes bariátricas.

Tabela 4. Associações entre alterações da composição corporal, ingestão energética e gasto energético, 6 e 12 meses após a cirurgia RYGB.

Valores Δ Entre os períodos	GET (kcal.dia ⁻¹)					
	Δ T1-T0			Δ T2-T0		
	β	R^2	p	β	R^2	p
Δ T1-T0 / Δ T2-T0						
Peso corporal (kg)	30,8	0,17	0,09	56,1	0,29	0,02
MLG (kg)	22,5	0,02	0,56	31,1	0,04	0,41
MG (kg)	24,9	0,11	0,17	61,9	0,28	0,02
GEAF (kcal.dia⁻¹)	1,12	0,60	0,00	0,86	0,49	0,00
IErel (kcal.dia⁻¹)	0,01	0,00	0,93	0,33	0,07	0,29

MLG = massa livre de gordura, MG = massa gorda; GEAF = Gasto de energia em atividade física; IErel = Ingestão energética relatada; Δ = diferença entre momento 6 meses (T1) ou 12 meses (T2) e momento pré-cirurgia(T0). p = de análise de regressão linear.

4. Discussão

A compreensão das mudanças ocasionadas no gasto energético depois da cirurgia bariátrica, e sua relação com a perda de peso e seus componentes, podem favorecer *insights* sobre os mecanismos ligados à perda ponderal e, conseqüentemente, ajudar a reconhecer quais pacientes estão propensos ao insucesso no tratamento e/ou favorecer o desenvolvimento de estratégias efetivas para a perda ponderal e manutenção do peso perdido de pacientes bariátricos.

Neste estudo verificamos um hipometabolismo em 39% das pacientes aos seis meses pós-cirurgia, provavelmente ocasionada pela termogênese adaptativa induzida pela restrição alimentar. No entanto, ao completar um ano do procedimento cirúrgico, uma melhor eficiência metabólica foi destacada em 50% das participantes, uma vez que estas apresentaram um aumento do GET mensurado em relação ao predito com uma equação desenvolvida com parâmetros pré-operatórios. Provavelmente esse aumento do GET mensurado pode estar associado ao aumento da proporção da MLG em relação à MG e à atuação do NAF no GEAF, uma vez que verificamos uma associação positiva entre as variações do GEAF e o GET aos 12 meses de cirurgia. Esses resultados servem de subsídios para investimentos em estratégias de intervenção para recuperação e manutenção da MLG como fator de proteção para os resultados da cirurgia.

As perdas de MG e MLG não explicaram, a partir do teste de regressão linear, a redução de 20% do GET aos seis meses pós-cirurgia, enquanto que, pesquisadores,^{9,11} mostraram que a redução de 25% do GET está associado à significativa diminuição da MLG nos pacientes bariátricos. A falta de associação entre as alterações na composição corporal e a redução significativa do GET pode ser explicada pela adaptação metabólica independente da MLG.²¹ Esta termogênese adaptativa (TA) ocorre em resposta às mudanças no balanço energético, no qual o balanço energético negativo direciona a TA à economia de energia como uma defesa biológica para o controle da perda ponderal relacionada principalmente as alterações do GER.²¹ Além disso, uma explicação plausível para a falta de associação entre a redução da MLG com a diminuição do GET, pode ser referente a uma menor contribuição (17%) da perda de massa magra na redução do peso corporal encontrada nos nossos resultados, diferente de outros estudos que

apresentam entre 20%,²² a 28%,^{20,23} da perda de peso total provindos da diminuição de massa magra, e associação positiva entre a redução da MLG e do GET.

A possibilidade da TA induzida pela restrição no consumo alimentar foi levantada aos seis meses pós-operatórios, uma vez que o BGYR promove alterações anatômicas e fisiológicas envolvidas na TA.¹² Nossas participantes apresentaram uma diminuição significativa ($-515 \pm 521 \text{ kcal.dia}^{-1}$) da ingestão energética relatada aos seis meses pós-operatórios, o qual, junto com fatores como má digestão e má absorção de nutrientes, podem estar associados à TA induzida pela dieta neste período.^{24,25}

No entanto, alterações no consumo energético de nossas pacientes não se associaram à redução do GET pela regressão linear. Neste caso, não podemos descartar a influência da subnotificação do consumo energético, fortemente evidenciada na aplicação de inquéritos alimentares para população com excesso de peso,²⁶ o que poderia estar ocorrendo principalmente no momento pré-operatório, sendo um dos fatores que dificulta a associação da redução da IErel à diminuição do GET. Para excluir este viés, a avaliação da termogênese induzida pela dieta (TID) por meio de calorimetria indireta (CI) seria a melhor alternativa na verificação da adaptação deste componente do gasto energético, sendo esta, uma limitação encontrada em nosso estudo. Os poucos estudos de TID por meio de CI após cirurgia bariátrica têm mostrado resultados controversos. Enquanto uns autores,^{9,27} evidenciaram que não há diferença neste componente do gasto energético aos 3 e 14 meses após o *bypass* gástrico em relação aos valores iniciais, outros mostraram um aumento de 200% da TID aos 12 meses pós BGYR em relação ao grupo controle.²⁸

A redução do peso corporal promove redução do GET e todos os seus componentes, no entanto, a TA ocorre independente do peso e da composição corporal. Esta adaptação faz referencia às mudanças na atividade metabólica celular que levam à diminuição do GER e dos demais componentes (GEAF, TID e à termogênese induzida pelo frio).^{21,29} O único fator que explicou em 60% a redução do GET no primeiro semestre pós-operatório foi o GEAF, redução esta que persistiu após um ano do tratamento cirúrgico, sendo explicada em 49% pela diminuição do GEAF neste período.

Nesse estudo, o NAF fornecido pelo acelerômetro, pressupõe uma estimativa do GER a partir de equações preditivas que, para nossos pacientes, poderíamos pressupor alteração em função da restrição alimentar induzida pela cirurgia bariátrica. No entanto, em nosso estudo sobre a correlação entre o NAF e o nº de passos passou de excelente para boa, porém se manteve, o que nos permite inferir a influência do GEAF sobre o GET. Neste sentido, nossos resultados confirmam os encontrados por outros autores onde, mesmo com o aumento do NAF de pacientes bariátricos,³⁰ o GEAF tende a reduzir com a importante perda ponderal, uma vez que o custo energético ao carregar menor carga de peso corporal durante atividades físicas, reduz significativamente,³¹ associando-se com a diminuição dos GET do paciente.

Poucos estudos aferiram o GET em pacientes bariátricos após um ano do tratamento. Neste grupo de pacientes verificamos que o GEAF influencia significativamente o GET, o que abre uma frente de estudos sobre este componente e sua atuação na recuperação do peso após a cirurgia, já que nossos estudos anteriores,³² relacionados ao GER, não explicaram diferenças em pacientes com menor ou maior perda de peso.

Mesmo observando que a restrição energética e as alterações fisiológicas ocasionadas pela cirurgia podem levar a uma adaptação metabólica negativa aos seis meses pós-cirurgia, foi surpreendente que após um ano do tratamento, uma melhor eficiência metabólica foi destacada em 50% das pacientes e que esta melhora estava relacionada à composição corporal e à atividade física, de certa forma, independente das alterações fisiológicas ocasionadas pelo BGYR. Assim, o aumento em dobro no valor da razão MLG / MG, do momento pré-cirurgia ($0,93 \pm 0,12$) para o momento 12 meses pós-operatório ($1,98 \pm 0,6$), pode explicar a melhor eficiência metabólica apresentada por metade das nossas pacientes. Também pode ser explicada pelo GET corrigido pela MLG que não apresentou diferença entre o valor de 12 meses pós-cirurgia e pré-operatório. Autores confirmam que a preservação da massa magra, favorecida pelo aumento do NAF e pela suplementação proteica,¹² em períodos de perda de peso intensa, favorece menor redução do gasto energético.

Esta tendência de adaptação metabólica aos seis meses de BGYR e recuperação desses valores um ano após a cirurgia foi encontrada no estudo de Knuth e colaboradores,²⁰ que avaliou apenas o GER e sua relação com a composição corporal dos participantes. Os dados do presente estudo encorajam fortemente a realização de pesquisas relacionadas ao GET e seus componentes como o GEAF e a TID, visto que são elementos manipuláveis e que neste estudo há indícios de que podem influenciar positivamente os resultados da cirurgia bariátrica. Associadamente as avaliações dos componentes do gasto energético, o acompanhamento da evolução corporal é necessária, visto que a manutenção da MLG e os melhores valores de razão MLG e MG podem estar diretamente relacionados aos melhores resultados de peso após o BGYR.

5. Conclusão

Concluimos que aos seis meses da cirurgia bariátrica, um período de subalimentação e de perda de peso intensa, ocorre os menores valores de GET, quando a termogênese adaptativa esforça-se em manter o peso corporal num momento de importantes alterações fisiológicas. No entanto, após um ano do tratamento cirúrgico, a maior razão da MLG em relação a MG, associada ao GEAF, garante uma maior eficiência metabólica. Desta forma, o aumento do NAF pode ser uma boa estratégia para a manutenção do GET e, conseqüentemente, melhorar os resultados da cirurgia bariátrica sobre o peso corporal.

Referências

1. World Health Organization (WHO). Obesity and overweight: 2014. **Fact sheet 311**; Updated June 2016. Disponible in <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>> Accessed in July 2017.
2. Angrisani L, Santonicola A, Iovino P, Formisano G, Buchwald H, Scopinaro N. Bariatric Surgery Worldwide 2013. *Obes Surg* 2015; **25**:1822–1832. DOI 10.1007/s11695-015-1657-z
3. Buchwald H, Avidor Y, Braunwald E, Jensen MD, Pories W, Fahrbach K et al. Bariatric Surgery: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA*. 2004; **292**:1724-1737.
4. Cooper TC, Simmons EB, Webb K, Burns JL, Kushner RF. Trends in Weight Regain Following Roux-en-Y Gastric Bypass (RYGB) Bariatric Surgery. *Obes Surg* 2015; **25**:1474–1481. DOI 10.1007/s11695-014-1560-z.
5. Buchwald H. The Evolution of Metabolic/Bariatric Surgery. *Obes Surg* 2014; **24**:1126–1135. DOI 10.1007/s11695-014-1354-3.
6. Ionut V, Burch M, Youdim A, Bergman RN. Gastrointestinal hormones and bariatric surgery-induced weight loss. *Obes* 2013; 21(6): 1093-1103.
7. Faria SL, Faria OP, Cardeal MA, Gouvea HR, Buffington C. Diet-induced thermogenesis, and respiratory quotient after Roux-en-Y gastric bypass. *Surg Obes Relat Dis* 2012; **8**:797–802.
8. Werling M, Olbers T, Fandriks L, Bueter M, Lonroth H, Stenlof K et al. Increased postprandial energy expenditure may explain superior long term weight loss after roux-en-y gastric bypass compared to vertical banded gastroplasty. *PLoS One* 2013; **8**: e60280.
9. Das SK, Roberts SB, McCrory MA, Hsu LG, Shikora SA, Kehayias JJ, et al. Long-term changes in energy expenditure and body composition after massive weight loss induced by gastric bypass surgery. *Am J Clin Nutr*. 2003;**78**:22–30.
10. Schmidt JB, Pedersen SD, Gregersen NT, Vestergaard L, Nielsen MS, Ritz C et al. Effects of RYGB on energy expenditure, appetite and glycemic control: a randomized controlled clinical trial. *Inter J Obes*. 2016; **40**: 281–290.
11. Tamboli RA, Hossain HA, Marks PA, Eckhauser AW, Rathmacher JA, Phillips SE et al. Body composition and energy metabolism following Roux-en-Y gastric bypass surgery. *Obesity Silver Spring*. 2010; **18**: 1718–24.
12. Thivel D, Brakonieki K, Duche P, Béatrice M, Yves B, Laferrère B. Surgical Weight Loss: Impact on Energy Expenditure. *Obes Surg*. 2013; **23**; 255-266.

13. Madden AM, Mulrooney HM, Shah S. Estimation of energy expenditure using prediction equations in overweight and obese adults: a systematic review. *J Hum Nutr Diet* 2016; **29**: 458-476. Doi:10.1111/jhn.12355.
14. Pinheiro ABV, Lacerda EMA, Benzecr EH, Gomes MCS, Costa, VM. Tabela de avaliação de consumo alimentar em medidas caseiras. 5ª ed. São Paulo: Atheneu, 2005, 131p.
15. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Pesquisa de orçamentos familiares, 2008-2009 (POF): Tabela de Medidas Referidas para Alimentos consumidos no Brasil. Rio de Janeiro, 2011.
16. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Pesquisa de orçamentos familiares, 2008-2009 (POF): Tabelas de composição nutricional dos alimentos consumidos no Brasil. Rio de Janeiro, 2011.
17. Schoeller DA. Measurement of energy expenditure in free-living humans by using doubly labelled water, *J Nutr* 1988; **118**: 1278-1289.
18. Crouter SE, Kuffel E, Haas JD, Frongillo EA, Bassett, DR Jr. A Refined 2-Regression Model for the ActiGraph Accelerometer. *Med Sci Sports Exerc* 2010;**42(5)**:1029-1037.
19. American Society for Metabolic and Bariatric Surgery (ASMBS). Bariatric Surgery Procedures. Disponible in: <https://asmbs.org/patients/bariatric-surgery-procedures>. Accessed in: June 09, 2017
20. Knuth ND, Johannsen DL, Tamboli RA, Marks-Shulman PA, Huizenga R, Chen KY, et al. Metabolic adaptation following massive weight loss is related to the degree of energy imbalance and changes in circulating leptin. *Obes* 2014; **22(12)**: 2563–9.
21. Muller, MJ, Enderle J, Bosy-Westphal A. Changes in Energy Expenditure with Weight Gain and Weight Loss in Humans. *Curr Obes Rep* 2016 **5**: 413–423. DOI 10.1007/s13679-016-0237-4.
22. Van Gemert WG, Westerterp KR, Van Acker BA, Wagenmakers AJM, Halliday D, Greve JM, et al. Energy, substrate and protein metabolism in morbid obesity before, during and after massive weight loss. *Int J Obes Rel Metab Disord* 2000; **24**:711–718.
23. Tamboli RA, Hossain HA, Marks PA, Eckhauser AE, Rathmacher JA, Phillips SE, et al. Body composition and energy metabolism following Roux-en-Y gastric bypass surgery. *Obes* 2010;18:1718–1724.

24. Crenn P, Morin MC, Joly F, Penven S, Thuillier F, Messing B. Net digestive absorption and adaptive hyperphagia in adult short bowel patients. *Gut*. 2004; **53**:1279–1286.
25. Odstrcil EA, Martinez JG, Santa Ana CA, Xue B, Schneider RE, Steffer KJ, et al. The contribution of malabsorption to the reduction in net energy absorption after long-limb Roux-en-Y gastric bypass. *Am J Clin Nutr*. 2010; **92**:704–713.
26. Trijsburg L, Geelen A, Hollman PC, Hulshof PJ, Feskens E.J, Van't Veer, P, et al. BMI was found to be a consistent determinant related to misreporting of energy, protein and potassium intake using self-report and duplicate portion methods. *Public health nutrition* 2017; **20**(4), 598-607.
27. Schmidt JB, Pedersen SD, Gregersen NT, Vestergaard L, Nielsen MS, Ritz C et al. Effects of RYGB on energy expenditure, appetite and glycemic control: a randomized controlled clinical trial. *Inter J Obes*. 2016; **40**: 281–290
28. Faria SL, Faria OP, Cardeal MA, Gouvea HR, Buffington C. Diet-induced thermogenesis, and respiratory quotient after Roux-en-Y gastric bypass. *Surg Obes Relat Dis* 2012; **8**:797–802.
29. Muller MJ, Bosy-Westphal A. Adaptive Thermogenesis with Weight Loss in Humans. *Obes* 2013; **21**; 218-228. doi:10.1002/oby.20027.
30. Jacobi D, Ciangura C, Couet C, Oppert JM. Physical activity and weight loss following bariatric surgery. *Obes Rev*. 2011; **12**: 366–77.
31. Bonami AG, Soenen S, Goris AHC, Westerterp KA. Weight-loss induced changes in Physical activity and activity energy expenditure in overweight and obese subjects before and after energy restriction. *PloS One* 2013; **8**(3); e59641. Doi>10,1371/journal.pone.0059641.
32. Oliveira MRM, Novais PFS, Quesada KR, Souza CL, Rasera-Jr I, Leite CVS. Body weight and Energy Intake and Expenditure in Bariatric Surgery. In: *Advanced Bariatric and Metabolic Surgery*, Dr. Chih-Kun Huang (Ed.), 2012: chapter 9. ISBN: 978-953-307-926-4, InTech, Diponible in: <<http://cdn.intechweb.org/pdfs/29490.pdf>>

ARTIGO 2

Acurácia das equações de predição do gasto energético total depois de massiva perda de peso induzida pela cirurgia bariátrica.

Artigo 2

Acurácia das equações de predição do gasto energético total depois de uma massiva perda de peso induzida pela cirurgia bariátrica.

Resumo

Objetivo: testar a acurácia e precisão dos valores de gasto energético total (GET) obtido por equações preditivas do gasto energético em repouso (GER) considerando o nível de atividade física (NAF), tomando como referência o GET mensurado por água duplamente marcada (ADM), durante a perda ponderal induzida por cirurgia bariátrica. **Sujeitos e Métodos:** Participaram 20 mulheres obesas grau III (idade $29,4 \pm 5,1$ anos e IMC $44,9 \pm 2,5$ kg/m²), submetidas ao *bypass* gástrico em Y-de-Roux. As variáveis do estudo foram coletadas nos momentos pré e 6 e 12 meses pós-cirurgia. O GET foi mensurado depois da administração de dose fixa de ADM com deutério e oxigênio-18. Amostras de urina foram coletadas pré e dia a dia por 14 dias. Foram selecionadas as equações preditivas do GER: *Dietary Reference Intake of Institute of Medicine* (DRI-IOM - 2005), *Food and Agriculture Organization / World Health Organization / United Nations University* (FAO/WHO/UNU - 1985), Henry (Oxford-2005), Harris e Benedict (1918), Mifflin e St-Jeor et al (1990), De Lorenzo et al (2001), Lazzer et al (2007) e Müller et al (2004). O NAF foi obtido por meio de acelerômetro triaxial. **Resultados:** As pacientes perderam 65% de excesso de peso. A massa gorda corporal diminuiu de 52% para 35% ao longo de 1 ano de cirurgia. O GET (2930 ± 525 kcal.dia⁻¹) apresentou diminuição de 20% ($p < 0,05$) aos seis meses pós-cirúrgico (2319 ± 430 kcal.dia⁻¹), recuperando 10% aos 12 meses pós-cirurgia (2538 ± 336 kcal.dia⁻¹). As equações de Harris e Benedict (acurácia: 65%; viés: 0%, CCC: 0,665; RMSE: 271 kcal.dia⁻¹) e DRI-IOM (acurácia: 60%, viés: 5%, CCC: 0,539; RMSE: 317 kcal.dia⁻¹) apresentaram melhores resultados na predição dos valores de GET no momento pré-cirurgia. No sexto mês após a cirurgia, a maioria das equações apresentou redução na acurácia da predição do GET. Apenas a equação de Harris e Benedict manteve a acurácia de predição do GET acima de 50%. Aos 12 meses pós-cirurgia, as equações que apresentavam baixa acurácia nos períodos anteriores, tiveram um aumento na predição, porém se mantiveram abaixo de 45% de acurácia. Apenas a equação proposta por Lazzer e col. considerando composição corporal apresentou melhor predição (acurácia: 50%, viés: 9%, CCC: 0,056; RMSE: 338 kcal.dia⁻¹) neste período. **Conclusão:** as equações de Harris e Benedict e DRI-IOM descrevem com melhor acurácia o GET de mulheres obesas grau III. Após a cirurgia, a melhor equação a ser utilizada dependerá se o paciente passou ou não por tratamento para perda de peso e em qual período pós-tratamento ele se insere.

Palavras-Chaves: Gasto de Energia Total; Água Duplamente Marcada, Equações Preditivas; Obesidade, Cirurgia Bariátrica.

1. Introdução

O excesso de peso vem ganhando proporções alarmantes. Em 2014, 600 milhões de adultos acima de 18 anos foram classificados com algum grau de obesidade.¹ Estima-se que a obesidade grau III estava presente em 24 milhões de adultos americanos,² e apresentou um aumento de 255% em 28 anos (1975 – 2003) no Brasil.³ O tratamento clínico da obesidade baseia-se no balanço energético negativo, o que requer informações sobre o gasto de energia total (GET),⁴ frequentemente obtido por meio de equações preditivas formuladas a partir de dados de populações específicas.

Com o avanço da obesidade mórbida, aumentou-se o número de cirurgias bariátricas, sendo que os EUA / Canadá (154.276 / ano) e o Brasil (86.840 / ano) lideram a realização destes procedimentos em 2013.⁵ O *bypass* gástrico em Y-de-Roux é o tratamento mais efetivo para a obesidade mórbida, pois induz à uma média de 68% de perda do excesso de peso, sendo que as variações desta média ficam entre -77% até -33%.⁶ Esta perda ponderal é induzida pela regulação hormonal envolvida na homeostase energética e pelo balanço energético negativo ocasionado pela má absorção intestinal e pela diminuição no consumo alimentar, a qual é induzida por mudanças na regulação hormonal da saciedade e pela diminuição da capacidade gástrica.⁷

Fatores como idade, gênero, etnia, composição corporal, estado hormonal,⁸ e grau de obesidade,⁹ influenciam os valores de GET obtidos por meio de equações preditivas, entretanto, estas continuam sendo a ferramenta clínica de escolha para estimativa do gasto energético, mesmo com o advento de técnicas mais acuradas como é o caso da água duplamente marcada (ADM). No entanto, embora existam

equações genéricas, é necessário considerar as características da população para o uso apropriado dessas equações, as quais incluem variáveis fisiológicas específicas que influenciam o gasto energético. Isso é de particular interesse em situações associadas às alterações metabólicas causadas por grande variação no peso corporal. Tais situações são de grande interesse porque existe uma maior preocupação com as recomendações clínicas para os requerimentos de energia do paciente e porque a compreensão geral de como melhorar as equações de previsão pode ser aumentada.

A restrição no consumo energético ocasionado pela cirurgia bariátrica pode, ^{10,11} ou não, ^{12,13} alterar na termogênese induzida pela dieta e conseqüentemente o gasto energético total (GET). Adicionalmente, os poucos estudos, ^{12,14} mostram que a elevada perda ponderal, induzida tanto pela diminuição da massa gorda (MG) quanto da massa livre de gordura (MLG), está diretamente relacionada à redução de 25% GET, sendo que a diminuição do gasto energético em repouso (GER) está fortemente associada à redução da MLG.¹⁵

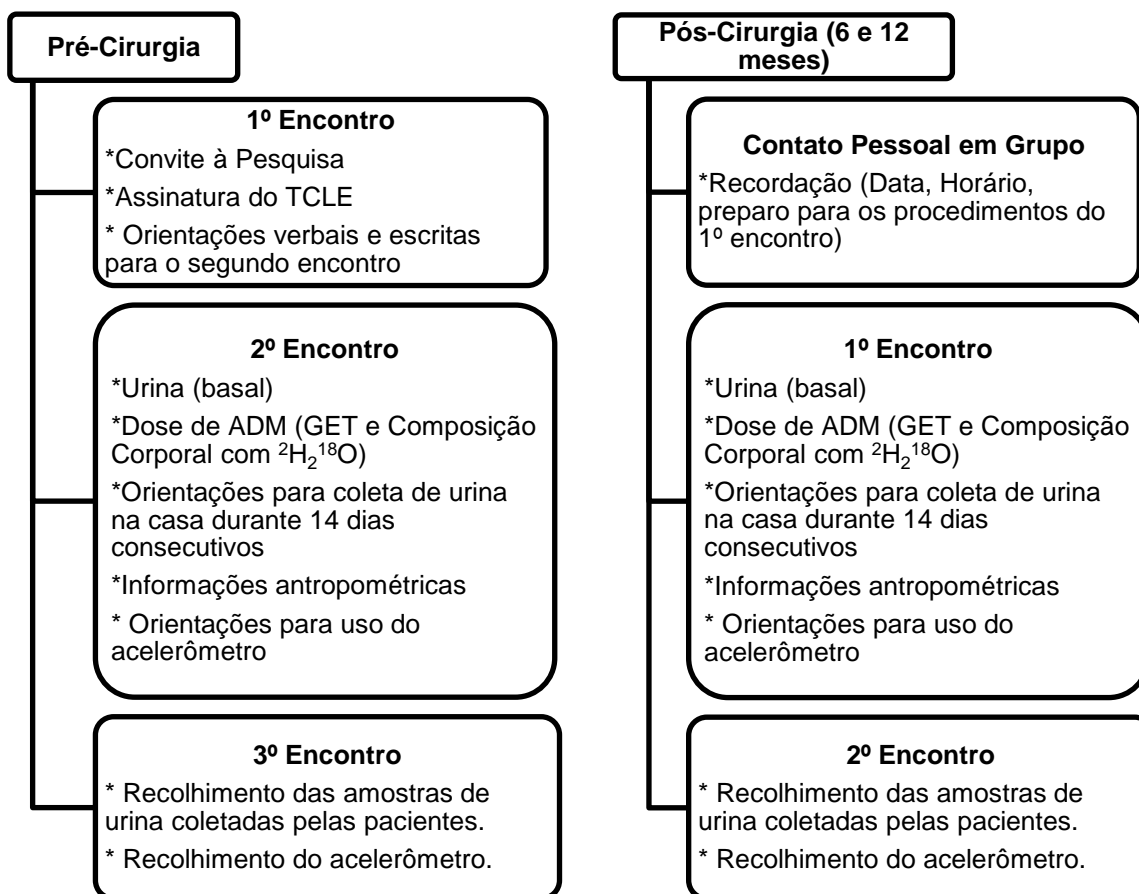
Pesquisadores vêm testando a acurácia das equações preditivas,^{9,16} ou mesmo desenvolvendo cálculos específicos para a população com excesso de peso,^{4,17-20} no entanto, uma pobre acurácia vem sendo encontrada quando aplicadas em pacientes com obesidade grave.⁹ Até o momento, não há na literatura disponível a indicação de uma equação com elevada acurácia para indivíduos obesos, ou mesmo a elaboração de uma específica para indivíduos submetidos a cirurgia para tratamento da obesidade, indicando a necessidade de validação ou mesmo de elaboração de equações preditivas do GET para a crescente população de obesos mórbidos e pacientes bariátricos.

Finalmente, uma vez que a restrição no consumo energético, as alterações hormonais e a mudança na composição corporal ocasionada pela cirurgia bariátrica podem alterar o dispêndio de energia devido as adaptações metabólicas ocasionadas pela subalimentação e essas mudanças podem afetar ainda mais a acurácia das atuais equações de predição do gasto energético, objetivo desta pesquisa foi testar a acurácia e precisão dos valores de GET obtido por meio de equações preditivas do gasto em repouso considerando o nível de atividade física (NAF), tomando como referência o GET mensurado por água duplamente marcada, antes e durante a perda ponderal induzida por *bypass* gástrico em Y-de-Roux.

2. Sujeitos e métodos

a. Desenho do estudo

Conduzimos um estudo clínico autocontrolado (Figura 1), com acompanhamento clínico. As avaliações do gasto energético foram realizadas nos momentos pré, seis e doze meses após a realização da cirurgia bariátrica. Para cada momento de coleta de dados, as participantes realizaram duas visitas à clínica. Na primeira visita foram obtidos os dados antropométricos, coletadas as amostras de urina basal e foi administrada a dose de ADM. As pacientes também foram orientadas quanto a coleta diária de amostras de urina e quanto ao uso adequado do acelerômetro. Na segunda visita (15 dias após a primeira visita), as amostras de urina e os acelerômetros foram coletados.



TCLE= Termo de Consentimento Livre e Esclarecido; ADM= Água Duplamente Marcada ($^2\text{H}_2^{18}\text{O}$)

Figura 1. Desenho experimental dos procedimentos metodológicos desenvolvidos nas fases pré e pós-cirurgia.

b. Sujeitos

Para a estimativa da amostra ($n=14$) foi considerado o erro do tipo 1 de 5% (α 0,05), grau de confiança de 95% e nível de precisão (poder do teste) de 90%, para teste t pareado, tomando como referência os resultados de calorimetria indireta, porém, foram convidadas 22 mulheres, considerando uma margem de segurança, que aguardavam na fila de espera para a cirurgia bariátrica em uma clínica de atendimento à pacientes do sistema de saúde público no Brasil. Os critérios de inclusão foram: idade entre 20 e 45 anos, em período fértil, com Índice de Massa

Corporal (IMC) de 40 kg/m² a 50 kg/m²; que não apresentassem edema e doenças relacionadas às alterações no metabolismo energético e que não fizessem uso de medicamentos que levasse alterações metabólicas e absorptivas. As pacientes concordaram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa local (nº do protocolo: 306.538). Dados de 2 pacientes foram excluídos aos 6 e 12 meses de cirurgia por não completarem todas as etapas do estudo ou devido resultados de análises isotópicas inadequadas para avaliação do GET

c. Antropometria e composição corporal

Sob condições padronizadas e realizadas pelo mesmo avaliador, as medidas de peso corporal e altura foram realizadas em equipamentos calibrados (Bioimpedância InBody 230[®] e antropômetro vertical da marca SECA[®], respectivamente) no período da manhã, com as pacientes utilizando vestimentas leves e sem sapatos, após jejum de 8 horas. O IMC foi calculado pelo peso corporal dividido pela altura ao quadrado. O peso ideal foi calculado a partir da média do peso ideal da tabela da *Metropolitan Life Insurance Company*.²¹

Usando a técnica de diluição de isótopos estáveis (²H₂¹⁸O), determinamos a quantidade de Massa Gorda (MG) e Massa Livre de Gordura (MLG) de acordo com protocolo proposto por Schoeller.²² A técnica permitiu determinar a quantidade de água corporal total a partir da qual calculamos a MLG usando a constante de hidratação de mamíferos (73,2%). Subtraindo este valor do peso total, obtivemos a quantidade de MG.

d. Gasto de Energia Total (GET)

Uma dose de 2g de ^{18}O à 10,8 átomos% por quilo de água corpórea e 0,12g de óxido de deutério a 99,8 átomos% por quilo de água corpórea foi ofertada à cada participante com o objetivo de determinar o gasto energético total (GET). O *turnover* isotópico dos compostos enriquecidos na água corporal foi calculado a partir de amostras de urina, coletadas pré e após 14 dias da ingestão da dose. As amostras foram analisadas em triplicata em espectrômetro de massa de razão isotópica (modelos Hydra 20-20 e Hydra 20-22, Europe Scientific – Cheshire/UK). O protocolo de múltiplos pontos proposto por Schoeller,²² foi utilizado na determinação do GET.

e. Nível de Atividade Física (NAF)

As participantes fizeram o uso do acelerômetro triaxial (ActiGraph modelo GT3X+; ActiGraph, Pensacola, FL, USA) acoplado na região da cintura e calibrado para cada indivíduo, de acordo com as especificações do fabricante. Durante 14 dias, nos 3 momentos de coleta de dados, as pacientes tiveram suas atividades físicas monitoradas. O NAF foi obtido a partir da equação proposta por Crouter et al.²³

f. Equações Preditivas

As equações preditivas de GET e GER foram selecionadas após triagem em artigos recentes,²⁴⁻²⁶ e revisões científica,^{9,16} considerando a usabilidade na prática clínica e indicações para indivíduos com sobrepeso e obesos. Foram consideradas equações que utilizaram informações de peso atual, altura, idade e / ou de composição corporal (MLG ou MG), estratificadas por gênero. As equações selecionadas foram (Tabela 1):

- ✓ **Peso normal:** equações propostas pela *Food and Agriculture Organization / World Health Organization / United Nations University* (FAO/WHO/UNU),²⁷ equações de Oxford proposta por Henry,²⁸ equações indicadas por Harris e Benedict.²⁹
- ✓ **Peso normal e sobrepeso:** equação de GER propostas pela Mifflin – St Jeor.¹⁷
- ✓ **Peso sobrepeso / obesos:** equação preditiva do GET propostas pelo documento da *Dietary Reference Intake (DRI) - Intitute of Medicine (IOM)*,⁴ equação de De Lorenzo e col,¹⁸ equações propostas por Müller e col.,¹⁹ e por Lazzer e col.²⁰

A partir do NAF obtido por acelerômetro, as pacientes foram classificadas pelo Fator Atividade proposto pela DRI-IOM,⁴ e esta classificação foi usada na equação para determinação do GET predito por esta equação.

Os valores de NAF e o Efeito Térmico do Alimento (ETA = 10%),¹¹ foram usados como múltiplos do GER nas equações preditas com objetivo de comparar estes valores com o GET mensurado pela técnica da água duplamente marcada.

Tabela 1. Equações preditivas do gasto energético.

Equações Preditivas	
Fórmulas descritas para mulheres	
DRI – IOM⁴	GET (kcal/dia) = 448 – {(7,95 x I) + FA x [(11,4 x P) + (619 x A)]}
WHO²⁷	P 18-30 anos: GER (kcal/dia) = (14,7 x P) + 496 30-60 anos: GER (kcal/dia) = (8,7 x P) + 829
	P e A 18-30 anos: GER (kcal/dia) = (13,3 x P) + (334 x A) + 35 30-60 anos: GER (kcal/dia) = (8,7 x P) - (25 x A) + 865
Oxford²⁸ (Henry)	P 18-30 anos: GER (kcal/dia) = (13,1 x P) + 558 30-60 anos: GER (kcal/dia) = (9,74 x P) + 694
	P e A 18-30 anos: GER (kcal/dia) = (10,4 x P) + (615 x A) – 282 30-60 anos: GER (kcal/dia) = (8,14 x P) + (502 x A) – 11,6
Harrys & Benedict²⁹	GER (kcal/dia) = 655,09 + (9,56 x P) + (1,84 x A) – (4,67 x I)
Mifflin–St Jeor¹⁷	GER (kcal/dia) = (9,99 x P) + [6,25 x (A)] – (4,92 x I) – 161
De Lorenzo¹⁸	GER (kJ/dia) = (46,322 x P) - (15,744 x A) - (16,66 x I) + 944
Lazzer²⁰	P e A GER (MJ/dia) = (0,042 x P) + (3,619 x A) – 2,678
	CC GER (MJ/dia) = (0,067 x MLG) + (0,046 x MG) + 1,568
Muller¹⁹	P e I GER (MJ/dia) = (0,05 x P) - (0,01586 x I) + (1,103 x S) + 2,924
	CC GER (MJ/dia) = (0,05685 x MLG) + (0,04022 x MG) + (0,808 x S) – (0,01402 x I) + 2,818

DRI - IOM = Dietary Reference Intake do Institute of Medicine; WHO = World Health Organization; GET = Gasto de Energia Total; GER = Gasto de Energia em Repouso; I = idade em anos; FA = Fator Atividade obtido pelo NAF a partir de RAF ou acelerômetro; P = peso aferido em quilogramas; A = altura em metros; CC = Composição corporal; MLG = massa livre de gordura em quilogramas; MG = Massa Gorda em quilogramas; S = Sexo (Feminino = 0).

g. Cirurgia Bariátrica

As mulheres foram submetidas ao *Bypass Gástrico em Y-de-Roux* (BGYR), após tratamento clínico comportamental prévio de 6 meses para perda de 10% do peso inicial. A cirurgia é descrita como uma laparotomia mediana supraumbelical, no qual um reservatório gástrico de pequena curvatura (8 x 2 cm) foi confeccionado.³⁰

Houve uma reconstrução do trânsito em *Y de Roux* com alça biliar a 40 cm do ângulo de Treitz e alça alimentar de 150 cm em posição pré-cólica.³⁰

h. Análise dos dados

As análises estatísticas foram conduzidas no software *IBM SPSS Statistics* (Versão 21.0, Armonk, NY: IBM Corp) e MedCal (versão 11.6.0.0) para Windows. As variáveis apresentaram distribuição normal pelo teste de Kolmogorov-Smirnov.

O teste ANOVA *one-way* seguida do teste de Bonferroni foi realizado na comparação entre os períodos para análise das mudanças de dados antropométricos, composição corporal e componentes do gasto energético. O Teste-T pareado foi realizado para comparação entre os valores de GET preditos por equações em relação ao valor mensurado.

Uma acurácia aceitável em nível de grupo apresentou viés (diferença percentual média dos valores de gasto de energia predito por equações em relação aos mensurados por água duplamente marcada) de até $\pm 5\%$. A superestimação (viés máximo positivo) e subestimação (viés máximo negativo) foram apresentadas para cada equação. A avaliação do adequado uso da equação preditiva em nosso conjunto de dados foi realizada pelo erro médio quadrático (*root mean square errors* - RMSE), sendo que, quanto menor o valor em kcal /dia, mais próximo do valor mensurado.

Uma predição acurada à nível individual foi considerada quando o valor da equação preditiva se encontrava entre 90% e 110% do valor mensurado. Valores menores que 90% e maiores que 110% foram considerados subestimados ou superestimados, respectivamente. O coeficiente de correlação de concordância (CCC) foi calculado multiplicando a precisão (Coeficiente de Correlação de Pearson)

pela acurácia (desvio da linha de identidade – valor mensurado), mostrando a precisão e o viés das equações preditivas, classificando como concordância pobre ($\leq 0,20$), fraca (0,21- 0,40), moderada (0,41 – 0,60), boa (0,61 – 0,80) e excelente (0,81 – 1,00).³¹

3. Resultados

No momento pré-cirurgia, as pacientes apresentavam 95% do peso acima do ideal (Tabela 2). As mulheres iniciaram o tratamento cirúrgico para a perda ponderal com IMC de $44,9 \pm 2,5 \text{ kg/m}^2$, apresentando importante redução ao longo de 1 ano após a cirurgia bariátrica ($30,0 \pm 3,7 \text{ kg/m}^2$) (Tabela 2). A mudança no peso corporal foi de $\cong -27\%$ e $\cong -33\%$ nos períodos 6 e 12 meses pós-operatório, respectivamente. A gordura corporal reduziu de 52,0% para 35% no período avaliado. Essa perda ponderal foi de 65% de excesso de peso o que levou a um aumento significativo na proporção de MLG em relação à MG ($\Delta 0,93$ no pré-cirurgia para $\Delta 1,98$ no período de 12 meses após o procedimento) (Tabela 2).

A média do GET foi de $2930 \pm 525 \text{ kcal.dia}^{-1}$, seguido de uma redução de 20% em relação ao inicial ($2319 \pm 430 \text{ kcal.dia}^{-1}$) nos 6 meses após a cirurgia e leve aumento em relação a este ($2538 \pm 336 \text{ kcal.dia}^{-1}$) nos 12 meses pós-cirúrgico com apenas -10% de redução do GET mensurado em relação ao momento pré ($p < 0,05$). O NAF obtido por meio de acelerômetro não apresentou diferença entre os períodos (Tabela 2).

Tabela 2. Antropometria, composição corporal e gasto energético de mulheres obesas grau III, antes e depois de 1 ano de cirurgia bariátrica.

Informações	Mulheres Obesas Grau III (média ± DP)			p
	Antes (n=20)	6 Meses (n=20)	12 Meses (n=18)	
PC (kg)	112,4 ± 7,4 ^a	81,8 ± 7,5 ^b	75,1 ± 8,8 ^c	<0,001
Delta PC (%)**	-	-27,3 ± 4,0	-33,3 ± 5,9	<0,001*
IMC (kg/m²)	44,9 ± 2,5 ^a	32,7 ± 3,0 ^b	30,0 ± 3,7 ^c	<0,001
Excesso de peso (%)	95,4 ± 11,8 ^a	42,3 ± 13,7 ^b	30,6 ± 16,4 ^c	<0,001
MG (kg)	58,5 ± 5,7 ^a	33,2 ± 7,2 ^b	26,1 ± 6,4 ^c	<0,001
MG (%)	52,0 ± 3,2 ^a	40,3 ± 6,0 ^b	34,8 ± 6,3 ^c	<0,001
MLG (kg)	53,9 ± 4,7 ^a	48,6 ± 4,7 ^b	48,1 ± 4,6 ^b	<0,001
Razão MLG(kg) / MG(kg)	0,93 ± 0,12 ^a	1,54 ± 0,4 ^b	1,98 ± 0,6 ^c	<0,001
GETm (kcal)	2930 ± 525 ^a	2319 ± 430 ^b	2538 ± 336 ^b	<0,001
Delta GETm (%)***	-	-21 ± 8	-10 ± 21	0,029*
NAF	1,65 ± 0,18	1,67 ± 0,16	1,73 ± 0,19	0,337

PC= Peso corporal; IMC = índice de massa corporal; MG = massa gorda; MLG = massa livre de gordura; GETm = Gasto de energia total mensurado; p = ANOVA seguida do teste de Bonferroni; * T-test pareado; valor delta entre: peso corporal** e GETm*** entre 6 meses e pré-cirurgia e entre 12 meses e pré-cirurgia.

As equações de Harris e Benedict e da DRI-IOM foram as que apresentaram menor viés (<5%) e melhor acurácia (65%, RMSE: 271kcal/dia; 60%, RMSE: 317kcal/dia, respectivamente) na predição dos valores de GET no momento pré-cirurgia, no entanto, diminuíram ao longo do tempo (Tabela 3).

No sexto mês após a cirurgia, todas as equações apresentaram redução na acurácia da predição do GET, exceto as equações propostas por De Lorenzo e Muller (peso e idade) que mantiveram a porcentagem de acurácia observada no momento pré-cirurgia (45% e 35% respectivamente). Apenas o resultado da equação proposta por Harris e Benedict manteve a acurácia acima de 50% na predição do GET no momento de 6 meses (Tabela 3).

As equações que apresentaram boa acurácia na predição no período pré (DRI-IOM e Harris e Benedict) e pós-operatório de 6 meses (Harris e Benedict) mostraram uma diminuição do percentual de acurácia (39%) no momento 12 meses após a cirurgia (Tabela 3). As demais equações que apresentavam baixa acurácia nos períodos pré e 6 meses após a cirurgia, exibiram um aumento na predição, porém se mantiveram abaixo de 45% na acurácia de predição (Tabela 3). Apenas a equação proposta por Lazzer considerando composição corporal apresentou melhor predição de acurácia (50%) neste período de avaliação pós-operatória (Tabela 3). A equação proposta por de Mifflin não apresentou diferença em relação ao valor mensurado, porém seu viés foi de 9%, sendo que apenas 45% dos indivíduos encontravam-se com valor de predição dentro dos limites aceitáveis (Tabela 3).

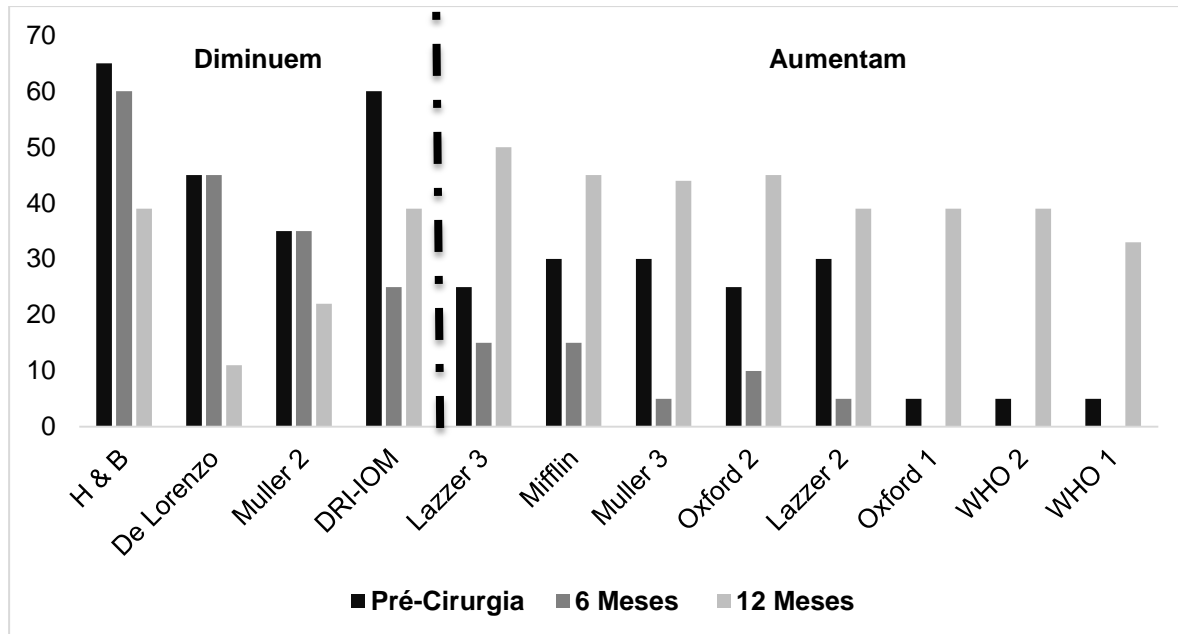
A figura 1 mostra a evolução no percentual de acurácia das equações. Uma linha tracejada divisória evidencia que as equações de De Lorenzo e de Muller considerando peso e idade, indicadas para indivíduos com sobrepeso/obesidade, diminuem sua acurácia de predição ao longo do tempo pós-cirúrgico. A DRI-IOM após reduzir a acurácia aos seis meses de cirurgia, apresentou um aumento no período 12 meses pós-operatório (Figura 1). O mesmo foi observado para a equação proposta por Harris e Benedict, no entanto, esta equação é indicada para indivíduos com peso normal (Figura 1). As demais equações propostas para indivíduos com sobrepeso e obesos (Muller [composição corporal], Lazzer [composição corporal e peso/altura], e Mufflin) melhoram sua acurácia na predição ao longo da perda de peso favorecida pela cirurgia bariátrica (Figura 1). O mesmo efeito é observado para as equações propostas para indivíduos com peso normal (Oxford e WHO, considerando peso com e sem altura na equação) (Figura 1).

Tabela 3. Gasto energético total e equações preditivas pré, seis e doze meses depois da cirurgia bariátrica.

Equações preditivas / Períodos	Valores mensurados Vs Preditos		Teste t	Viés	Erro máximo positivo	Erro mínimo negativo	RMSE	CCC	Acurácia na Predição >90% < 110%	Abaixo ≤ 90%	Acima ≥ 110%
	Kcal/dia (média ± DP)	p	%	%	%	Kcal/dia	p	%	%	%	
GETm	0	2930 ± 525	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	2319 ± 430	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	12	2538 ± 336	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DRI-IOM	0	3020 ± 279	0,323	5	35	-24	317	0,539	60	10	30
	6	2586 ± 191	0,008	14	43	-32	393	0,194	25	5	70
	12	2865 ± 170	0,002	15	48	-17	411	0,001	39	6	55
WHO ¹	0	3900 ± 488	<0,001	25	74	2	969	0,241	5	0	95
	6	3117 ± 373	<0,001	37	79	-22	882	0,087	0	5	95
	12	3031 ± 360	0,001	21	87	-9	549	-0,007	33	0	67
WHO ²	0	3737 ± 468	<0,001	29	67	-1	813	0,295	5	0	95
	6	3031 ± 360	<0,001	33	73	-24	802	0,103	0	5	95
	12	2965 ± 351	0,002	19	83	-11	499	-0,009	39	6	55
Oxford ¹	0	3686 ± 456	<0,001	28	64	-3	769	0,310	5	0	95
	6	2991 ± 350	<0,001	31	71	-25	767	0,106	0	5	95
	12	2923 ± 342	0,004	17	80	-12	464	-0,009	39	6	55
Oxford ²	0	3377 ± 419	<0,001	17	52	-11	490	0,468	25	5	70
	6	2830 ± 327	<0,001	24	59	-28	617	0,148	10	5	85
	12	2800 ± 327	0,031	12	73	-16	375	-0,017	45	11	44
H & B	0	2896 ± 359	0,680	0	29	-24	271	0,665	65	20	15
	6	2390 ± 268	0,478	5	35	-40	277	0,257	60	5	35
	12	2348 ± 271	0,075	-6	44	-30	354	0,024	39	11	50
Mifflin	0	3279 ± 412	<0,001	13	48	-13	409	0,542	30	5	65
	6	2753 ± 313	<0,001	21	54	-30	547	0,174	15	5	80
	12	2726 ± 319	0,100	9	68	-18	335	0,017	45	11	44
De Lorenzo	0	2636 ± 337	0,002	-9	17	-31	354	0,526	45	50	5
	6	2043 ± 256	0,011	-10	19	-50	331	0,173	45	50	5
	12	1966 ± 243	<0,001	-21	22	-41	625	-0,002	11	83	6
Lazzer ²	0	3369 ± 421	<0,001	17	52	-11	484	0,475	30	5	65
	6	2843 ± 331	<0,001	25	59	-27	627	0,149	5	5	95
	12	2821 ± 332	0,022	13	74	-15	392	-0,017	39	11	50
Lazzer ³	0	3413 ± 438	<0,001	18	54	-11	527	0,460	25	5	70
	6	2786 ± 344	<0,001	22	55	-30	579	0,168	15	5	80
	12	2729 ± 316	0,087	9	64	-18	338	0,056	50	11	39
Muller ²	0	2399 ± 336	<0,001	-17	-9	-36	561	0,228	35	65	0
	6	2119 ± 290	0,068	-7	22	-46	354	0,174	35	45	20
	12	2127 ± 281	0,002	-15	28	-39	519	-0,083	22	67	11
Muller ³	0	3393 ± 426	<0,001	17	53	-11	508	0,469	30	5	65
	6	2852 ± 331	<0,001	25	57	-28	638	0,150	5	5	90
	12	2819 ± 316	0,016	13	69	-15	376	0,541	44	6	50

GETm = gasto de energia total mensurado; 0 = antes da cirurgia; 6 = 6 meses depois da cirurgia; 12 = 12 meses depois da cirurgia; DRI-IOM= Dietary Reference Intake – Institute of Medicine; WHO = World Health Organization; H & B = Harrys e Benedict; DP = desvio-padrão; Viés = porcentagem média de erro entre a equação preditiva e o valor mensurado; Erro máximo negativo = o maior valor de sub predição observado com a equação preditiva, descrito em porcentagem do valor mensurado; Erro máximo positivo = o maior valor de super predição observado com a equação preditiva, descrito em porcentagem do valor mensurado; Acurácia de predição = Porcentagem de mulheres com valores preditos de gasto energético >90% < 110% do valor mensurado; RMSE = Root Mean Square Error - erro médio quadrático; CCC = coeficiente de correlação de concordância; Abaixo = Porcentagem de mulheres com valores preditos do gasto energético abaixo de 90% do valor mensurado; Acima = Porcentagem de mulheres com valores preditos do gasto energético acima de 110% do valor mensurado. 1 = equação que

considera apenas peso; 2 = equação que considera peso e altura ou idade; 3 = equação que considera a composição corporal em massa livre de gordura e massa gorda.



H & B = Harris e Benedict; DRI-IOM= *Dietary Reference Intake – Institute of Medicine*; WHO = *World Health Organization*; 1 = equação que considera apenas peso; 2 = equação que considera peso e altura ou idade; 3 = equação que considera a composição corporal em massa livre de gordura e massa gorda.

Figura 1. Porcentagem de acurácia de equações preditivas de gasto de energia total em mulheres brasileiras antes, 6 e 12 meses após a cirurgia bariátrica. Equações que diminuem e aumentam suas previsões ao longo do tempo de avaliação. A acurácia de predição foi considerada apropriada quando o valor preditivo estava entre >90% e <110% do valor medido.

4. Discussão

Este estudo é o primeiro a realizar a avaliação indireta e de elevada precisão do GET mensurado com a técnica da água duplamente marcada em pacientes obesas submetidas à cirurgia bariátrica e comparar com os valores de equações preditivas do gasto energético considerando o NAF mensurado pelo método direto do acelerômetro. Buscamos verificar o grau de acurácia das atuais equações preditivas do gasto energético em pacientes que apresentaram substancial perda ponderal ao longo dos primeiros 12 meses após o procedimento cirúrgico.

Nossos resultados mostraram que das 12 equações avaliadas, apenas duas (DRI-IOM e Harris e Benedict) apresentaram acurácia na predição acima de 60% para o momento pré-cirurgia, o que corrobora com outros estudos,^{9,16,25,26} que afirmam a deficiência de equações de predição do GER e GET que apresentem boa acurácia quando aplicadas em indivíduos com obesidade grau III. Com uma acurácia razoável, nossos dados confirmam os relatos de pesquisadores quanto a eficiência do uso da equação de Harris e Benedict, que mesmo sendo desenvolvida para indivíduos com peso normal,²⁹ se mostra adequada na determinação do gasto energético de indivíduos, independente das classes de IMC,^{8,24,26,32} e inclusive para pacientes submetidos à cirurgia bariátrica.³³

Além da equação de Harris e Benedict²⁹, a segunda equação preditiva com melhores resultados, foi a equação preditiva de indicada pela DRI-IOM.⁴ Ao considerarmos o NAF obtido por acelerômetro, esta equação se mostrou adequada em 60% para esta população, muito próxima à acurácia (65%) encontrada por Tozze e col.,³⁴ os quais também destacaram a existência de superestimação nas equações preditivas propostas por este documento para mulheres obesas, a qual foi evidenciada em 30% para a nossa população de estudo. Isso reforça nossa tese inicial de que, na ausência de uma equação especificamente desenvolvida para dada população, as equações genéricas e classicamente reconhecidas cumprem seu papel, estimando o gasto energético dessa população com moderado grau de acurácia, no nosso caso, uma subpopulação obesa mórbida selecionada no sudeste do Brasil.

A maioria das equações preditivas do gasto energético apresentava uma porcentagem de superestimação considerável no momento pré-cirurgia, então, consideramos que a perda ponderal ocasionada pela cirurgia poderia melhorar o

desempenho das equações preditivas do GET, devido à diminuição no erro da predição causado pelo excesso de peso. Mesmo após importante perda de peso (-53,1% do excesso de peso) verificada no 6º mês pós-operatório, as equações avaliadas mostraram piora nos valores de acurácia. Os valores das equações da DRI-IOM e Harris e Benedict não mantiveram a consistência em seus percentuais de acurácia, sendo que apenas a equação de Harris e Benedict, manteve a acurácia acima de 50% do valor de predição aceitável. Nossos resultados para a equação de Harris e Benedict se assemelham com os de outros autores que verificaram diminuição da acurácia de predição do GER calculado por esta equação (66% para 56%), mesmo após uma perda ponderal de apenas 10% ocasionado pelo tratamento clínico.³⁵ Além disso, os autores verificaram que a equação (Mifflin) que proporcionou a melhor acurácia (74%) previamente ao tratamento clínico, superestimou o GER predito em 76% dos avaliados após a perda de peso.³⁵

Ao contrário do que esperávamos a significativa redução do peso corporal não favoreceu o ajuste das equações de predição do gasto energético, e as equações passaram a superestimar o valor de GET, confirmando nossa tese de que essas equações não levam em consideração a adaptação metabólica do paciente bariátrico, o que foi confirmada por outros autores em estudo de validação de equações preditivas após 3, 6, 12 e 36 meses da realização do procedimento cirúrgico.³⁶

Ao analisarmos o valor absoluto do gasto energético total mensurado após os 6 meses de cirurgia, verificamos uma drástica diminuição (-611 kcal = -20%) deste em relação ao valor inicial, frequentemente observada em estudos de avaliação do GE em pacientes submetidos à cirurgia bariátrica.^{12,14,36} A significativa perda de peso corporal, ocasionada pela cirurgia, poderia pressupor uma adaptação

metabólica neste período, o que seria uma explicação plausível da grande variabilidade nos resultados das equações preditivas, observada principalmente no 6º mês pós-operatório.

Não podemos descartar a possibilidade de termogênese adaptativa ocasionada além daquela induzida pela redução da MG e MLG, como por exemplo, dieta, exercício físico, alteração hormonal e interação cirúrgica,¹⁵ o que pode ter afetado diretamente a validade das equações preditivas. Considerando a pobre acurácia nos valores preditos das equações aplicadas no momento 6 meses após a cirurgia, afirmamos que não há semelhança na predição de GET de mulheres bariátricas em relação às mulheres não submetidas ao tratamento para perda de peso, das quais foram derivadas às equações.

Na avaliação das acurácias de predição do GET calculadas para os 12 meses após a cirurgia verificamos uma possível tendência de ajuste dos valores de metabolismo energético predito para essas pacientes. Aquelas equações que apresentaram inacurácia para a maioria das pacientes obesas grau III, melhoraram com a perda de peso uma vez que a taxa de perda é lenta ou estabiliza neste período. Os resultados evidenciaram que 8 equações que apresentaram baixos valores de acurácias das predições no momento pré-cirurgia, aumentaram o percentual de predição para valores dentro do esperado (>90% <110%), no entanto ainda abaixo de 50% da acurácia de predição, exceto para Lazzer considerando composição corporal. Essa melhora no percentual da acurácia para as equações descritas para indivíduos com peso normal (WHO, Oxford) era esperada considerando a perda de peso, no entanto, também verificamos essa evolução na acurácia das equações descritas para indivíduos com sobrepeso e obesidade (Mifflin, Lazzer, Muller), mostrando que, além da avaliação do peso corporal, deve-

se considerar as situações clínicas e de tratamento pelo qual o paciente foi submetido, para selecionar a melhor as equações preditivas a ser utilizada na prática clínica. Os valores das equações preditivas de Harris e Benedict e DRI-IOM foram grosseiramente equivalentes aos valores de GET medidos aos 12 meses após a cirurgia. Considerando que a equação da DRI-IOM foi elaborada com base em dados de ADM de 195 mulheres com $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$,⁴ é surpreendente que os valores preditos do GET tenham sido precisos na maioria das pacientes com obesidade grau III e piorou aos 12 meses após a cirurgia, período em que as pacientes apresentavam IMC similar ao da população de estudo da DRI-IOM.

A sutil melhora na acurácia das equações preditivas no período de 12 meses após a cirurgia pode estar relacionada ao leve aumento do valor médio (+219 kcal) de GET mensurado quando comparado ao valor no 6º mês pós-operatório. Este pode ser justificado pela melhora na composição corporal do paciente após um ano do procedimento.³⁷ Nossos resultados mostraram uma evolução positiva na composição corporal por meio da estabilização na perda de MLG e manutenção da perda de MG aos 12 meses pós-operatório, o que levou à um consequente aumento proporcional da massa livre de gordura em relação à massa gorda (MLG/MG = 0,93 para 1,98) duplicando o valor quando comparando o momento pré ao momento 12 meses pós-cirurgia.

Não existe um consenso quanto a melhor equação preditiva para determinar o GER e GET em indivíduos com obesidade severa,⁹ e poucos avaliaram o uso dessas equações em pacientes submetidos à cirurgia bariátrica.^{33,36} A maioria dos estudos sugerem Mifflin para indivíduos obesos.^{8,9,16,25,35} No entanto, Harris e Benedict também tem apresentado resultados razoáveis para esta população.^{8,24,26,32} Algumas discordâncias entre os resultados podem ser explicadas pelos fatores que

influenciam diretamente o GE como etnia, composição corporal, variações de clima e temperatura, condições hormonais, entre outras.⁸ Sendo que as equações preditivas do GE estão mais propensas à erros nos resultados finais quando aplicados em indivíduos obesos.⁹

Exceto as equações de De Lorenzo e Muller (peso e idade), as demais equações superestimam o GE das pacientes ao longo dos 3 períodos, o que pode justificar a ineficiência do tratamento para pacientes obesos que consideram as recomendações de redução calórica de 500 a 750 kcal do GET predito em pacientes obesos,³⁸ ou mesmo estar relacionada a recuperação do peso em pacientes após tratamento cirúrgico para a obesidade.¹

É relevante ressaltarmos que as alterações da composição corporal em nossas pacientes não corrigiram a inadequação das equações preditivas, corroborando com a literatura científica que relata que as restrições no consumo alimentar e as modificações da composição corporal alteram o dispêndio energético e pode conseqüentemente, afetar o ajuste das equações de predição do gasto energético.^{35,36} No entanto, devido a evolução gradativa da acurácia de predição das equações observada a partir do 12º mês pós-operatório, mais avaliações quanto as validações das equações são necessárias em grupos de pacientes bariátricos tardios. Mas insistimos na tese de que as equações com um alto grau de precisão são as especificamente desenvolvidas para um determinado grupo populacional.

5. Conclusão

Em vista da ampla variação na acurácia das equações preditivas do GET para os 3 momentos avaliados, concluímos que as equações propostas por Harris e Benedict e DRI-IOM, descrevem o GET de mulheres obesas grau III com melhor

acurácia. Além disso, a escolha da melhor equação a ser utilizada na predição do GET vai depender se o paciente passou ou não por tratamento para perda de peso e em qual período pós-tratamento ele se insere. Porém, ainda é necessário considerar a baixa acurácia das equações quando se tratando de pacientes submetidas à cirurgia bariátrica.

Enquanto não há relatos de equações específicas para indivíduos com obesidade grau III e pacientes submetidos à cirurgia bariátrica, devemos considerar o uso das equações atuais que apresentaram valores razoavelmente válidos para a predição do GET deste grupo de indivíduos. Esforços devem ser realizados no sentido de desenvolver equações específicas para essa população, em especial no estágio de estabilização do peso, após 2 anos da cirurgia, visto ter sido o período de maior inconsistência dos resultados em nosso estudo.

Referências

1. World Health Organization (WHO). Obesity and overweight: 2014. **Fact sheet 311**; Updated June 2016. Disponível in < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>> Accessed in May 2017.
2. American Society for Metabolic & Bariatric Surgery. Fact sheet: Obesity in America. Updated November 2013. Disponível in < <https://asmbs.org/resources/obesity-in-america> > Accessed in July 2017.
3. Santos, LMP, De Oliveira, I V, Peters LR, Conde WL. Trends in morbid obesity and in bariatric surgeries covered by the Brazilian public health system. *Obes Surg*, 2010; **20(7)**, 943-948.
4. Dietary Reference Intake from Institute of Medicine (DRI-IOM). Panel on Macronutrients, Subcommittees on Upper Reference Levels of Nutrients and Interpretation and Uses of Dietary Reference Intakes, and the Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes, Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids. Washington, DC: *National Academies Press*, 2005.
5. Angrisani L, Santonicola A, Iovino P, Formisano G, Buchwald H, Scopinaro N. Bariatric Surgery Worldwide 2013. *Obes Surg* 2015; **25**:1822–1832. DOI 10.1007/s11695-015-1657-z
6. Buchwald H, Avidor Y, Braunwald E, Jensen MD, Pories W, Fahrbach K et al. Bariatric Surgery: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA*. 2004; **292**:1724-1737.
7. Buchwald H. The Evolution of Metabolic/Bariatric Surgery. *Obes Surg* 2014; **24**:1126–1135. DOI 10.1007/s11695-014-1354-3.
8. Hasson RE, Howe CA, Jones BL, Freedson PS. Accuracy of four resting metabolic rate prediction equations: Effects of sex, body mass index, age, and race/ethnicity. *J Sci Med in Sport* 2011; **14**:344-351.
9. Madden AM, Mulrooney HM, Shah S. Estimation of energy expenditure using prediction equations in overweight and obese adults: a systematic review. *J Hum Nutr Diet* 2016; **29**: 458-476. Doi:10.1111/jhn.12355.
10. Faria SL, Faria OP, Cardeal MA, Gouvea HR, Buffington C. Diet-induced thermogenesis, and respiratory quotient after Roux-en-Y gastric bypass. *Surg Obes Relat Dis* 2012; **8**:797–802.
11. Werling M, Olbers T, Fandriks L, Bueter M, Lonroth H, Stenlof K et al. Increased postprandial energy expenditure may explain superior long term

weight loss after roux-en-y gastric bypass compared to vertical banded gastroplasty. *PLoS One* 2013; **8**: e60280.

12. Das SK, Roberts SB, McCrory MA, et al. Long-term changes in energy expenditure and body composition after massive weight loss induced by gastric bypass surgery. *Am J Clin Nutr*. 2003;**78**:22–30.
13. Schmidt JB, Pedersen SD, Gregersen NT, Vestergaard L, Nielsen MS, Ritz C et al. Effects of RYGB on energy expenditure, appetite and glycemic control: a randomized controlled clinical trial. *Inter J Obes*. 2016; **40**: 281–290.
14. Tamboli RA, Hossain HA, Marks PA, Eckhauser AW, Rathmacher JA, Phillips SE et al. Body composition and energy metabolism following Roux-en-Y gastric bypass surgery. *Obesity Silver Spring*. 2010; **18**: 1718–24.
15. Thivel D, Brakonieki K, Duche P, Béatrice M, Yves B, Laferrère B. Surgical Weight Loss: Impact on Energy Expenditure. *Obes Surg*. 2013; **23**; 255-266.
16. Frankenfield D, Roth-Yousey L, Compher C, FADA, For the evidence analysis working group. Comparison of predictive equations for resting metabolic rate in healthy nonobese and obese adults: a systematic review. *J Am Diet Assoc* 2005;**105**:775-789.
17. Mifflin MD, St Jeor ST, Hill LA, Scott BJ, Daugherty SA, Koh YO. A new predictive equation for resting energy expenditure in healthy individuals. *Am J Clin Nutr* 1990; **51**, 241–247.
18. De Lorenzo A, Tagliabue A, Andreoli A, Testolin G, Comelli M, Deuremberg P. Measured and predicted resting metabolic rate in Italian males and females aged 18-59 y. *Eur J Clin Nutr* 2001; **55**, 208–214.
19. Müller MJ, Bosy-Westphal A, Klaus S, Kreymann G, Luhrmann PM, Neuhauser-Berthold M et al. World Health Organization equations have shortcomings for predicting resting energy expenditure in persons from a modern, affluent population: generation of a new reference standard from a retrospective analysis of a German database of resting energy expenditure. *Am J Clin Nutr* 2004; **80**: 1379–1390.
20. Lazzer S, Agosti F, Silvestri P, Derumeaux-Burel H, Sartorio A. Prediction of resting energy expenditure in severely obese Italian women. *J Endocrinol Invest* 2007, **30**: 20–27.
21. Metropolitan Life Insurance Company. Metropolitan Height And Weight Tables For Men And Women On Metric Basis. 1999.
22. Schoeller DA. Measurement of energy expenditure in free-living humans by using doubly labelled water, *J Nutr* 1988; **118**: 1278-1289.

23. Crouter SE, Kuffel E, Haas JD, Frongillo EA, Bassett, DR Jr. A Refined 2-Regression Model for the ActiGraph Accelerometer. *Med Sci Sports Exerc* 2010;**42(5)**:1029-1037
24. Jésus P, Achmrah N, Grigioni S, Charles J, Rimbart A, Falope V et al. Validity of predictive equations for resting energy Expenditure according to the body mass index in a population of 1726 patients followed in a Nutrition Unit. *Clin Nutr* 2015; **34**:529-525.
25. Weijs PJM. Validity of predictive equations for resting energy expenditure in US and Dutch overweight and obese class I and II adults aged 18-65 y. *Am J Clin Nutr* 2008; **88**:959-970.
26. Marra M, Cioffi I, Sammarco R, Montagnese C, Naccarato M, Amato V, Contaldo F et al. Prediction and evaluation of resting energy Expenditure in a large group of obese outpatients. *Inter J Obes* 2017;**41**: 697-705.
27. World Health Organization (WHO). Energy and Protein Requirements. Report of a Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser* 1985;**724**;1-206. Disponible in: <http://www.fao.org/docrep/003/AA040E/AA040E00.htm> (accessed May, 2017).
28. Henry CJK. Basal metabolic rate studies in humans: measurement and development of new equations. *Public Health Nutr* 2005; **8**, 1133–1152.
29. Harris JA, Benedict TG. A biometric study of human basal metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1918; **4**:370-313.
30. American Society for Metabolic and Bariatric Surgery (ASMBS). Bariatric Surgery Procedures. Disponible in: <https://asmbs.org/patients/bariatric-surgery-procedures>. Accessed in: June 09, 2017.
31. Altman DG. Practical Statistics for Medical Research. London: Chapman and Hall, 1991. Print
32. Poli VFS, Sanches RB, Moraes AS, Fidalgo JPN, Nascimento MA, Andrade-Silva SG et al. Resting energy Expenditure in obese women: comparison between measured and estimated values. *Br J Nutr* 2016; **116**:1306-1313.
33. Ramirez-Marrero FA, Edens KL, Joyner MJ, Curry TB. Predicted vs actual resting energy Expenditure and activity coefficients: Post-Gastric Bypass, Lean and Obese women. *Obes Control Ther.*2014; **1(2)**:1-7.
34. Toozé Ja, Schoeller DA, Subar AF, Kipnis V, Schatzkin A, Troiano RP. Total daily energy expenditure among middle-aged men and women: the OPEN Study. *Am J Clin Nutr* 2007; **86**: 382-387.

35. Ruiz JR, Ortega FB, Rodriguez G, Alkorta P, Labayen I. Validity of resting energy Expenditure predictive equations before and after energy-restricted diet intervention in obese women. *PloS One*. 2011; **6(9)**: e23759. Doi 10.1371/journal.pone.0023759.
36. Van Gemert WG, Westerterp KR, Greve JW, Soeters PB. Reduction of sleeping metabolic rate after vertical banded gastroplasty. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1998; **22(4)**: 343-8.
37. Vatieer C, Henegar C, Ciangura C, Poitou-Bernert C, Basdevant A, Oppert JM. Dynamic relations between sedentary behavior, physical activity, and body composition after bariatric surgery. *Obes Surg*. 2012; **22**: 1251–6.
38. Jensen MD, Ryan DH, Apovian CM, Ard JD, Comuzzie AG, Donato KA, Hu FB, Hubbard VS, Jakicic JM, Kushner RF, Loria CM, Millen BE, Nonas CA, Pi-Sunyer FX, Stevens J, Stevens VJ, Wadden TA, Wolfe BM, Yanovski SZ. 2013 AHA/ACC/TOS guideline for the management of overweight and obesity in adults: a report of the American College of Cardiology/ American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and The Obesity Society. *Circulation*. 2014; **129 (suppl 2)**: S102–S138.

2. Considerações Finais

2. Considerações Finais

O propósito principal deste estudo foi verificar a influência da cirurgia bariátrica no metabolismo energético, composição corporal e consumo energético aos 6 e 12 meses após BGYR, bem como na acurácia das equações preditivas do gasto energético de pacientes obesas e após serem submetidas a cirurgia bariátrica. Os dados coletados nesta pesquisa nos permitiram atingir os objetivos propostos, mostrando que o GET pode estar relacionada ao insucesso da perda ponderal devido à adaptação metabólica verificada no pós-operatório recente, porém, aos 12 meses com a estabilização da perda de MLG e manutenção da perda de MG, esse efeito é atenuado. Adicionalmente, verificamos que as equações preditivas do gasto energético, frequentemente utilizadas na prática clínica, podem estar sendo influenciadas pela adaptação metabólica pós-cirurgia.

Assim, considerando que o número de participantes foi uma limitação do estudo, e direcionando para perspectivas de novas pesquisas, verificamos a importância da realização de estudos epidemiológicos que permitam avaliações do gasto energético e da composição corporal, bem como sua inter-relação com a perda ponderal do paciente bariátrico. Concomitantemente, recomendamos a realização de estudos com grupos de pessoas com obesidade grave e bariátricas que permitam a determinação de equações preditivas de gasto energético, específicas para essa população, a qual é crescente e demanda cuidados específicos.

Referências

Referências

1. Caballero B. The Global Epidemic of Obesity: An Overview. *Epidemiol. Rev.* 2007; 29: 1-5, 2007. DOI: 10.1093/epirev/mxm012.
2. World Health Organization (WHO). Obesity and overweight. Fact Sheet nº311. Atualizado em Junho de 2016. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>. Acesso em Maio de 2017.
3. Ministério Da Saúde (Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigitel Brasil, 2016: Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico. Brasília: Ministério da Saúde, 2017. Disponível em < http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/abril/17/Vigitel_17-4-17-final.pdf/> Acesso em Maio de 2017.
4. Leibel RL, Rosenbaum M, Hirsch J. Changes in energy expenditure resulting from altered body weight. *N. Engl. J. Med.* 1995; 332: 621-628. [Erratum, *N Engl J Med* 1995;333:399].
5. Martin CK, Heilbronn LK, Jonge L, DeLany JP, Volaufova J, Anton S, et al. Effect of calorie restriction on resting metabolic rate and spontaneous physical activity. *Obesity*, 2007; 15: 2964–2973.
6. Buchwald H, Avidor Y, Braunwald E, Jensen MD, Pories W, Fahrenbach K, et al. Bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*, 2004; 292 (14): 1724-1737.
7. Schauer PR, Kashyap SR, Wolski K, Brethauer SA, Kirwan JP, Pothier CE, et al. Bariatric Surgery versus Intensive Medical Therapy in Obese Patients with Diabetes. *N. Engl. J. Med.* 2012; 366: 1567-1576.
8. Bray GA, Tartaglia LA. Medicinal strategies in the treatment of obesity. *Nature*, 2000; 404: 672-677.
9. Ayyad C, Andersen T. Long-term efficacy of dietary treatment of obesity: a systematic review of studies published between 1931 and 1999. *Obesity reviews*, 2000; 1: 113–119.
10. Wadden TA, Butryn ML, Kirsin JB. Efficacy of lifestyle modification for long-term weight control. *Obes. Res.* 2004;12(suppl.): 151S–162S.
11. Redman LM, Heilbronn LK, Martin CK, De Jonge L, Williamson DA, Delany JP, et al. Metabolic and Behavioral Compensations in Response to Caloric Restriction: Implications for the Maintenance of Weight Loss. *PLoS ONE*, 2009; 4(2): e4377. doi:10.1371/journal.pone.0004377.

12. Sumithran P, Prendergast LA, Delbridge E, Purcell K, Shulkes A, Kriketos A, Proietto, J. Long-Term Persistence of Hormonal Adaptations to Weight Loss. *N. Engl. J. Med.*, 2011; 365: 1597-1604.
13. Pasiakos SM, Caruso CM, Kellogg MD, Kramer FM, Lieberman HR. Appetite and Endocrine Regulators of Energy Balance After 2 Days of Energy Restriction: Insulin, Leptin, Ghrelin, and DHEA-S. *Obesity*, 2011; 19: 1124–1130. doi:10.1038/oby.2010.316.
14. Vetter ML, Dumon KR, Williams NN. Surgical Treatments for Obesity. *Psychiatr. Clin. North. Am.* 2011; 34(4): 881-893. doi:10.1016/j.psc.2011.08.012.
15. Cummings DE, Weigle DS, Frayo RS, Breen PA, Ma MK, Dellinger EP, et al. Plasma Ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *N. Engl. J. Med.* 2002; 346: 1623-1630.
16. Chronaiou A, Tsoi M, Kehagias I, Leotsinidis M, Kalfarentzos F, Alexandrides T.K. Lower Ghrelin Levels and Exaggerated Postprandial Peptide-YY, Glucagon-Like Peptide-1, and Insulin Responses, After Gastric Fundus Resection, in Patients Undergoing Roux-en-Y Gastric Bypass: A Randomized Clinical Trial. *Obes. Surg.* 2012; 22: 1761–1770. DOI 10.1007/s11695-012-0738-5.
17. Rao RS. Bariatric Surgery and the Central Nervous System. *Obes. Surg.* 2012; 22: 967–978.. DOI 10.1007/s11695-012-0649-5.
18. Peterli R, Steinert RE, Woelnerhanssen B, Peters T, Christoffel-Courtin C, Gass M, et al. Metabolic and Hormonal Changes After Laparoscopic Roux-en-Y Gastric Bypass and Sleeve Gastrectomy: a Randomized, Prospective Trial. *Obes. Surg.* 2012; 22: 740–748. DOI 10.1007/s11695-012-0622-3.
19. Herman KM, Carver TE, Christou NV, Andersen R.E. Keeping the Weight Off: Physical Activity, Sitting Time, and Weight Loss Maintenance in Bariatric Surgery Patients 2 to 16 Years Postsurgery. *Obes Surg.* 2014; 24: 1064–1072. DOI 10.1007/s11695-014-1212-3.
20. Ritz P, Caiazzo R, Becouarn G, Arnalsteen L, Andrieu S, Topart P, et al. Early prediction of failure to lose weight after obesity surgery. *Surg Obes Relat Dis.* 2013; 9: p.118-122.
21. Magro, DO, Geloneze B, Delfini R, Pareja BC, Callejas F, Pareja, JC. Long-term regain after gastric by-pass: a 5 year prospective study. *Obes Surg.* 2008; 18: 648-651. DOI 10.007/s11695-007-9265-1.
22. Karmali S, Brar B, Shi X, Sharma AM, de Gara C, Birch, DW. Weight recidivism post-bariatric surgery: a systematic review. *Obes Surg.* 2013; 23: 1922-1933. DOI: 10.1007/s11695-013-1070-4.

23. Lam YY, Ravussin E. Indirect calorimetry: an indispensable tool to understand and predict obesity. *Eur J of Clin Nutr.* 2017; 71: 318-322. doi:10.1038/ejcn.2016.220.
24. Psota T, Chen KY. Measuring energy expenditure in clinical populations: rewards and challenges. *Eur J Clin Nutr.* 2013; 67(5): 436-442. doi:10.1038/ejcn.2013.38.
25. Harris JA, Benedict TG. A biometric study of human basal metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1918; 4: 370-313.
26. World Health Organization (WHO). Energy and Protein Requirements. Report of a Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation. *World Health Organ technical report series* 1985, nº 724; 1-206. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/003/AA040E/AA040E00.htm>>. Acesso em Maio, 2017.
27. Henry CJK. Basal metabolic rate studies in humans: measurement and development of new equations. *Public Health Nutr.* 2005; 8: 1133-1152.
28. Institute Of Medicine (IOM). Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intakes (DRIs): Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrates, Fiber, Fat, Protein and Amino Acids (Macronutrients). Washington, D.C. National Academy Press, p. 697-736, 2005.
29. Mifflin MD, St Jeor ST, Hill LA, Scott BJ, Daugherty SA, Koh YO. A new predictive equation for resting energy expenditure in healthy individuals. *Am J Clin Nutr.* 1990; 51: 241-247.
30. De Lorenzo A, Tagliabue A, Andreoli A, Testolin G. Measured and predicted resting metabolic rate in Italian males and females aged 18-59 y. *Eur J Clin Nutr.* 2001; 55: 208-214.
31. Müller M, Bosy-Westphal A, Klaus S, Kreymann G, Lührmann PM, Neuhäuser-Berthold, M. et al. World Health Organization equations have shortcomings for predicting resting energy expenditure in persons from a modern, affluent population: generation of a new reference standard from a retrospective analysis of a German database of resting energy expenditure. *Am J Clin Nutr.* 2004; 80: 1379-1390.
32. Lazzer S, Agosti F, Silvestri P, Derumeaux-Burel H, Sartorio A. Prediction of resting energy expenditure in severely obese Italian women. *J Endocrinol Invest.* 2007; 30: 20-27.
33. Madden AM, Mulrooney HM, Shah S. Estimation of energy expenditure using prediction equations in overweight and obese adults: a systematic review. *J Hum Nutr Diet.* 2016; 29: 458-476. Doi:10.1111/jhn.12355.

34. Jebb SA. Dietary determinants of obesity. *Obes Rev.* 2007; 8(1): 93–97.
35. Heilbronn LK, de Jonge L, Frisard M I, DeLany JP, Larson-Meyer DE, Rood J. et al. Effect of 6-Month Calorie Restriction on Biomarkers of Longevity, Metabolic Adaptation, and Oxidative Stress in Overweight Individuals - A Randomized Controlled Trial. *JAMA*, 2006; 295: 1539-1548.
36. Larson DE, Ferraro RT, Robertson DS, Ravussin E. Energy metabolism in weight-stable postobese individuals. *The Amer J Clin Nut.* 1995; 62(4): 735-739.
37. Yost TJ, Eckel RH. Fat calories may be preferentially stored in reduced-obese women: a permissive pathway for resumption of the obese state. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1988; 67: 259-264..
38. Buchwald H. The Evolution of Metabolic/Bariatric Surgery. *Obes Surg.* 2014; 24: 1126–1135. DOI 10.1007/s11695-014-1354-3.
39. Ionut V, Burch M, Youdim A, Bergman R N. Gastrointestinal Hormones and Bariatric Surgery-induced Weight Loss. *Obes.* 2013; 21: 1093-1103. doi:10.1002/oby.20364
40. Coupaye M, Bouillot JL, Coussieu C, Guy-Grand B, Basdevant A, Oppert JM. One-Year Changes in Energy Expenditure and Serum Leptin Following Adjustable Gastric Banding in Obese Women. *Obes Surg.* 2005; 15: 827-833.
41. Carey DG, Pliego GJ, Raymond RL, Skau KB. Body Composition and Metabolic Changes Following Bariatric Surgery: Effects on Fat Mass, Lean Mass and Basal Metabolic Rate. *Obes. Surg.* 2006; 16(4): 469 - 477.
42. Oliveira MRM, Novais PFS, Quesada KR, de Souza CL, Junior IR, & de Souza Leite CV. Body weight and Energy Intake and Expenditure in Bariatric Surgery. In: *Advanced Bariatric and Metabolic Surgery*, Dr. Chih-Kun Huang (Ed.), 2012. ISBN: 978-953-307-926-4, InTech, Disponível em: <<http://cdn.intechweb.org/pdfs/29490.pdf>>
43. Thivel D, Brakonieki K, Duche P, Béatrice M, Yves B, Laferrère B. Surgical Weight Loss: Impact on Energy Expenditure. *Obes Surg.* 2013; 23: 255-266.
44. Johannsen DL, Knuth ND, Huizenga R, Rood JC, Ravussin E, Hall K.D. Metabolic Slowing with Massive Weight Loss despite Preservation of Fat-Free Mass. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2012; 97: 2489–2496.
45. Alpert SS. The cross-sectional and longitudinal dependence of the resting metabolic rate on the fat-free mass. *Metabolism.* 2007; 56: 363– 372.
46. Bosy-Westphal A, Reinecke U, Schlörke T, Illner K, Kutzner D, Heller M, et al. Effect of organ and tissue masses on resting energy expenditure in

- underweight, normal weight and obese adults. *Intern J Obes*. 2004; 28: 72–79, 2004.
47. Ravussin E, Burnand B, Schutz Y, Jequier E. Energy expenditure before and during energy restriction in obese patients. *Am. J. Clin. Nutr.* 1985; 41: 753-759.
48. Weinsier RL, Nagy TR, Hunter GR, Darnell BE, Hensrud DD, Weiss HL. Do adaptive changes in metabolic rate favor weight regain in weight-reduced individuals? An examination of the set point theory. *Am. J. Clin. Nutr.* 2000; 72: 1088-1094.
49. Sénéchal M, Arguin H, Bouchard DR, Carpentier AC, Ardilouze JL, Dionne IJ, et al. Interindividual variations in resting metabolic rate during weight loss in obese postmenopausal women. A pilot study. *Metabolism Clinical and Experimental*, 2010; 59: 478–485.
50. Hill JO, Sparling PB, Shields TW, Heller PA. Effects of exercise and food restriction on body composition and metabolic rate in obese women. *Am. J. Clin. Nutr.* 1987; 46: 622-630.
51. Sjöström CD, Lissner L, Wedel H, Sjöström L. Reduction in incidence of diabetes, hypertension and lipid disturbances after intentional weight loss induced by bariatric surgery: the SOS Intervention Study. *Obes Res*. 1999; 7: 477 – 484.
52. Sugerman HJ. Bariatric surgery for severe obesity. *J Assoc Acad Minor Phys.* 2001; 12: 129 – 136.
53. Frankenfield D, Roth-Yousey L, Compher C, Evidence Analysis Working Group. Comparison of predictive equations for resting metabolic rate in healthy nonobese and obese adults: a systematic review. *J Am Diet Assoc.* 2005; 105: 775-789.
54. Hasson RE, Howe CA, Jones BL, Freedson PS. Accuracy of four resting metabolic rate prediction equations: Effects of sex, body mass index, age, and race/ethnicity. *J Sci Med in Sport*. 2011; 14: 344-351.
55. Prince SA, Adamo KB, Hamel ME, Hardt J, Gorber SC, Tremblay M. Comparison of direct versus self-report measures for assessing physical activity in adults: a systematic review. *Int J Behav Nutr Phys Act*. 2008; 5(56): 1-24. doi:10.1186/1479-5868-5-56.
56. Shephard RJ. Limits to the measurement of habitual physical activity by questionnaires. *Br J Sports Med*. 2003; 37: 97-206.

57. Strath SJ, Peiffer KA, Whitt-Glover MC. Accelerometer use with children, older adults, and adults with functional limitations. *Med Sci Sports Exerc.*2012; 44(suppl.1): S77–S85. doi:10.1249/MSS.0b013e3182399eb1.
58. Mahabir S, Baer DJ, Giffen C, Clevidence BA, Campbell WS, Taylor PR, et al. Comparison of energy expenditure estimates from 4 physical activity questionnaires with doubly labeled water estimates in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr.*2006; 84: 230-236.
59. Ramirez-Marrero FA, Edens KL, Joyner MJ, Curry TB. Predicted vs actual resting energy Expenditure and activity coefficients: Post-Gastric Bypass, Lean and Obese women. *Obes Control Ther.*2014; 1(2): 1-7.
60. Liu A, Byrne NM, Ma G, Nasreddine L, Trinidad TP, Kijboonchoo K, et al. Validation of bioelectrical impedance analysis for total body water assessment against the deuterium dilution technique in Asian children. *Eur J Clin Nutr.* 2011; 65(12): 1-7. Doi:10.1038/ejcn.2011.122.
61. Dugas LR, Harders R, Merrill S, Ebersole K, Shoham DA, Rush E.C. et al. Energy expenditure in adults living in developing compared with industrialized countries: a meta-analysis of doubly labeled water studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 2011; 93: 427–441.
62. Ishikawa-Takata K, Naito Y, Tanaka S, Ebine N, Tabata I. Use of Doubly Labeled Water to Validate a Physical Activity Questionnaire Developed for the Japanese Population. *J. Epidemiol.*2011; 21(2): 114-121. doi:10.2188/jea.JE20100079.
63. Nielsen SB, Wells JC, Slater C, Fewtrell MS, Reilly JJ. Administering labelled water to exclusively breast-fed infants in studies involving stable isotope dilution techniques. *Isotopes Environ Health Stud.*2011; 47(1): 18-25.
64. Luiking YC, Engelen MP, Soeters PB, Boirie Y, Deutz NE. Differential metabolic effects of casein and soy protein meals on skeletal muscle in healthy volunteers. *Clin Nutr.* 2011; 30: 65-72.
65. Davidsson L, Tanumihardjo S. New frontiers in science and technology: nuclear techniques in nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 2011; 1S-5S. Doi:10.3945/ajcn.110.005819.
66. Valenzuela LO, Chesson LA, Bowen GJ, Cerling TE, Ehleringer J.R. Dietary Heterogeneity among Western Industrialized Countries Reflected in the Stable Isotope Ratios of Human Hair. *PLoS ONE.* 2012; 7(3): e34234. doi:10.1371/journal.pone.0034234.
67. Nardoto GB, Murrieta RSS, Prates LEG, Adams C, Garavello MEP, Schor T, et al. Frozen Chicken for Wild Fish: Nutritional Transition in the Brazilian

Amazon Region Determined by Carbon and Nitrogen Stable Isotope Ratios in Fingernails. *Am J Hum Biol.*2011; 23: 642-650.

68. Yeung EH, Saudek CD, Jahren AH, Kao WHL, Islas M, Kraft R, et al. Evaluation of a Novel Isotope Biomarker for Dietary Consumption of Sweets. *Am J Epidemiol.* 2010; 172(9): 1045-1052. DOI: 10.1093/aje/kwq247.
69. Bhutani S, Racine N, Shriver T, Schoeller DA. Special Considerations for Mensuaring Energy Expenditure with Doubly Labeled Water under Atypical Conditions. *J Obes Weigh Loss Ther.*2015; S5: 1-9. DOI:10.4172/2165-7904.S5-002.
70. International Atomic Energy Agency (IAEA). Assessment of body composition and total energy expenditure in human using stable isotope techniques. IAEA Human Health Series, N° 3. Vienna, 2009.
71. Ferriolli, E. Estudos gerontológicos empregando isótopos estáveis e espectrometria de massa: implantação da metodologia e estudos da composição corporal, metabolismo energético e protéico de idosos. Tese (livre-docência). Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Departamento de Clínica Médica. 2006.
72. Shoenheimer R, Rittenberg D. Deuterium as an indicator in the study of intermediary metabolism: The role of the fat tissue. *J. Biol. Chem.*1939; 111:175-181.
73. Shoenheimer R, Rather S, Rittenberg D. Studies in protein metabolism: the metabolism activity of body proteins investigated with 1(-) –leucine containing 2 isotopes. *J. Biol. Chem.*1939; 130: 703-732..
74. Dole, M. The relative atomic weights of oxygen in water and air. *J. Am. Chem. Soc.*1935; 57: 2731-2735.
75. Wood Hg, Werkman Ch, Hemingway A. Nier A. Heavy carbon as a tracer in bacterial fixation of carbon dioxide. *J. Biol. Chem.*1940; 135: 789-790.
76. Lifson N, Gordon GB, Visscher Mb, Nier AOC. The fate of utilized molecular oxygen and the source of the oxygen of respiratory carbon dioxide, studies with the aid of heavy oxygen. *J. Biol. Chem.*1949; 180: 803-811.
77. Wolfe RR, Chinkes DL. Isotope Tracers in Metabolic Research: Principles and Practice of Kinetic Analysis. 2nd Ed. John Wiley and Sons Inc., New Jersey, 2005.
78. International Dietary Energy Consultancy Group (IDECG Working Group). The Doubly labeled water method for measuring energy expenditure: a consensus by the IDECG Working Group. PRENTICE, A.M.(ed). Viena: International Atomic Energy Agency, 1990.

79. Roberts SB, Coward WA, Ewing G, Savage J, Cole TJ, Lucas A. Effect of weaning on accuracy of doubly-labelled water method in infants. *Am. J. Physiol.* 1988; 254: R622-R627.
80. Schoeller DA. Measurement of energy expenditure in free-living humans by using doubly labeled water. *J Nutr.* 1988; 118(11): 1278-1289.
81. Schoeller DA, Van Santen E. Measurement of energy expenditure in humans by doubly labeled water method. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol.* 1982; 53: 955-959.
82. Wong WW. energy utilization with doubly labelled water ($^2\text{H}_2^{18}\text{O}$). In Abrams SA, Wong GG (ed). *Stable Isotopes in Human Nutrition Laboratory Methods and Research Applications*. CABI publishing, vol. 1, 2003. Cap. 6.
83. Speakman JR. *Doubly Labelled Water: Theory and Practice*. Chapman & Hall. 1^oEd. 399p. London, 1997.
84. Weir JBV. New Methods for calculating metabolic rate with special reference to protein metabolism. *J. Physiol.* 1949; 109: 1-9.
85. Fogaça KCP. *Investigação de Fatores envolvidos na Recuperação de Peso após Derivação Gástrica*. [tese de doutorado]. Araraquara: Programa de Pós - graduação em Alimentos e Nutrição. UNESP – Fcfar, 2009.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Casuística e Método

Este projeto fez parte de um estudo maior denominado "Avaliação da influência de fatores metabólicos e genéticos sobre a homeostase energética na cirurgia bariátrica" que recebeu parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da UNESP de Botucatu, sob o protocolo n. 306.538 (ANEXO I) e auxílios à pesquisa pelas agências de fomento "Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP" sob nº de processo: 2011/18243-1, 2013/04420-4, 2013/03998-2 e 2016/02306-8 e "Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES".

1. Casuística

Para a estimativa da amostra (n=14) foi considerado o erro do tipo 1 de 5% (α 0,05), grau de confiança de 95% e nível de precisão (poder do teste) de 90%, para teste t pareado (1) (AYRES et al., 2003), tomando como referência os resultados para calorimetria indireta (2) (FOGAÇA, 2009), porém, considerando uma margem de segurança, foram convidadas 22 mulheres que aguardavam na fila de espera para a cirurgia bariátrica. A seleção das participantes ocorreu de acordo os seguintes critérios:

➤ *Critérios de inclusão*

- ✓ Ser do sexo feminino
- ✓ Idade entre 20 e 45 anos, em menacme.

- ✓ IMC $\geq 40 \text{ kg/m}^2$ e $\leq 50 \text{ kg/m}^2$.
- ✓ Aguardando na fila de espera para a realização do procedimento cirúrgico.
- ✓ Não apresentar doenças que causem alterações no metabolismo energético (diabetes mellitus, hipotireoidismo, infecção por HIV, neoplasias, cardiopatias, nefropatias e hepatopatias).
- ✓ Não apresentar doenças que causem edema (insuficiência venosa, gravidez, trombose, sepse, linfedemas).
- ✓ Não consumir medicamentos que causem alterações metabólicas e abortivas: diuréticos, anfetaminas, hormônios tireoidianos, topiramato, orlistat, corticosteróides, etc.

➤ *Critérios de exclusão*

- ✓ Foram excluídas as mulheres que não completaram todas as etapas do estudo e aquelas cuja análise isotópica do material biológico coletado não apresentou valores adequados após repetições das análises.

2. Desenho do Estudo

O estudo compreendeu um ensaio clínico autocontrolado, realizado em atividades em grupos nos momentos pré-cirurgia e após a realização do procedimento cirúrgico. O acompanhamento clínico teve duração de 24 meses sendo realizadas as avaliações das variáveis do estudo nos momentos pré-operatório e após seis e doze meses da cirurgia (Figura 1).

Após convite à pesquisa e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE - ANEXO II), as pacientes retornaram à clínica para suporte

médico e aconselhamento nutricional, de acordo com o protocolo de atendimento do programa de cuidado multidisciplinar de cirurgia bariátrica da Clínica Bariátrica de Piracicaba / SP (3) (NOVAIS et al., 2014). Aproximadamente 30 dias anteriores à realização da cirurgia bariátrica, as pacientes participaram do primeiro dia de coleta de dados que englobou a coleta de urina, a oferta da dose de ADM, a coleta das informações antropométricas, orientações para o preenchimento correto dos registros alimentares de 24 horas (Rg24h) e uso adequado do acelerômetro. Após 15 dias do primeiro encontro para coleta de dados, as pacientes retornaram à clínica e, amostras de urina coletadas pelas pacientes durante 14 dias foram armazenadas para posteriores análises. Os Rg24h foram recolhidos e conferidos junto às pacientes, bem como o uso do acelerômetro. Aos 6 e 12 meses pós-operatórios, esses procedimentos foram repetidos (Figura 1).

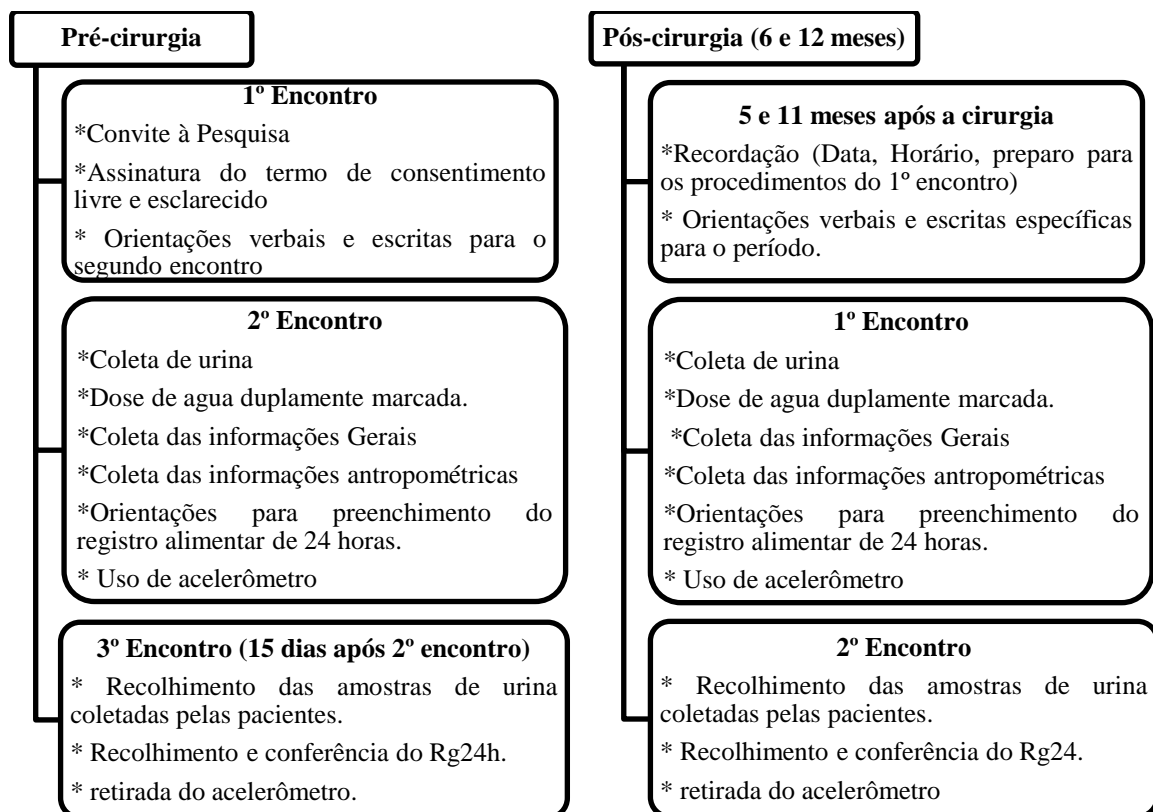


Figura 1 - Desenho experimental dos procedimentos metodológicos desenvolvidos nas fases pré e pós-cirurgia.

3. Procedimentos Metodológicos

3.1 Recrutamento

O recrutamento das participantes se iniciou em maio de 2013 no ambulatório multidisciplinar de Cirurgia Bariátrica da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. Neste local deparou-se com a dificuldade em selecionar as pacientes com os critérios de inclusão estabelecidos para a pesquisa, em número suficiente e tempo hábil para a execução do projeto. Portanto, após reunião com o grupo de pesquisa, decidiu-se por mudar o local de recrutamento e acompanhamento das participantes para a Clínica Bariátrica de Piracicaba/SP, centro de referência em cirurgia bariátrica, instituição que já vinha sendo parceira em outros trabalhos da nossa equipe e que realiza um volume bem maior de cirurgias, com boa estrutura para realização de pesquisas.

Em Agosto de 2013 iniciou-se a triagem a partir de dados de sistema da clínica Bariátrica de Piracicaba/SP. Realizou-se uma seleção prévia a partir das informações de Índice de Massa Corporal (40 a 50 kg/m²), idade (18 a 45 anos) e cidade de moradia, sendo selecionadas 45 pacientes com residência na cidade de Piracicaba ou cidades vizinhas que compreendem a Diretoria Regional de Saúde X. Estas mulheres foram contatadas via telefone para uma reunião no dia 04 de novembro de 2013, na qual foi apresentada a proposta do projeto de pesquisa e também, como parte da rotina da clínica, entregue os pedidos de exames complementares para obtenção de informações relacionadas aos critérios de inclusão, cujos resultados definiriam o processo de seleção das candidatas. As

pacientes também receberam as datas de retorno individual no qual trouxeram os resultados dos exames complementares para avaliação nos períodos entre janeiro e fevereiro de 2014. Foram selecionadas 22 mulheres que cumpriam com os requisitos dos critérios de inclusão para a pesquisa.

As pacientes selecionadas foram divididas 2 grupos que favoreceram as orientações e a aproximação entre profissionais e pacientes, estas receberam as datas para as atividades preparatórias para a cirurgia bariátrica, as quais foram desenvolvidas de acordo com a Portaria nº 425, de 24 de março de 2013.

3.2 Acompanhamento nutricional pré e pós-operatório

Foram realizados encontros de orientação à saúde com a fisioterapeuta, a psicóloga, a enfermeira e com a nutricionista. O primeiro encontro realizado englobou uma recordação das explicações sobre o projeto de pesquisa com o grupo já selecionado, realização da leitura do TCLE (ANEXO II) e a assinatura do mesmo. As atividades de orientações nutricionais realizadas ao longo do período de tratamento pré-operatório englobaram: orientações qualitativas baseada no Guia Alimentar para a População Brasileira do Ministério da Saúde (4) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008), Orientações quantitativas com entrega de planos alimentares calculados de acordo com as necessidades energéticas para grupo de indivíduos obesos (3) (NOVAIS et al., 2014), orientações sobre: nutrientes e deficiências nutricionais no pós-operatório; produtos *diet* e *light*, suplementos alimentares necessários ao paciente bariátrico, retornos de rotina para avaliação das dificuldades de seguimento das orientações nutricionais e perda ponderal e orientações sobre a dieta líquida a qual as pacientes realizam 3 dias antes a 20 dias

após a cirurgia. Atividades estas previstas no protocolo de atendimento nutricional de rotina da Clínica Bariátrica de Piracicaba (3) (NOVAIS et al., 2014), mantendo a consistência do tratamento e das informações entre os grupos de pesquisa e tratamento convencional.

Encontros complementares foram realizados com o objetivo de treinar as pacientes para um preenchimento adequado dos registros de consumo alimentar e de atividade física, sendo estes preenchidos ao longo dos dias e corrigidos com a nutricionista no momento da entrega, a qual retomou as explicações quando verificadas dúvidas e dificuldades de preenchimento adequado. Os dados de registro de atividade física não serão objeto dos resultados aqui apresentados.

No período que decorreu o pós-operatório (0 a 5 meses de cirurgia) foram realizadas orientações nutricionais de acordo com o protocolo da Clínica Bariátrica de Piracicaba (3) (NOVAIS et al., 2014). As pacientes retornaram à clínica com 15 dias de cirurgia para receber as orientações de evolução da dieta líquida para a dieta pastosa e posteriormente para a evolução à dieta geral.

Com 3 e 4 meses de cirurgia houve um novo encontro das participantes da pesquisa com a nutricionista no qual foi realizada orientações nutricionais sobre evolução dietética pós-operatória, qualidade nutricional, evolução da perda ponderal, readequação do consumo de alimento devido aversões alimentares e dificuldades de ingestão e ocorrência de dumping.

Com 5 e 11 meses de cirurgia, atividades de orientação nutricional foram realizadas com os grupos da pesquisa com temas sobre evolução dietética, qualidade nutricional, evolução da perda ponderal, readequação do consumo de alimento devido aversões e dificuldades de ingestão. Também foram avaliados os parâmetros bioquímicos com o objetivo de readequação da possível desnutrição de

micronutrientes. Neste período as participantes foram lembradas da coleta de dados que aconteceria no 6º e 12º mês pós-cirurgia.

Durante as atividades de coletas de dados, que ocorreram após as pacientes completarem 6 e 12 meses de cirurgia, também foram discutidas questões de alimentação saudável, necessidade de realizar exercícios físicos para potencializar a perda ponderal e verificação de exames bioquímicos que não foram apresentados no 5º e 11º mês pós-operatório.

3.3 Identificação das participantes

As participantes da pesquisa responderam um questionário com informações pessoais que contemplavam: nome, endereço, telefone, data de nascimento, idade, cor da pele (5) (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2008) e grau de escolaridade.

3.4 Antropometria

Foram aferidas medidas de peso atual e altura pelo mesmo pesquisador mesma balança e estadiômetro. O peso foi aferido em bioimpedância elétrica da marca InBody 230® com capacidade máxima de 150 Kg. Para essa mensuração, a paciente foi orientada a ficar em pé, descalça e com o mínimo de roupas possível, permanecendo ereta, com os pés juntos no centro da plataforma, braços ao longo do corpo, para evitar possíveis alterações na leitura das medidas (6) (GIBSON, 1993). A altura foi determinada utilizando-se o estadiômetro vertical da marca SECA® com escala de 1,0 mm. A paciente foi colocada na posição ortostática, cabeça orientada

no plano de Frankfurt, descalça e, na medida do possível, mantendo os calcanhares, cinturas pélvica e escapular, e região occipital em contato com o aparelho (GIBSON, 1993). IMC de cada paciente foi determinado pelo peso corporal (quilos), dividido pela altura (metros), ao quadrado. O peso ideal de cada participante foi calculado a partir da média do peso ideal descrito na coluna medial da tabela da (7) *Metropolitan Life Foundation* (1983), de acordo com a altura de cada paciente.

O de Peso em Excesso Perdido (%PEP) foi obtido por meio da equação 1, proposta por (8) Dietel, Gawdat e Melissas (2007).

$$PEP(\%) = \left(\frac{Peso_{pré-cirurgia} - Peso_{atual}}{Peso_{pré-cirurgia} - Peso_{ideal}} \right) \times 100 \quad (1)$$

Onde:

PEP(%)= Perda de Excesso de Peso, em porcentagem.

Peso_{pré-cirurgia} = Peso pré-cirurgia, em quilo.

Peso_{atual}= Peso atual, de acordo com o momento pós-cirurgia, em quilo.

Peso_{ideal} = Peso ideal de acordo com a tabela da (7) *Metropolitan Life Foundation* (1983).

3.5 Cirurgia

O procedimento cirúrgico realizado nas pacientes foi o *bypass* Gástrico em Y-de-Roux (BGYR) e pode ser descrito como: Laparotomia mediana supraumbelical, no qual um reservatório gástrico de pequena curvatura é confeccionado com

dimensões de 8 x 2 cm (8) (AMERICAN SOCIETY FOR METABOLIC AND BARIATRIC SURGERY, 2017). Neste procedimento há uma reconstrução do trânsito em Y de Roux com alça biliar a 40 cm do ângulo de Treitz e alça alimentar de 150 cm em posição pré-cólica (8) (AMERICAN SOCIETY FOR METABOLIC AND BARIATRIC SURGERY, 2017). A colocação do anel de contenção (*silastic*) foi determinada de acordo com o critério da paciente.

3.6 Consumo Alimentar

Os *Registo de 24 horas (Rg24h)* foram obtidos em três dias não consecutivos, sendo dois durante a semana e um de final de semana, para cada período de coleta de dados, os quais foram apresentados na tabela 8 do Apêndice D. Foi solicitado que as pacientes descrevessem o consumo de alimentos, bebidas e suplementos alimentares (proteínas e micronutrientes) consumidos no dia, bem como os tipos e quantidades das preparações. As quantidades dos alimentos consumidos foram anotadas em medidas caseiras. Posteriormente foram transformadas em gramas de alimento, com o auxílio da tabela de avaliação do consumo alimentar em medidas caseiras (10,11) (PINHEIRO et al. 2005; INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2011a). As informações dos Rg24h foram tabuladas em planilha do Excel[®] e os dados quantitativos dos nutrientes consumidos foram obtidos a partir de cálculos baseados nas informações referentes ao consumo em 100 g de alimento da tabela de consumo alimentar da população brasileira (12) (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2011b) ou referentes às tabelas nutricionais dos suplementos alimentares, quando mencionados nos registros. Os

valores de energia consumida e nutrientes foram então corrigidos pela variação do consumo intra- e interindividual por meio da estatística ANOVA fator único.

3.7 Nível de Atividade Física

O NAF foi obtido de forma direta por meio do uso do acelerômetro triaxial Actigraph (GT3X, Pensacola, FL), calibrado individualmente para cada participante utilizando o software ActiLife 6. O equipamento (~27g; 3,8 x 3,7 x 1,8 cm) foi posicionado na cintura (quadrante direito) utilizando uma cinta elástica. As mulheres foram instruídas a realizar as atividades físicas rotineiras utilizando o equipamento por duas semanas, período em que ficaram realizando as coletas de urina marcada, e remover apenas durante o banho. O NAF foi obtido a partir da equação proposta por (13) Crouter e colaboradores (2010), o qual apresentou melhor nível de acurácia (60%) quando comparada aos valores de NAF reais ($p > 0.05$) das nossas pacientes.

3.8 Gasto energético total e composição corporal

a. Dose de ADM

A dose de ADM foi calculada para cada período do estudo considerando que a média de 50% do peso total das participantes era composta por água corporal, dados confirmados por meio de bioimpedância elétrica. A dose administrada via oral foi de 2g por quilo de água corporal total de oxigênio-18 enriquecido à 10,8 átomos% e de 0,12g por quilo de água corporal total de deutério enriquecido à 99,8 átomos %. Uma alíquota de 2mL da dose foi separada em criotubo fechado e selado com *parafilm* para a análise e utilização nas equações (14) (FERRIOLLI, 2006). As

pacientes foram orientadas a manter-se em jejum por 12 horas podendo tomar água durante este período. A dose de ADM foi ingerida com a ajuda de um canudo para evitar perdas. Posteriormente, para garantir a completa ingestão da dose, 50mL de água potável foi administrada duas vezes no recipiente da dose.

b. Preparo e Análise das amostras de urina

Foram coletadas amostras de urina basal (pré-dose) e dia a dia por 14 dias. As pacientes foram orientadas a descartar a primeira urina do dia e coletar as amostras sempre no mesmo horário, anotando-o em cada frasco coletor. As amostras foram mantidas sob refrigeração até a entrega de todo material biológico. Após serem recolhidas, as amostras de urina foram pipetadas em criotubos de 4,5mL os quais foram selados com *parafilm* e armazenados em geladeira.

As amostras foram analisadas em triplicata no Laboratório de Espectrometria de Massa da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP – USP em Espectrômetros de Massa de Razão Isotópica, modelos Hydra 20-20 and Hydra 20-22, Europe Scientific – Cheshire/UK. Valores discrepantes de cada isótopo mensurado foram excluídos e a amostra reanalisada quando necessário.

c. Equações

Para a determinação GET e da composição corporal em MLG e MG, foram desenvolvidas as equações para cada participante do estudo de acordo com protocolo proposto pela Agencia Internacional de Energia Atômica (15) (INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, 2009).

a. Cálculo do espaço de diluição dos isótopos (equação 2)

$$N_x = \left[\left(W \times \frac{A}{a} \right) \times \left(\frac{\Delta DD}{\Delta BW} \right) \right] \div 1000 \quad (2)$$

Onde:

N_x = Espaço de diluição do isótopo analisado, em Kg.

W = quantidade de água TAP usada para preparo da dose diluída.

A = dose de água duplamente marcada ofertada à participante.

a = quantidade da dose usada para a “dose diluída”

ΔDD = enriquecimento isotópico em excesso, mensurado na dose diluída, em partes por milhão (ppm).

ΔBW = antilog do intercepto Y do gráfico de Logarito Neperiano (Ln) do enriquecimento isotópico em excesso da água corporal versus o tempo.

b. Cálculo da água corporal

A ACT foi calculada a partir do espaço de diluição (N_x) dividido pelo fator de troca dos isótopos com o meio não aquoso, sendo este fator de 1,007 para ¹⁸O e de 1,041 para ²H

ACT a partir do espaço de diluição do oxigênio-18 (equação 3):

$$ACT_0 = \frac{N_0}{1,007} \quad (3)$$

Onde:

ACT₀ = água corporal total para espaço de diluição do oxigênio.

N₀ = espaço de diluição do oxigênio.

ACT a partir do espaço de diluição do deutério (equação 4):

$$ACT_D = \frac{N_D}{1,041} \quad (4)$$

Onde:

ACT_D = água corporal total para espaço de diluição do deutério.

N_D = espaço de diluição do deutério.

Média da água corporal total (equação 5):

$$ACT_{méd} = \frac{ACT_D + ACT_O}{2} \quad (5)$$

Onde:

$ACT_{méd}$ = Média da água corporal total.

ACT_D = água corporal total para espaço de diluição do deutério.

ACT_O = água corporal total para espaço de diluição do oxigênio.

c. Cálculo da composição corporal

A quantidade de MLG (equação 6) foi determinada por meio da constante de hidratação dos mamíferos (73,2%) e a MG (equação 7) por meio da subtração da MLG do valor do peso atual:

$$MLG = \frac{ACT \text{ (kg)}}{0,732} \quad (6)$$

Onde:

MLG = Massa Livre de Gordura, em quilo.

ACT = água corporal total (média).

$$MG = PA - MLG \quad (7)$$

Onde:

MG = Massa Gorda, em quilo.

PA = Peso Atual, em quilo.

MLG = Massa Livre de Gordura, em quilo.

d. Cálculo da produção do CO₂ e GET

Para o cálculo do GET, a média de ACT (equação 8) foi convertida de quilogramas para mol, e usada na equação da Taxa de Produção de CO₂:

$$ACT_{méd}(mol) = \frac{ACT_{méd}(kg) \times 1000}{18,0153} \quad (8)$$

Onde:

ACT = água corporal total, em quilo.

18,0153 = constante do peso molecular da água.

As taxas de eliminação dos isótopos (K_D e K_O) são a inclinação da reta do logaritmo neperiano (ln) do enriquecimento da água corporal em função do tempo, desde o consumo da dose.

Taxa de Produção de CO₂ (equação 9):

$$rCO_2 \text{ (mol. d}^{-1}\text{)} = 0,455 \times ACT \text{ (mol)} \times [(1,007 \times -K_o) - (1,041 \times -K_D)] \quad (9)$$

Onde:

rCO₂: Taxa de produção de CO₂ (mol/dia).

0,455 = Constante dos fatores de fracionamento (*f1;f2;f3*) dos isótopos no vapor d'água e no CO₂.

ACT = Quantidade de água corporal total obtida pela equação do espaço de diluição (mol).

1,007 = Correção do espaço de diluição do ¹⁸O.

K_o = Constante de troca do oxigênio-18.

1,041 = Correção do espaço de diluição do ²H.

K_D = Constante de troca do Deutério.

A produção do rCO₂ (equação 10) em mol.d⁻¹ foi transformada em gás (L.d⁻¹) por meio da constante 22,414.

$$rCO_2 \text{ (L. d}^{-1}\text{)} = rCO_2 \text{ (mol. d}^{-1}\text{)} \times 22,414 \quad (10)$$

Onde:

rCO₂ = Taxa de produção de CO₂, em litros e mol por dia.

22,414 = constante para transformação.

Determinação do GET

O valor do GET foi obtido por meio da equação 11, de Weir modificada:

$$GET (Kcal. d^{-1}) = rCO_2(L. d^{-1}) \times \left(1,10 + \frac{3,90}{R}\right) \quad (11)$$

Onde:

GET = Gasto Energético Total (kcal/dia).

$rCO_2(L. d^{-1})$ = Taxa de produção de CO₂ (litro/dia).

R = Coeficiente Respiratório, utilizado o valor de 0,86.

3.9 Equações Preditivas do Gasto Energético

As equações preditivas de GET e GER foram selecionadas de acordo com usabilidade e indicações para mulheres com sobrepeso e obesas, considerando as informações de peso atual e altura, idade e / ou de composição corporal (MLG ou MG), estratificadas por gênero. As equações selecionadas foram (Tabela 2):

- ✓ **Peso normal:** equações propostas pela *Food and Agriculture Organization / World Health Organization / United Nations University* (16) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1985), equações de Oxford proposta por (17) Henry (2005), equações indicadas por (18) Harris e Benedict (1918).
- ✓ **Peso normal e sobrepeso:** equação de GER propostas pela (19) Mifflin – St Jeor, et al (1990).

- ✓ **Peso sobrepeso / obesos:** equação preditiva do GET propostas pelo documento da DRI - IOM (20) (INSTITUTE OF MEDICINE, 2005), equação de (21) De Lorenzo et al., (2001), equações propostas por (22) Lazzer e colaboradores (2007), e por (23) Müller et al., (2004).

Para efeito de comparação com o gasto energético total, aferido por ADM, os valores de NAF obtido por meio de acelerômetro e o efeito térmico do alimento (ETA = 10%) foram usados como múltiplos do GER nas equações preditas (20) (INSTITUTE OF MEDICINE, 2005).

Diferente das demais, a equação da DRI (20) (INSTITUTE OF MEDICINE 2005) foi elaborada para a predição do GET, o qual considera faixas de NAF que classificam o indivíduo pelo Fator Atividade (sedentário a muito ativo).

As unidades de energia de Megajoule (1 MJ = 238.85 kcal) ou Quilojoule (1 kJ = 0.23885 kcal) foram convertidas em quilocaloria (kcal).

Tabela 1 - Equações preditivas do gasto de energia.

Equações Preditivas	
Fórmulas descritas para mulheres	
DRI – IOM	$GET \text{ (kcal/dia)} = 448 - \{(7,95 \times I) + FA \times [(11,4 \times P) + (619 \times A)]\}$
WHO	P 18-30 anos: $GER \text{ (kcal/dia)} = (14,7 \times P) + 496$ 30-60 anos: $GER \text{ (kcal/dia)} = (8,7 \times P) + 829$
	P e A 18-30 anos: $GER \text{ (kcal/dia)} = (13,3 \times P) + (334 \times A) + 35$ 30-60 anos: $GER \text{ (kcal/dia)} = (8,7 \times P) - (25 \times A) + 865$
Oxford (Henry)	P 18-30 anos: $GER \text{ (kcal/dia)} = (13,1 \times P) + 558$ 30-60 anos: $GER \text{ (kcal/dia)} = (9,74 \times P) + 694$
	P e A 18-30 anos: $GER \text{ (kcal/dia)} = (10,4 \times P) + (615 \times A) - 282$ 30-60 anos: $GER \text{ (kcal/dia)} = (8,14 \times P) + (502 \times A) - 11,6$
Harrys & Benedict	$GER \text{ (kcal/dia)} = 655,09 + (9,56 \times P) + (1,84 \times A) - (4,67 \times I)$
Mifflin–St Jeor	$GER \text{ (kcal/dia)} = (9,99 \times P) + [6,25 \times (A)] - (4,92 \times I) - 161$
De Lorenzo	$GER \text{ (kJ/dia)} = (46,322 \times P) - (15,744 \times A) - (16,66 \times I) + 944$
Lazzer	P e A $GER \text{ (MJ/dia)} = (0,042 \times P) + (3,619 \times A) - 2,678$
	CC $GER \text{ (MJ/dia)} = (0,067 \times MLG) + (0,046 \times MG) + 1,568$
Muller	P e I $GER \text{ (MJ/dia)} = (0,05 \times P) - (0,01586 \times I) + (1,103 \times S) + 2,924$
	CC $GER \text{ (MJ/dia)} = (0,05685 \times MLG) + (0,04022 \times MG) + (0,808 \times S) - (0,01402 \times I) + 2,818$

DRI - IOM = Dietary Reference Intake do Institute of Medicine; WHO = World Health Organization; GET = Gasto de Energia Total; GER = Gasto de Energia em Repouso; I = idade em anos; FA = Fator Atividade obtido pelo NAF a partir de RAF ou acelerômetro; P = peso aferido em quilogramas; A = altura em metros; CC = Composição corporal; MLG = massa livre de gordura em quilogramas; MG = Massa Gorda em quilogramas; S = Sexo (Feminino = 0).

Referências

1. Ayres M, Ayres Jr. M, Ayres DL, Santos AA. BioEstat 3.0. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém, Sociedade Civil de Mamirauá, 2003.
2. Fogaça KCP. Investigação de Fatores envolvidos na Recuperação de Peso após Derivação Gástrica. [tese de doutorado]. Araraquara: Programa de Pós - graduação em Alimentos e Nutrição. UNESP – Fcfar, 2009.
3. Novais PFS, Marin FA, Crisp AH, Rasera Jr I, Leite CVS, Oliveira, MRM. Theoretical Bases and Dietary Approach of Bariatric Patients, Essentials and Controversies in Bariatric Surgery. In: Essentials and Controversies in Bariatric Surgery, Dr. Chih-Kun Huang (Ed.), 2014. ISBN: 978-953-51-1726-1, *InTech*, DOI: 10.5772/58636. Disponível em: < <https://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/46982.pdf> >
4. Ministério Da Saúde (BRASIL). Secretaria de Atenção à Saúde. Guia alimentar para a população brasileira: promovendo a alimentação saudável / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2008. 210 p. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos).
5. Instituto Brasileiro De Geografia E Estatística (IBGE). Características Étnico-Raciais da População. Rio de Janeiro, 2008.
6. Gibson, RS. Nutritional assessment: a laboratory manual. New York: Oxford University Press, 1993.
7. Metropolitan Life Foundation. Metropolitan Height and Weight Tables. New York: Statistical Bulletin.1983; 64(supl.1): 2-9.
8. Dietel M, Gawdat K, Melissas J. Reporting Weight Loss 2007. *Obes Surg.*2007; 17: 565-568.
9. American Society For Metabolic And Bariatric Surgery (ASMBS). Bariatric Surgery Procedures. Disponível em:<<https://asmbs.org/patients/bariatric-surgery-procedures>>.Acesso em Junho, 2017.
10. Pinheiro ABV, Lacerda EMA, Benzecry EH, Gomes MCS, Costa VM. Tabela de avaliação de consumo alimentar em medidas caseiras. 5ª ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 141p.
11. Instituto Brasileiro De Geografia E Estatística (IBGE). Pesquisa de orçamentos familiares, 2008-2009 (POF): Tabela de Medidas Referidas para Alimentos consumidos no Brasil. Rio de Janeiro, 2011.

12. Instituto Brasileiro De Geografia E Estatística (IBGE). Pesquisa de orçamentos familiares, 2008-2009 (POF): Tabelas de composição nutricional dos alimentos consumidos no Brasil. Rio de Janeiro, 2011.
13. Crouter SE, Kuffel E, Haas JD, Frongillo EA, Bassett Jr DR. A Refined 2-Regression Model for the ActiGraph Accelerometer. *Med. Sci. Sports Exerc.* 2010; 42(5): 1029-1037.
14. Ferriolli, E. Estudos gerontológicos empregando isótopos estáveis e espectrometria de massa: implantação da metodologia e estudos da composição corporal, metabolismo energético e protéico de idosos. Tese (livre-docência). Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Departamento de Clínica Médica. 2006.
15. International Atomic Energy Agency (IAEA). Assessment of body composition and total energy expenditure in human using stable isotope techniques. IAEA HUMAN HEALTH SERIES, Nº 3. Vienna, 2009.
16. World Health Organization (WHO). Energy and Protein Requirements. Report of a Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation. *World Health Organ technical report series* 1985, nº 724; 1-206. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/003/AA040E/AA040E00.htm>>. Acesso em Maio, 2017.
17. Henry, CJK. Basal metabolic rate studies in humans: measurement and development of new equations. *Public Health Nutr.* 2005; 8: 1133–1152.
18. Harris JA, Benedict TG. A biometric study of human basal metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1918; 4: 370-313.
19. Mifflin MD, St Jeor ST., Hill LA, Scott BJ, Daugherty SA, Koh YO. A new predictive equation for resting energy expenditure in healthy individuals. *Am J Clin Nutr.* 1990; 51: 241–247.
20. Institute Of Medicine (IOM). Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intakes (DRIs): Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrates, Fiber, Fat, Protein and Amino Acids (Macronutrients). Washington, D.C. National Academy Press, p. 697-736, 2005.
21. De Lorenzo A, Tagliabue A, Andreoli A, Testolin G. Measured and predicted resting metabolic rate in Italian males and females aged 18-59 y. *Eur J Clin Nutr.* 2001; 55: 208–214.
22. Lazzer S, Agosti F, Silvestri P, Derumeaux-Burel H, Sartorio A. Prediction of resting energy expenditure in severely obese Italian women. *J Endocrinol Invest.* 2007; 30: 20–27.

23. Müller M, Bosy-Westphal A, Klaus S, Kreymann G, Lührmann PM, Neuhäuser-Berthold, M. et al. World Health Organization equations have shortcomings for predicting resting energy expenditure in persons from a modern, affluent population: generation of a new reference standard from a retrospective analysis of a German database of resting energy expenditure. *Am J Clin Nutr.* 2004; 80: 1379–1390.

APÊNDICE B - Padronização da técnica da água duplamente marcada

A parceria entre o Grupo de Estudo em Cirurgia Bariátrica e Metabolismo da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), coordenado pela profa. Dra. Maria Rita Marques de Oliveira, e o Centro de Isótopo Estáveis (CIE) do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB), supervisionado, em 2011, pelo prof. Dr. Carlos Ducatti, foi iniciado com o objetivo de implementar a técnica da água duplamente marcada para avaliação do gasto energético total e composição corporal em futuras pesquisas metabólicas. Para isto, a aluna Michele Novaes Ravelli, na época mestranda em alimentos e nutrição pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP conduziu o experimento de padronização da técnica da água duplamente marcada no CIE-IBB/UNESP, o qual recebeu parecer favorável para auxílio da FAPESP sob nº processo: 2011/18243-1.

A atividade foi desenvolvida em duas etapas. Na primeira etapa foram realizados os cálculos de balanço de massa isotópico que estariam presentes nas amostras de água marcada com diferentes concentrações com ajuda do prof. José Albertino Bendassoli do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) – USP. A segunda etapa compreendeu as análises isotópicas de amostras de água com diferentes concentrações de enriquecimento (25%, 50%, 75%, 100%) nos laboratórios de Espectrometria de Massa da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, sob supervisão do prof. Dr. Eduardo Ferrioli e Profa. Dra. Karina Pfrimer, no Laboratório de Ecologia Isotópica do Centro de Energia Nuclear na Agricultura – CENA-USP, sob supervisão do prof. Dr. Marcelo Zacharias Moreira e no Centro de Isótopos Estáveis Ambientais do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP, sob supervisão do prof. Dr. Carlos Ducatti.

Técnica da “pirólise” para mensuração do enriquecimento isotópico da água marcada com deutério e oxigênio-18 em relação às técnicas “hydra” e “laser”

Resumo

A aplicação dos isótopos estáveis em ciências nutricionais vem se destacando no meio científico em pesquisas relacionadas à composição corporal, ao gasto energético total, ao *turnover* proteico e à biodisponibilidade de nutrientes. A técnica da água duplamente marcada com deutério e oxigênio-18 possibilitou a descoberta do equilíbrio isotópico do oxigênio presente no dióxido de carbono expirado com o oxigênio presente na água corporal, tornando-se o padrão ouro na determinação do gasto energético total quando avaliado simultaneamente ao deutério.

A evolução nas pesquisas com água duplamente marcada e sua difusão nos centros de estudo ocorreu paralelamente ao desenvolvimento de vários métodos analíticos de composição isotópica em água e em outras amostras aquosas. Isso foi possível devido à modernização dos aparelhos de análise, dentre estes, dos espectrômetros de massa de razão isotópica (*Isotope Ratio Mass Spectrometers - IRMS*) que realizam a mensuração da razão isotópica da amostra e dos aparelhos de espectroscopia de infravermelho de razão isotópica (*Isotope Ratio Infrared Spectroscopy – IRIS*), que registra as características espectrais do isótopo de interesse.

Para a mensuração do enriquecimento da água e obtenção dos valores relativos do deutério ($\delta^2\text{H}$) e do oxigênio-18 ($\delta^{18}\text{O}$), em IRMS, é necessário fazer uma conversão do líquido para gás hidrogênio (H_2) e gás carbônico (CO_2), respectivamente. Inúmeros métodos de conversão, dinâmicos e estáticos estão descritos na literatura, sendo que o método estático de equilíbrio da água com o gás

H₂ e com o gás CO₂ é atualmente utilizado pelo Laboratório de Espectrometria de Massa da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / USP.

O equilíbrio da água com gás H₂ é realizado com a ajuda de um catalisador de platina que favorece a troca do deutério e do hidrogênio presentes na água com o gás hidrogênio inserido no frasco de análise. Já o método de equilíbrio da água com o gás CO₂ baseia-se meramente no processo de efetuar vácuo no recipiente de reação onde está a amostra e na adição de uma alíquota de dióxido de carbono com a ajuda de um tubo capilar. Após período de incubação a 25°C por 24 a 48 horas, o equilíbrio está completo. O gás a ser analisado (H₂ ou CO₂) é então inserido no IRMS por um sistema de fluxo contínuo de hélio (He) onde uma fonte de elétrons ioniza as moléculas gasosas e separa-as em feixes de íons, com a ajuda de campos elétrico e magnético, de acordo com a relação massa/carga. As concentrações das moléculas isotópicas de diferente massa/carga são determinadas pelas correntes elétricas geradas por estes feixes ionizados.

Um novo método de análise por IRMS está sendo implantado no Centro de Isótopos Estáveis (CIE) do Instituto de Biociências de Botucatu/SP (IBB) – UNESP. Neste método, uma reação inicialmente descrita como Reação de Unterzaucher, ocorre com a água na presença de carbono em elevada temperatura, resultando na produção de gás H₂, monóxido de carbono (CO) e algum CO₂. As amostras são injetadas, com a ajuda de gás He, em um sistema de fluxo contínuo sob alta temperatura (>1400-1450°C), numa unidade de redução denominada pirólise, que consiste num tubo com carbono vitrificado e uma camada externa de óxido de alumínio. O H₂ e o CO produzidos por um sistema on-line são separados por um cromatógrafo de gás, controlado por uma interface denominada Conflo até o IRMS,

que realiza a mensuração sequencial dos valores de $\delta^2\text{H}$ e de $\delta^{18}\text{O}$, com alta precisão e acurácia.

As técnicas de espectroscopia de infravermelho (IRIS) são, atualmente, alternativas para os IRMS devido ao baixo custo inicial, de manutenção e facilidade operacional. A técnica de espectroscopia de atenuação por cavidade (*Cavity Ring Down Spectroscopy* - CRDS) está em uso no Centro de Energia Nuclear na Agronomia (CENA) da Universidade de São Paulo (USP) em Piracicaba/SP. Basicamente, consiste de um laser pulsante que ilumina a cavidade óptica, composta de espelhos altamente refletivos, que contém o vapor de água. O desligamento abrupto do laser induz a um decaimento em tempo exponencial da luz no interior da cavidade; a intensidade do decaimento da luz é gravada e um espectro de absorção molecular para todas as espécies de moléculas é obtido simultaneamente.

A implementação de um novo método de análise de água duplamente marcada no CIE-UNESP/Botucatu torna necessária à sedimentação da metodologia de preparo e análise das amostras para que dados acurados e precisos sejam obtidos. Com este intuito, o presente projeto teve por objetivo comparar as três técnicas de preparo e mensuração do enriquecimento isotópico relativo do oxigênio-18 ($\delta^{18}\text{O}$) e do deutério ($\delta^2\text{H}$) em amostras naturais e levemente enriquecidas. Para tanto, implementou-se a metodologia do sistema de decomposição química sob alta temperatura ("pirólise"), avaliou-se as metodologias de preparo e análise em amostras de água naturais e levemente enriquecidas no $\delta^2\text{H}$ e no $\delta^{18}\text{O}$ disponíveis em dois outros centros, e avaliou-se o efeito de memória da água levemente enriquecida sobre os resultados da água de abundância natural.

Para as análises isotópicas de abundância natural foi escolhida a água de torneira, denominada água TAP, da cidade de Ribeirão Preto/SP, uma vez que esta já vem sendo utilizada como padrão interno natural no Laboratório de Espectrometria de Massa da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, portanto já tem os valores isotópicos conhecidos. A água TAP foi armazenada em 60 criotubos com capacidade de 4,5ml, os quais foram fechados hermeticamente, selados com *parafilm* e armazenados em refrigerador.

Para as amostras levemente enriquecidas, foi realizado o preparo da água duplamente marcada misturando a fonte enriquecida com ^{18}O à 10,8 átomos% com a fonte enriquecida com ^2H à 99,8 átomos%, esta mistura foi feita de acordo com técnicas pré-definidas e utilizadas pelo Laboratório de Espectrometria de Ribeirão Preto/SP-USP. O produto duplamente marcado passou por uma diluição em uma água de abundância natural (TAP) para a obtenção de uma dose diluída com 25% de concentração, com o intuito de obter a água levemente enriquecida para a análise. Também foram realizadas diluições para obtenção de concentrações de 50%, 75% e 100%, considerando as diluições que habitualmente são encontrados em estudos de gasto energético em indivíduos saudáveis. As alíquotas naturais, levemente enriquecidas (25%) e enriquecidas (50%, 75% e 100%) foram armazenadas em criotubos de 4,5 ml cada.

Cento e vinte alíquotas (60 naturais e 60 levemente enriquecidas - 25%) foram analisadas nos laboratórios participantes. Adicionalmente, 120 alíquotas de amostras de água enriquecidas à 50% 75% e 100% de concentração foram analisadas nos laboratórios da FMRP-USP e no CIE-UNESP (20 alíquotas para cada laboratório) com o objetivo de comparar as mensurações isotópicas em amostras com maior grau de concentração isotópica. O CENA-USP não realizou a

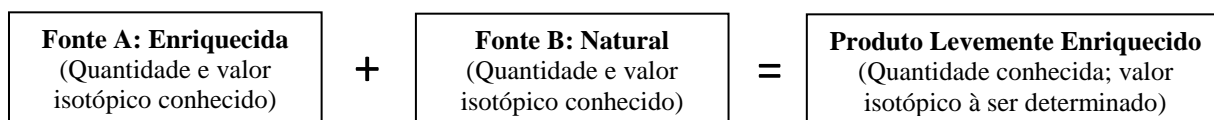
avaliação das amostras mais enriquecidas devido ao elevado risco de contaminação e efeito de memória do equipamento de análise.

1º Etapa – Equações de Balanço de Massa Isotópico

1. Teoria da Equação de Diluição Isotópica

A teoria da equação da diluição isotópica foi descrita de acordo com a literatura (CRISS, 1999) e discussões entre o grupo de pesquisa.

Para a determinação da abundância isotópica de um produto levemente enriquecido (PLE), obtido a partir da mistura de quantidades pré-definidas de fontes conhecidas (uma enriquecida e outra natural), as quais contêm elementos químicos com valores isotópicos também conhecidos, é necessário mensurar e anotar os pesos moleculares destas fontes bem como os valores isotópicos de seus elementos químicos, os quais serão utilizados nas equações de balanço de massa para melhor precisão do resultado da concentração isotópica do produto final.



Inicialmente, é necessário calcular o Peso Molecular (PM) de cada uma das fontes que irão compor o produto final.

Cálculo do PM da fonte A, enriquecida:

No cálculo do PM de um determinado elemento químico (X_1), deve-se considerar todos os isótopos estáveis que este elemento contém. A somatória dos PM dos isótopos levará ao PM do elemento químico desejado, como segue:

$$PM_{X_1} = \sum_{i=1}^n \left(\frac{ab_i}{100} \cdot m_i \right) \quad (1)$$

Onde:

PM_{X_1} = peso molecular do elemento químico X_1 , em g/mol;

n = número total de isótopos pertencentes ao elemento químico X_1 ;

i = isótopo pertencente ao elemento químico X_1 ;

ab_i = abundância isotópica de i , em átomos%, valor conhecido;

m_i = número de massa do isótopo i .

A equação 1 deve ser realizada para todos os elementos químicos que compõe a fonte A. Posteriormente determina-se o PM da fonte A:

$$PM_{FA} = PM_{X_1} + PM_{X_2} \dots \quad (2)$$

Onde:

PM_{FA} = Peso molecular da Fonte A, g/mol;

PM_{X_1} = Peso molecular do elemento químico X_1 , em g/mol;

PM_{X_2} = Peso molecular do elemento químico X_2 , em g/mol;

As equações 1 e 2 devem ser calculadas para a fonte B (natural), obtendo-se assim, o PM da fonte B.

Determinado o PM das duas fontes (A e B) que irão compor o PLE, é necessário determinar a quantidade total (gramas) do elemento químico de interesse que estará presente neste produto. Este elemento químico estará enriquecido numa das fontes (A) e ao ser misturado com a fonte (B) que o contém em abundância natural, sofrerá uma diluição isotópica.

Para este objetivo, inicia-se o cálculo a partir da determinação da quantidade deste elemento químico presente em cada uma das fontes.

Molécula da Fonte A	Átomos do Elemento X (enriquecido)
PM FA (g/mol)	PM X ₁ (g/mol)
Peso a ser misturado da fonte A (g)	Peso (g) do elemento X ₁ a ser determinado (?)

$$P_{X_1} = \frac{P_{FA} \cdot PM_{X_1}}{PM_{FA}} \quad (3)$$

Onde:

P_{X_1} = Quantidade, em gramas, do elemento químico X, presente na fonte A;

P_{FA} = Peso, em gramas, da Fonte A à ser utilizada na mistura para obtenção do produto levemente enriquecido;

PM_{X_1} = Peso molecular do elemento químico X₁, presente na fonte A, calculado na equação 1;

PM_{FA} = Peso molecular da Fonte A, calculado na equação 2.

Realizar os mesmos cálculos (equação 3) para a fonte B. Assim, determinada a quantidade (g) do elemento químico de interesse que estará presente nas duas fontes, calcula-se a quantidade deste elemento que estará no PLE.

$$P_{X_1_PLE} = P_{X_1_FA} + P_{X_1_FB} \quad (4)$$

Onde:

$P_{X_1_PLE}$ = Quantidade, em gramas, do elemento químico X₁ presente no PLE.

$P_{X_1_FA}$ = Peso, em gramas, do elemento químico X₁ presente na fonte A, calculado conforme equação 3.

$P_{X_1_{FB}}$ = Peso, em gramas, do elemento químico X_1 presente na fonte B, de acordo com a descrição da equação 3.

Depois de determinado os pesos do elemento químico de interesse (X_1) presente nas duas fontes (A e B) e no PLE, determina-se o balanço de massa isotópico, em átomos %. Este balanço de massa indicará o valor da diluição do isótopo enriquecido quando misturado ao natural que estará presente no produto final.

$$P_{X_1_{PLE}} \cdot ab_{X_1_{PLE}} = (P_{X_1_{FA}} \cdot ab_{X_1_{FA}}) + (P_{X_1_{FB}} \cdot ab_{X_1_{FB}}), \quad \text{ou seja:}$$

$$ab_{X_1_{PLE}} = \frac{(P_{X_1_{FA}} \cdot ab_{X_1_{FA}}) + (P_{X_1_{FB}} \cdot ab_{X_1_{FB}})}{P_{X_1_{PLE}}} \quad (5)$$

Onde:

$ab_{X_1_{PLE}}$ = Abundância isotópica do elemento químico X_1 , presente no PLE;

$P_{X_1_{FA}}$ = Quantidade (g), do elemento químico X_1 , presente na Fonte A;

$ab_{X_1_{FA}}$ = Abundância isotópica do elemento químico X_1 , presente na Fonte A;

$P_{X_1_{FB}}$ = Quantidade (g), do elemento químico X_1 , presente na Fonte B;

$ab_{X_1_{FB}}$ = Abundância isotópica do elemento químico X_1 , presente na Fonte B;

$P_{X_1_{PLE}}$ = Quantidade (g), do elemento químico X_1 , presente no PLE.

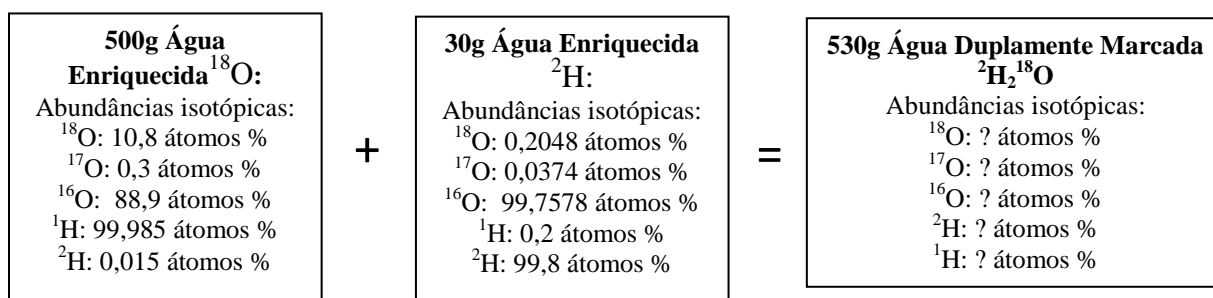
Cumprindo estas etapas obter-se-á o valor da abundância isotópica do elemento químico de interesse (enriquecido) que estará presente no PLE.

I. Equação da diluição isotópica do Deutério e Oxigênio-18 em Água Duplamente Marcada (ADM) e Determinação do Peso Molecular da ADM

Para a determinação dos valores isotópicos de deutério (^2H) e oxigênio-18 (^{18}O) presentes numa água duplamente marcada (produto final), executaram-se os passos das anteriormente descritos para cada isótopo de interesse.

Os produtos enriquecidos são produzidos por empresas especializadas em concentrações desejadas (WONG, 2003), sendo que os líquidos enriquecidos para esta pesquisa foram em concentrações de 10,8 átomos% para o ^{18}O e de 99,8 átomos% para o ^2H (FERRIOLLI, 2006).

Sabe-se que, em 1000g de água enriquecida com ^{18}O a 10,8 átomos% diluiu-se 60g de água enriquecida no ^2H a 99,8 átomos% (FERRIOLLI, 2006). Portanto, em 500g de água enriquecida com ^{18}O diluiu-se 30g de água enriquecida com ^2H . O produto final duplamente enriquecido foi de 530g. Os valores isotópicos das fontes foram disponibilizados pelas empresas que comercializaram estes produtos.



A. Para a Fonte $H_2^{18}O$ 500g

1º Cálculo do peso molecular (PM) dos isótopos de Oxigênio:

$$PM_o = \left(\frac{ab_{16O}}{100} \cdot m_{16O} \right) + \left(\frac{ab_{17O}}{100} \cdot m_{17O} \right) + \left(\frac{ab_{18O}}{100} \cdot m_{18O} \right)$$

$$PM_o = \left(\frac{88,9}{100} \cdot 16 \right) + \left(\frac{0,3}{100} \cdot 17 \right) + \left(\frac{10,8}{100} \cdot 18 \right) = 16,219g/mol$$

2º Cálculo do peso molecular (PM) dos isótopos de Hidrogênio:

$$PM_H = \left(\frac{ab_{1H}}{100} \cdot m_{1H} \right) + \left(\frac{ab_{2H}}{100} \cdot m_{2H} \right) = \left(\frac{99,985}{100} \cdot 1 \right) + \left(\frac{0,015}{100} \cdot 2 \right) = 1,00015g/mol$$

3º Cálculo do peso molecular (PM) da Fonte $H_2^{18}O$:

$$PM_{H_2^{18}O} = PM_o + PM_H = 16,219 + (2 \cdot 1,00015) = 18,2193g/mol$$

B. Para a Fonte 2H_2O 30g

1º Cálculo do peso molecular (PM) dos isótopos de Oxigênio:

$$PM_o = \left(\frac{ab_{16O}}{100} \cdot m_{16O} \right) + \left(\frac{ab_{17O}}{100} \cdot m_{17O} \right) + \left(\frac{ab_{18O}}{100} \cdot m_{18O} \right)$$

$$PM_o = \left(\frac{99,7578}{100} \cdot 16 \right) + \left(\frac{0,0374}{100} \cdot 17 \right) + \left(\frac{0,2048}{100} \cdot 18 \right) = 16,00447g/mol$$

2º Cálculo do peso molecular (PM) dos isótopos de Hidrogênio:

$$PM_H = \left(\frac{ab_{1H}}{100} \cdot m_{1H} \right) + \left(\frac{ab_{2H}}{100} \cdot m_{2H} \right) = \left(\frac{0,2}{100} \cdot 1 \right) + \left(\frac{99,8}{100} \cdot 2 \right) = 1,998 \text{ g/mol}$$

3º Cálculo do peso molecular (PM) da Fonte $H_2^{18}O$

$$PM_{2H_2O} = PM_O + PM_H = 16,00447 + (2 \cdot 1,998) = 20,00047 \text{ g/mol}$$

C. Balanço de massa para o isótopo de ^{18}O , em 530g de produto final.

Para o cálculo do balanço de massa do ^{18}O disponível em 530g do produto final da água duplamente marcada, inicialmente calculou-se a quantidade de oxigênio total presente nas duas fontes.

Molécula da Fonte $H_2^{18}O$	Átomos do Oxigênio (enriquecido)
PM $H_2^{18}O$ (g/mol)	PM O (g/mol)
500g	Peso do Oxigênio Enriquecido (P_{OE})

$$P_{OE} = \frac{500 \cdot PM_O}{PM_{H_2^{18}O}} = \frac{500 \cdot 16,219}{18,2193} = 445,105 \text{ g}$$

Molécula da Fonte 2H_2O	Átomos do Oxigênio (natural)
PM 2H_2O (g/mol)	PM O (g/mol)
30g	Peso do Oxigênio Natural (P_{ON})

$$P_{ON} = \frac{30 \cdot PM_O}{PM_{2H_2O}} = \frac{30 \cdot 16,00447}{20,00047} = 24,00614 \text{ g}$$

Determinada as quantidades (g) de oxigênio total presente nas duas fontes, calculou-se a quantidade (g) de oxigênio total na ADM (produto final).

$$P_{O_{-2}H_2^{18}O} = P_{OE} + P_{ON} = 445,105 + 24,00614 = 469,1114g$$

Sabendo as quantidades de oxigênio nas fontes e no produto final, bem como os valores isotópicos do oxigênio presente nas fontes, determinou-se o valor isotópico do ^{18}O presente na $^2H_2^{18}O$, por meio do cálculo de balanço de massa.

$$ab_{^{18}O_{-2}H_2^{18}O} = \frac{(P_{OE} \cdot ab_{^{18}O_{OE}}) + (P_{ON} \cdot ab_{^{18}O_{ON}})}{P_{O_{-2}H_2^{18}O}} = \frac{(445,105 \cdot 10,8) + (24,00614 \cdot 0,2048)}{469,1114} = 10,257804 \text{átomos\%}$$

D. Balanço de massa para o isótopo de 2H , em 530g de produto final.

Para o cálculo do balanço de massa do 2H disponível em 530g do produto final da água duplamente marcada, inicialmente calculou-se a quantidade de hidrogênio total presente nas duas fontes.

Molécula da Fonte $H_2^{18}O$	Átomos do Hidrogênio (Natural)
PM $H_2^{18}O$ (g/mol)	PM H (g/mol)
500g	Peso do Hidrogênio Enriquecido (P_{HN})

$$P_{HN} = \frac{500 \cdot PM_H}{PM_{H_2^{18}O}} = \frac{500(2 \cdot 1,00015)}{18,2193} = 54,8951g$$

Molécula da Fonte 2H_2O	Átomos do Hidrogênio (Enriquecido)
PM 2H_2O (g/mol)	PM H (g/mol)
30g	Peso do Hidrogênio Enriquecido (P_{HE})

$$P_{HE} = \frac{30 \cdot PM_H}{PM_{^2H_2O}} = \frac{30 \cdot (2 \cdot 1,998)}{20,00047} = 5,99386g$$

Determinada as quantidades (g) de hidrogênio total presente nas duas fontes, calculou-se a quantidade (g) de hidrogênio total na ADM.

$$P_{H_{-2}H_2^{18}O} = P_{HE} + P_{NN} = 5,99386 + 54,8951 = 60,88896g$$

Sabendo as quantidades de hidrogênio nas fontes e no produto final, bem como os valores isotópicos do hidrogênio presente em cada uma das fontes, determinou-se o valor isotópico do deutério presente na $^2H_2^{18}O$, por meio do cálculo de balanço de massa.

$$ab_{^2H_{-2}H_2^{18}O} = \frac{(P_{HE} \cdot ab_{HE}) + (P_{HN} \cdot ab_{HN})}{P_{H_{-2}H_2^{18}O}} = \frac{(5,99386 \cdot 99,8) + (54,8951 \cdot 0,015)}{60,88896} = 9,83765 \text{átomos\%}$$

E. Balanço de massa do isótopo 1H , em 530g de produto final:

$$ab_{^1H_{-2}H_2^{18}O} = 100 - ab_{^2H_{-2}H_2^{18}O} = 100 - 9,83765 = 90,16235 \text{átomos\%}$$

F. Balanço de massa para o isótopo de ^{17}O , em 530g de produto final.

$$ab_{^{17}O_{-2}H_2^{18}O} = \frac{(P_{OE} \cdot ab_{^{17}OE}) + (P_{ON} \cdot ab_{^{17}ON})}{P_{O_{-2}H_2^{18}O}}$$

$$ab_{^{17}O_{-2}H_2^{18}O} = \frac{(445,105 \cdot 0,3) + (24,00614 \cdot 0,0374)}{469,1114} = 0,286562 \text{átomos\%}$$

G. Balanço de massa para o isótopo de ^{16}O , em 530g de produto final.

$$ab_{^{16}\text{O}_2\text{H}_2^{18}\text{O}} = \frac{(P_{OE} \cdot ab_{^{17}\text{O}_E}) + (P_{ON} \cdot ab_{^{16}\text{O}_N})}{P_{\text{O}_2\text{H}_2^{18}\text{O}}}$$
$$ab_{^{16}\text{O}_2\text{H}_2^{18}\text{O}} = \frac{(445,105 \cdot 88,9) + (24,00614 \cdot 99,7578)}{469,1114} = 89,45563 \text{átomos\%}$$

Lembrando que o balanço de massa para o isótopo de oxigênio-18 em 530g de produto final, está no item C.

Determinação do Peso Molecular da Água Duplamente Marcada (Produto Final)

1º Cálculo do peso molecular (PM) dos isótopos de Oxigênio:

$$PM_{\text{O}} = \left(\frac{ab_{^{16}\text{O}}}{100} \cdot m_{^{16}\text{O}} \right) + \left(\frac{ab_{^{17}\text{O}}}{100} \cdot m_{^{17}\text{O}} \right) + \left(\frac{ab_{^{18}\text{O}}}{100} \cdot m_{^{18}\text{O}} \right)$$

$$PM_{\text{O}} = \left(\frac{89,45563}{100} \cdot 16 \right) + \left(\frac{0,0286562}{100} \cdot 17 \right) + \left(\frac{10,257804}{100} \cdot 18 \right) = 16,20802 \text{g/mol}$$

2º Cálculo do peso molecular (PM) dos isótopos de Hidrogênio:

$$PM_{\text{H}} = \left(\frac{ab_{^1\text{H}}}{100} \cdot m_{^1\text{H}} \right) + \left(\frac{ab_{^2\text{H}}}{100} \cdot m_{^2\text{H}} \right) = \left(\frac{90,16235}{100} \cdot 1 \right) + \left(\frac{9,83765}{100} \cdot 2 \right) = 1,0983765 \text{g/mol}$$

3º Cálculo do peso molecular (PM) da ADM:

$$PM_{ADM} = PM_O + PM_H = 16,20802 + (2 \cdot 1,0983765) = 18,404773g / mol$$

II. Determinação dos valores isotópicos e peso molecular da água natural (TAP) de Ribeirão Preto/SP.

A avaliação de uma água que contém valores de abundâncias isotópicas naturais também é adequada para a verificação da precisão e da acurácia dos Espectrômetros de Massa de Razão Isotópica (IRMS) (HORITA; KENDALL, 2004). A água de torneira (TAP) da cidade de Ribeirão Preto/SP foi selecionada para as análises de água natural, uma vez que o Laboratório de Espectrometria de Razão Isotópica da Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/SP utiliza esta água em estudos rotineiros de metabolismo energético (FERRIOLLI, 2006).

Os valores dos isótopos de ^2H (0,1512 átomos%) e de ^{18}O (0,19859 átomos%) que compõe a água de Ribeirão Preto/SP são conhecidos (FERRIOLLI, 2006), no entanto, os valores dos isótopos de ^{17}O e ^{16}O foram determinados a partir do fator de empobrecimento destes na molécula de água, para assim, serem utilizados nas equações de PM da água natural e de balanço de massa da dose diluída de ADM.

Fator de Empobrecimento (FE) do ^{18}O da água TAP, em relação à água da natureza (Nat), com valores conhecidos.

$$FE = \frac{{}^{18}\text{O}_{TAP}}{{}^{18}\text{O}_{Nat}} = \frac{0,19859}{0,2048} = 0,9696777$$

$$ab^{17}O_{TAP} = FE \cdot ab^{17}O_{Nat} = 0,9696777 \cdot 0,0374 = 0,0362659 \text{ átomos\%}$$

$$ab^{16}O_{TAP} = 100 - ab^{17}O_{TAP} + ab^{18}O_{TAP} = 100 - 0,0362659 + 0,19859 = 99,76515 \text{ átomos\%}$$

Cálculo do Peso Molecular da Água TAP de Ribeirão Preto/SP:

1º Cálculo do peso molecular (PM) dos isótopos de Oxigênio:

$$PM_o = \left(\frac{ab_{16O}}{100} \cdot m_{16O} \right) + \left(\frac{ab_{17O}}{100} \cdot m_{17O} \right) + \left(\frac{ab_{18O}}{100} \cdot m_{18O} \right)$$

$$PM_o = \left(\frac{99,76515}{100} \cdot 16 \right) + \left(\frac{0,0362659}{100} \cdot 17 \right) + \left(\frac{0,19859}{100} \cdot 18 \right) = 16,004334 \text{ g / mol}$$

2º Cálculo do peso molecular (PM) dos isótopos de Hidrogênio:

$$PM_H = \left(\frac{ab_{1H}}{100} \cdot m_{1H} \right) + \left(\frac{ab_{2H}}{100} \cdot m_{2H} \right) = \left(\frac{99,8488}{100} \cdot 1 \right) + \left(\frac{0,1512}{100} \cdot 2 \right) = 1,0001512 \text{ g / mol}$$

3º Cálculo do peso molecular (PM) da água TAP:

$$PM_{TAP} = PM_o + PM_H = 16,004334 + (2 \cdot 1,0001512) = 18,004636 \text{ g / mol}$$

i. Determinação do valor isotópico da dose diluída em 25% de enriquecimento (Levemente Enriquecida)

A obtenção de uma dose de ADM diluída numa água com abundância isotópica natural é necessária para uma adequada mensuração nos IRMS, uma vez que a mensuração do produto final duplamente marcado, produzido pela mistura dos dois isótopos, pode levar à saturação da máquina devido aos valores elevados de concentração isotópica presentes do produto final da mistura (KERSTEL, 2009; THORSEN et al. 2011). A diluição de uma alíquota em água natural proporcional à diluição de uma dose de ADM ao compartimento aquoso humano permite obter valores de diluições isotópicas semelhantes aos encontrados em pesquisas de metabolismo energético.

Em estudos de gasto energético humano, uma dose de ADM é calculada com base na água corporal total de um indivíduo, considerando que essa dose pré-determinada será diluída em todo esse compartimento aquoso, que constitui a massa magra (INTERNATIONAL DIETARY ENERGY CONSULTANCY GROUP, 1990, SPEAKMAN, 1997; WONG, 2003; FERRIOLLI, 2006). Partindo dessa afirmativa, calculou-se uma dose fictícia de água duplamente marcada considerando um indivíduo de peso total de 70kg, sendo 50% deste peso composto pela água corporal total, ou seja, 35kg do peso total. A dose de ^{18}O a 10,8 átomos % é estabelecida em 2g/kg de água corporal, e a dose de ^2H a 99,8 átomos% é de 0,12g/kg de água corporal total (SPEAKMAN, 1997; WONG, 2003; FERRIOLLI, 2006).

$$\text{Dose de } ^{18}\text{O} = (2\text{g/kg}) \cdot 35\text{kg} = 70\text{g}$$

$$\text{Dose de } ^2\text{H} = (0,12\text{g/kg}) \cdot 35\text{kg} = 4,2\text{g}$$

$$\text{Dose de } ^2\text{H}_2^{18}\text{O} = 74,2\text{g para indivíduo com 35kg de água corporal total.}$$

Sabendo o quanto de dose deve ser diluída em 35kg de água, é possível calcular alíquotas menores de água duplamente marcada à serem diluídas em apenas 100g de água total, recriando assim, o ambiente de diluição relativo ao compartimento corporal humano.

Considerando uma diluição em 25% de ADM para 100g de água natural (TAP) em relação à diluição de uma dose para um indivíduo com 35kg de água corporal, foi determinada a alíquota a ser diluído na água TAP de Ribeirão Preto/SP, produzindo desta forma uma dose diluída levemente enriquecida, que será analisada nos três laboratórios participantes da pesquisa.

A água TAP na qual a alíquota foi diluída foi mensurada para obtenção do peso real da quantidade desta água. A alíquota pré-definida foi pipetada e posteriormente pesada para obtenção da quantidade real desta. Considerou-se adequada uma variação de $\pm 10\%$ do valor calculado da água TAP ($100g \pm 10\%$) e da alíquota ($X g \pm 10\%$) da dose de ADM.

Determinação da alíquota para uma dose diluída em 100%:

Dose / Alíquota	Água para diluição
Dose Fictícia indivíduo: 74,2g	35000g
Alíquota para dose diluída (A_{DD}) 100%: X	100g

$$A_{DD} = \frac{100 \cdot 74,2}{35000} = 0,212g \pm 10\%$$

Determinação da alíquota para uma dose diluída em 25%:

Alíquota (g)	Porcentagem de Diluição
A_{DD} 100%: 0,212g	100g
A_{DD} 25%: X	25g

$$A_{DD} = \frac{25 \cdot 0,212}{100} = 0,053g \pm 10\%$$

Os valores isotópicos de ^2H e ^{18}O que estarão presente na dose diluída em 25% foram calculados de acordo com as equações de balanço de massa para cada um dos isótopos enriquecidos. Para tanto, considerou-se os valores isotópicos de ^2H e ^{18}O presentes no produto final (ADM) e na água TAP de Ribeirão Preto/SP, a qual foi utilizada para a diluição da alíquota.

Os valores isotópicos de ambas as fontes para a produção da dose diluída são conhecidos (pré-determinados) e utilizados para a determinação do PM de cada fonte e produto final (Dose Diluída em 25%):

<p style="text-align: center;">A_{DD} ADM</p> <p>PM: 18,404773g/mol</p> <p>Abundâncias isotópicas:</p> <p>^{18}O: 10,257804 átomos %</p> <p>^{17}O: 0,286562 átomos %</p> <p>^{16}O: 89,455639 átomos %</p> <p>^1H: 90,16235 átomos %</p> <p>^2H: 9,83765 átomos %</p>	+	<p style="text-align: center;">Água TAP</p> <p>PM: 18,004636g/mol</p> <p>Abundâncias isotópicas:</p> <p>^{18}O: 0,19859 átomos %</p> <p>^{17}O: 0,0362659 átomos %</p> <p>^{16}O: 99,76515 átomos %</p> <p>^1H: 0,1512 átomos %</p> <p>^2H: 99,8488 átomos %</p>	=	<p style="text-align: center;">Dose Diluída 25%</p> <p style="text-align: center;">Abundâncias isotópicas:</p> <p style="text-align: center;">^{18}O: ? átomos %</p> <p style="text-align: center;">^2H: ? átomos %</p>
---	---	---	---	--

Para a obtenção de valores de concentração isotópicas próximos aos que serão encontrados nas máquinas de IRMS, as quantidades da alíquota de ADM à ser diluída, da água TAP e da Dose Diluída em 25% foram pesadas em balança de precisão para serem utilizadas nas equações de balanço de massa, cujo os valores são:

$$\text{Alíquota } ^2\text{H}_2^{18}\text{O}: 0,0527\text{g} \quad \text{TAP}: 99,6386\text{g}$$

$$\text{Dose diluída em 25\%} = \text{Alíquota } ^2\text{H}_2^{18}\text{O} + \text{TAP} = 99,6913\text{g}$$

A. Balanço de Massa para determinação da concentração isotópica do ^{18}O na dose diluída em 25%:

Alíquota $^2\text{H}_2^{18}\text{O}$	
Molécula $^2\text{H}_2^{18}\text{O}$	Átomos de Oxigênio
PM $^2\text{H}_2^{18}\text{O}$: 18,404773g/mol A_{DD} 25%: 0,0527g	PM O_E : 16,20802 g/mol O_E (Oxigênio Enriquecido)

$$O_E = \frac{A_{DD} \cdot PM_{OE}}{PM_{^2H_2^{18}O}} = \frac{0,0527 \cdot 16,20802}{18,404773} = 0,0464098\text{g}$$

Água TAP	
Molécula H_2O	Átomos de Oxigênio
PM TAP : 18,004636g/mol TAP: 99,6386g	PM O_N : 16,004334 g/mol O_N (Oxigênio Natural)

$$O_N = \frac{TAP \cdot PM_{ON}}{PM_{TAP}} = \frac{99,6386 \cdot 16,004334}{18,004636} = 88,568821\text{g}$$

Peso total do Oxigênio na Dose Diluída em 25%:

$$O_T = O_E + O_N = 0,0464098 + 88,568821 = 88,61523\text{g}$$

Balanço de Massa para ^{18}O na Dose Diluída à 25%:

$$ab_{^{18}\text{O}_{DD25\%}} = \frac{(P_{OE} \cdot ab_{^{18}\text{O}_{OE}}) + (P_{ON} \cdot ab_{^{18}\text{O}_{ON}})}{O_T} = \frac{(0,0464098 \cdot 10,257804) + (88,568821 \cdot 0,19859)}{88,61523}$$

$$ab_{^{18}\text{O}_{DD25\%}} = 0,2038482 \text{ átomos\%}$$

B. Balanço de Massa para determinação da concentração isotópica do ^2H na dose diluída em 25%:

Alíquota $^2\text{H}_2^{18}\text{O}$	
Molécula $^2\text{H}_2^{18}\text{O}$	Átomos de Hidrogênio
PM $^2\text{H}_2^{18}\text{O}$: 18,404773g/mol A_{DD} 25%: 0,0527g	PM H_E : 1,0983765 g/mol H_E (Hidrogênio Enriquecido)

$$H_E = \frac{A_{DD} \cdot PM_{HE}}{PM_{^2H_2^{18}O}} = \frac{0,0527(2 \cdot 1,0983765)}{18,404773} = 0,0062901\text{g}$$

Água TAP	
Molécula H_2O	Átomos de Hidrogênio
PM TAP : 18,004636g/mol TAP: 99,6386g	PM H_N : 1,0001512 g/mol H_N (Oxigênio Natural)

$$H_N = \frac{TAP \cdot PM_{HN}}{PM_{TAP}} = \frac{99,6386(2 \cdot 1,0001512)}{18,004636} = 11,069778\text{g}$$

Peso total do Hidrogênio na Dose Diluída em 25%:

$$H_T = H_E + H_N = 0,0062901 + 11,069778 = 11,076068\text{g}$$

Balanço de Massa para ^2H na Dose Diluída à 25%:

$$ab_{^2H_DD25\%} = \frac{(P_{HE} \cdot ab_{HE}) + (P_{HN} \cdot ab_{HN})}{H_T} = \frac{(0,0062901 \cdot 9,83765) + (11,069788 \cdot 0,01512)}{11,076068}$$

$$ab_{^2H_DD25\%} = 0,0206982\text{átomos\%}$$

2º Etapa: Padronização da técnica no Centro de Isótopos Estáveis – CIE-IBB/UNESP.

1. Implantação da metodologia do sistema de decomposição química sob alta temperatura (“pirólise”) para mensuração do enriquecimento isotópico relativo do ^2H e do ^{18}O .

O espectrômetro de massa de razão isotópica (IRMS) modelo Delta V Advantage, acoplado a um analisador elementar de modelo *Thermo Chemical Elemental Analyzer* (TC/EA) - Flash 2000 HT com auto-amostrador para amostras líquidas modelo AI/AS 3000II, todos da marca *Thermo Scientific®*, foram submetidos aos ajustes técnicos para a implantação do método da pirólise para amostras líquidas no Centro de Isótopos Estáveis do IBB-UNESP. Estes ajustes foram referentes à operacionalização do auto-amostrador para amostras líquidas, pois até então eram realizadas apenas análises de amostras sólidas nos equipamentos do laboratório; padronização do preparo das amostras nos vial de análise do auto-amostrador (determinação da quantidade à ser distribuída nos vial (2ml) e analisada(0,2 μL) pelo equipamento); análises de amostras de água com valores isotópicos conhecidos (padrões internos de laboratório) para o refinamento e ajuste das análises.

Realizados os ajustes e implantada a metodologia da pirólise, as amostras de água natural e enriquecidas foram analisadas com o objetivo de comparação de dados entre os laboratórios e avaliação do efeito de memória, informações descritas a seguir.

2. Metodologias de preparo e análise em amostras naturais e levemente enriquecidas no $\delta^2\text{H}$ e no $\delta^{18}\text{O}$.

a. Laboratório de Espectrometria de Massa da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP-USP – Técnica HYDRA

As amostras de água natural e levemente enriquecida foram pipetadas em triplicatas de 300 μl em tubos de análise de gases para IRMS-ANCA. Também foram realizadas pipetagens de águas padrões do laboratório, as quais contêm concentração natural (TAP) e enriquecida (HIGH) dos isótopos de oxigênio e deutério. As análises das amostras foram realizadas em triplicada, sendo que as amostras foram acomodadas no auto-amostrador de forma alternada em relação as concentrações isotópicas, iniciando com as amostras padrões, seguida de amostras menos concentradas às mais concentradas isotopicamente, intercalando-as com amostras padrões do laboratório para controle do efeito de memória da máquina e possíveis correções de valores.

Para a análise do $\delta^{18}\text{O}$ foi realizado um comando no software do ANCA-IRMS para a inserção do gás CO_2 à 3%, com valor isotópico conhecido, com o objetivo de equilibrar o ^{18}O das amostras de água com o oxigênio do gás inserido. O tempo de injeção do gás CO_2 para cada amostra é de 75 segundos, sendo aguardadas 24 horas para o equilíbrio total dos átomos e posterior análise. A análise do ^{18}O nas amostras é realizada no IRMS no período de 6 minutos por amostra.

Para a análise do $\delta^2\text{H}$ foram colocados os bastões de platina em cada uma das amostras de água e padrões de laboratório, sendo descartadas as tampas utilizadas na análise do ^{18}O e colocadas tampas novas para a mensuração do deutério. Foi realizada a inserção do gás Hidrogênio à 100%, com o objetivo de equilibrar o

deutério (^2H) das amostras de água com o hidrogênio do gás inserido. O tempo de injeção do gás H para cada amostra é de 75 segundos, sendo aguardado o mínimo de 8 horas para o equilíbrio total dos átomos e posterior análise. A análise do ^2H é realizada no IRMS no período de 2,5 a 3 minutos por amostra.

Os dados amostrais foram expressos em planilha do Excel[®]. Nesta foi calculado o valor médio das triplicatas amostrais bem como o desvio padrão (DP) dos valores obtidos. A análise dos dados foi considerada adequada quando os valores de DP das triplicatas foram menores que 0,5‰ para o $\delta^{18}\text{O}$ e menores que 5,0‰ para o $\delta^2\text{H}$.

b. Laboratório de Ecologia Isotópica do Centro de Energia Nuclear na Agricultura – CENA-USP – Técnica Laser

As amostras de água natural, levemente enriquecidas foram pipetadas em *vial* na quantidade de 1ml e analisadas em triplicata no *Isotope Ratio Infrared Spectroscopic* – IRIS. As amostras padrões interno do laboratório do CENA-USP e da FMRP-USP foram pipetadas e analisadas para controle e correção dos valores isotópicos das amostras. As análises de água natural e levemente enriquecida (25%) foram realizadas em corridas separadas, realizando no início e no final das corridas as análises das amostras de padrões de laboratório com valores conhecidos para controle do efeito de memória e possíveis correções.

As análises isotópicas pelo processo IRIS não necessita de equilíbrio com gases para serem mensuradas, como visto para o processo HYDRA da FMRP-USP. Alíquotas de 0,75 μL das amostras líquidas foram coletadas por uma seringa de 1,2 μL da marca Hamilton[®] (modelo 7701.2N) e injetadas por um sistema automático e

imediatamente aquecidas a 80°C para evaporação à vácuo e posterior análise isotópica por absorvância à laser.

As análises das razões isotópicas de $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ e de $^2\text{H}/^1\text{H}$ foram realizadas simultaneamente pelo equipamento, por um período de 4,5 minutos para cada injeção de amostra. As amostras foram analisadas em 6 repetições com o objetivo de avaliar possíveis efeitos de memória nos resultados iniciais e descartá-los, caso necessário. Os resultados, analisados em Delta-Snow (δ), foram expressos em planilha do Excel[®]. Nesta foi calculado o valor médio das repetições amostrais válidas bem como o desvio padrão (DP) dos valores obtidos. A análise dos dados foi considerada adequada quando os valores de DP das triplicatas foram menores que 0,3‰ para o $\delta^{18}\text{O}$ e menores que 2,0‰ para o $\delta^2\text{H}$.

c. Centro de Isótopos Estáveis – CIE-IBB/UNESP – Técnica Pirólise.

As amostras de água natural e levemente enriquecidas foram pipetadas em *vial* na quantidade de 2ml e analisadas em duplicata no IRMS *Delta V Advantage*. As amostras padrões do laboratório do CENA-USP e FMRP-USP também foram pipetadas e analisadas em duplicata para controle e correção dos valores isotópicos das amostras. As análises de água natural e levemente enriquecidas foram realizadas em corridas separadas, com análises das amostras dos padrões dos laboratórios no início e no final de cada corrida, para controle do efeito de memória e possíveis correções.

As análises isotópicas pelo método da pirólise também não necessitam de equilíbrio com gases para serem mensuradas. Alíquotas de 0,2µL das amostras líquidas foram coletadas por uma seringa de 0,5µL da marca *Thermo Scientific*[®] e injetadas por um sistema automático numa unidade de redução na qual foram

imediatamente aquecidas a 1400°C, produzindo H₂ e CO que foram analisados isotopicamente.

As análises das razões isotópicas de ¹⁸O/¹⁶O e de ²H/¹H foram realizadas simultaneamente pelo IRMS, por um período de 7,5 minutos para cada injeção de amostra. Os resultados, analisados em Delta-Snow (δ), foram expressos em planilha do Excel[®]. Nesta foi calculado o valor médio das duplicatas amostrais bem como o desvio padrão (DP) dos valores obtidos. A análise dos dados foi considerada adequada quando os valores de DP das duplicatas foram menores que 0,5‰ para o δ¹⁸O e menores que 2,0‰ para o δ²H.

3. Avaliação do efeito de memória da água enriquecida com δ²H e com δ¹⁸O sobre os resultados da água de abundância natural de valor isotópico conhecido.

a. CIE-IBB/UNESP – Técnica Pirólise.

O efeito de memória no IRMS do CIE-UNESP foi avaliado a partir da análise de amostras padrões de laboratório com valores isotópicos conhecidos e diferentes entre si, as quais foram cedidas gentilmente pelo prof. Marcelo Moreira responsável pela condução das análises desta pesquisa no laboratório do CENA-USP e prof. Eduardo Ferrioli responsável pela condução das análises desta pesquisa no laboratório da FMRP-USP (Tabela 1). As amostras CENA 1 (CENA-USP) e TAP (FMRP-USP) são amostras de água conhecidas como padrões internos de laboratórios, já as amostras HAD, MAST e PES são padrões de águas internacionais, os quais têm seus valores isotópicos reconhecidos e são

comercializados com o intuito de avaliação da precisão e acurácia de métodos e padronização das análises.

Tabela 1. Valores isotópicos conhecidos das amostras de águas padrões dos laboratórios utilizadas na avaliação do efeito de memória do equipamento.

Águas Padrões	$\delta^2\text{H}$	$\delta^{18}\text{O}$
	Média \pm DP	Média \pm DP
CENA 1*	-46,6	-7,01
HAD**	-59,9 \pm 1,0	-8,72 \pm 0,1
MAST**	+1,1 \pm 1,0	+3,01 \pm 0,1
PES**	-321,9 \pm 1,0	-40,94 \pm 0,1
TAP*	-29,1 \pm 5,0	-7,68 \pm 1,0

* CENA 1 e TAP, padrões internos dos laboratórios do CENA-USP e da FMRP-USP.

** HAD, MAST, PES: Padrões internacionais cedidos pela Agência Internacional de Energia Atômica ao CENA-USP

Para verificar o efeito de memória a partir de águas padrões, foram realizadas análises isotópicas das amostras, mensuradas seis vezes para CENA 1, HAD, MAST, PES, vinte vezes para TAP e quatro vezes, novamente, para CENA 1, PMG, HAD, MAST, PES.

Tanto os dados das mensurações isotópicas dos $\delta^{18}\text{O}$ (Figura 1) quanto dos $\delta^2\text{H}$ (Figura 2), nos padrões de água, evidenciaram que existe um possível efeito de memória nos primeiros resultados das análises das amostras que foram feitas posteriormente as análises das mais enriquecidas e/ou empobrecidas isotopicamente.

Os três resultados iniciais das análises de $\delta^{18}\text{O}$ (Figura 1) e de $\delta^2\text{H}$ (Figura 2) das amostras se deslocaram em direção aos valores isotópicos das análises

anteriores, evidenciando o possível efeito de memória dos isótopos analisados anteriormente. Este efeito é fortemente evidenciado para as amostras PES e TAP, que foram analisadas após amostras muito enriquecidas (MAST) e/ou empobrecidas (PES) em relação aos seus valores, assinalados com círculos nas figuras 1 e 2.

Os resultados mostram que existe a necessidade de, ao se trabalhar com amostras de águas com variados graus de enriquecimento isotópico, é necessário realizar ao menos 6 análises de cada amostra e descartar as 3 primeiras, ou fazer uma “lavagem” do sistema de inserção (seringa) e queima (forno) das amostras com água bidestilada e posteriormente realizar as análises das amostras, descartando as análises iniciais e obtendo assim, valores fidedignos, anulando o efeito de memória.

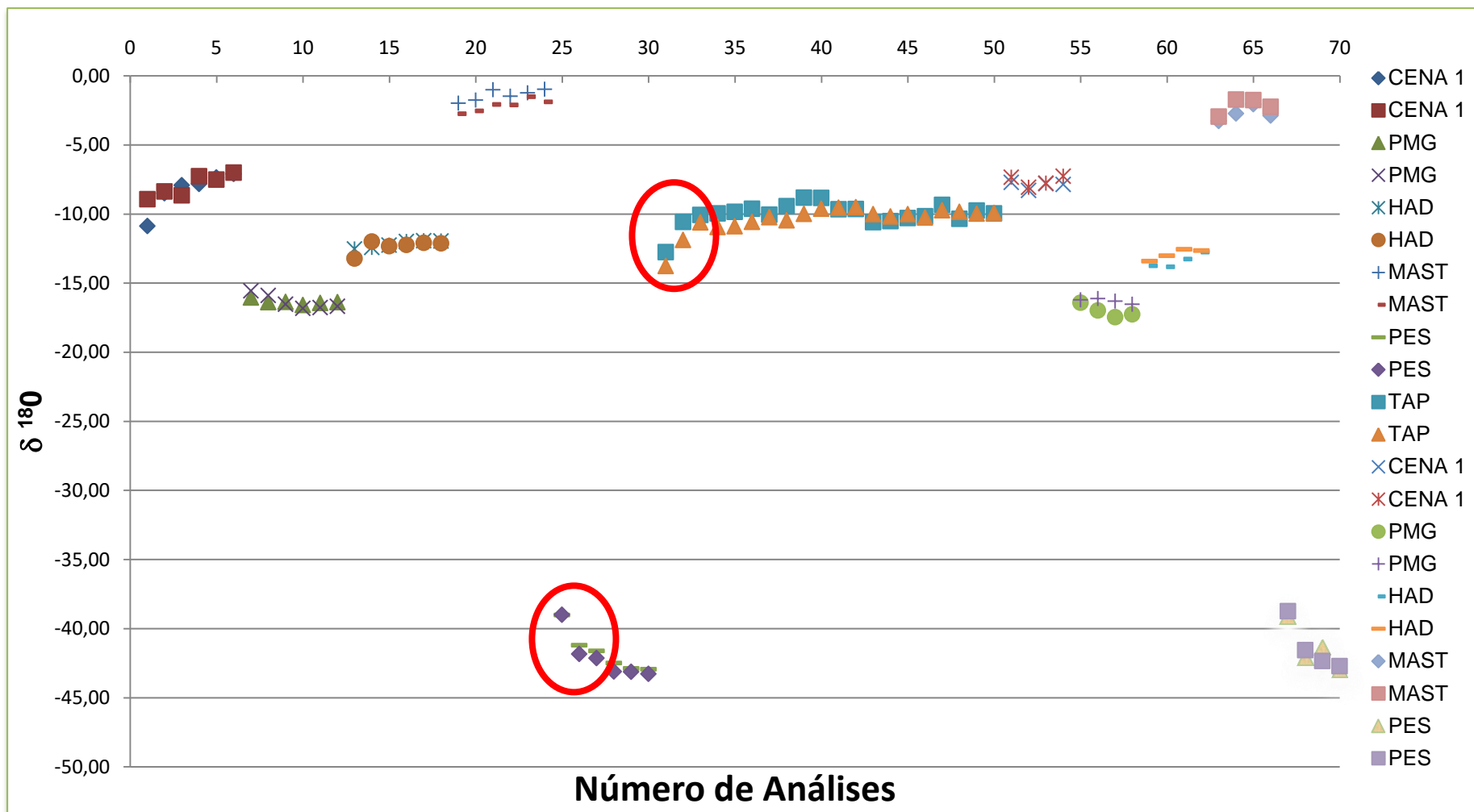


Figura 1. Resultados das análises de $\delta^{18}\text{O}$ nas amostras padrões de laboratório.

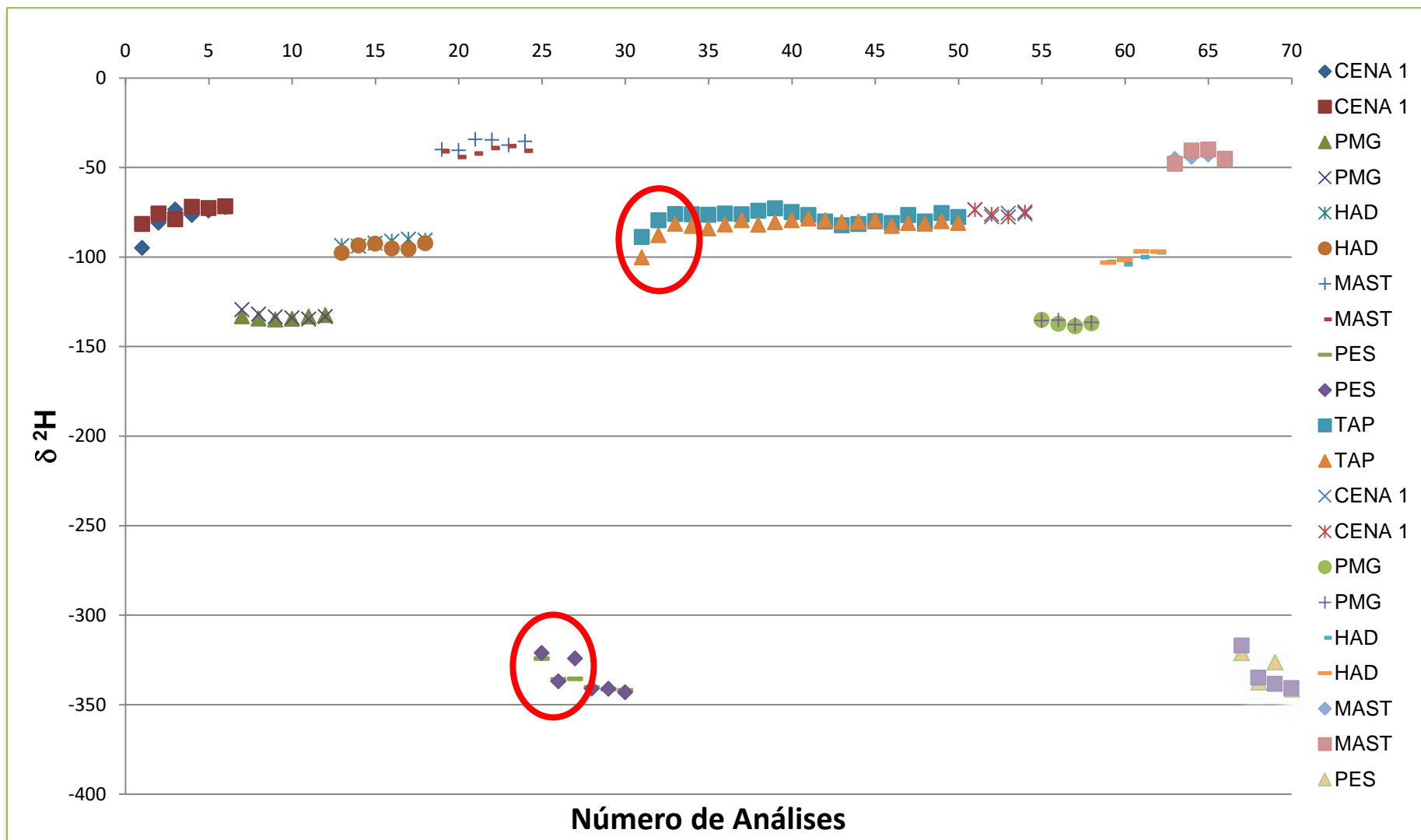


Figura 2. Resultados das análises de $\delta^2\text{H}$ nas amostras padrões de laboratório.

b. CENA-USP – Técnica Laser.

O efeito de memória no IRIS do laboratório de ecologia isotópica do CENA-USP foi avaliado durante as análises de água com 25% de enriquecimento, o que também permitiu que os resultados fossem corrigidos dentro de uma escala de valores conhecidos para os isótopos deutério e oxigênio analisados durante o procedimento.

A disposição dos *vial* no autoamostrador foi iniciada com 3 *vial* de 5 padrões do laboratório, seguido dos *vial* das alíquotas da mesma concentração isotópica (natural ou com diferentes graus de enriquecimento) e finalizando com os grupos de padrões do laboratório. O efeito de memória foi verificado nos resultados das análises das águas padrões do laboratório, que se apresentaram com valores diferentes dos valores conhecidos quando analisadas posteriormente as amostras enriquecidas. A evidência do efeito de memória sinalizou a necessidade de “lavagem” da seringa de injeção das amostras no IRIS de 3 a 6 vezes, com água bidestilada ou, a análise da amostra em pelo menos 6 vezes, descartando os três primeiros valores obtidos.

c. FMRP-USP – Técnica HYDRA.

O efeito de memória no IRMS do laboratório de espectrometria de massa da FMRP-USP não foi avaliado nesta pesquisa, uma vez que este laboratório já trabalha rotineiramente com análises de água com elevado grau de concentração isotópica e realizaram, no início da implantação da técnica, as mensurações necessárias para adequação das análises, como descrito na tese de livre docência do supervisor do laboratório, prof. Eduardo Ferriolli (FERRIOLLI, 2006).

4. Comparação dos valores isotópicos relativos de $\delta^2\text{H}$ e de $\delta^{18}\text{O}$ em amostras naturais e levemente enriquecidas dos três laboratórios participantes.

Com o objetivo de correção das diferenças de leitura nas análises das amostras de água mensuradas nos 3 laboratórios, foi realizado um ajuste matemático dos valores obtidos, normalizando-os em relação aos valores das águas padrões (TAP e HIGH). Esta normalização é necessária devido ao aumento ou diminuição da escala da razão isotópica associada aos procedimentos de preparo e análise dos diferentes laboratórios. A partir da normalização obteve-se resultados dentro de uma mesma escala per mil, possibilitando a comparação dos valores entre os laboratórios.

Descrição da equação [1]:

$$VCor_{i_a} = \left[\frac{VC_{i_HIGH} - VC_{i_TAP}}{MedVO_{i_HIGH} - MedVO_{i_TAP}} \times (VO_{i_a} - MedVO_{i_TAP}) \right] + VC_{i_TAP}$$

Onde:

$VCor_{i_a}$ = Valor Corrigido do Isótopo analisado na Amostra.

VC_{i_HIGH} = Valor Conhecido do isótopo no padrão HIGH.

VC_{i_TAP} = Valor Conhecido do isótopo no padrão TAP.

$MedVO_{i_HIGH}$ = Média do Valor Obtido do Isótopo analisado na amostra HIGH.

$MedVO_{i_TAP}$ = Média do Valor Obtido do Isótopo analisado na amostra TAP.

VO_{i_a} = Valor Obtido do Isótopo analisado na Amostra.

Sendo que, o valor conhecido do $\delta^2\text{H}$ para TAP = -29,1‰ e para HIGH = 1677‰.

E o valor conhecido do $\delta^{18}\text{O}$ para TAP = -7,68‰ e para HIGH = - 47,97‰.

5. Resultados e conclusão

Os dados de cada laboratório foram verificados quanto à distribuição da normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Os resultados destas análises foram testadas por ANOVA seguida do teste TUKEY, quando necessário, ou Teste T-*student*. As médias dos resultados obtidos nas análises dos três laboratórios foram descritos nas tabelas 2 e 3, para deutério e oxigênio-18, respectivamente. Para melhor visualização dos dados, estas médias foram distribuídas nos gráficos 1 e 2, para deutério e oxigênio-18, respectivamente.

Na comparação das análises de deutério verificamos que houve diferença significativa entre os resultados ($p < 0,05$) dos 3 laboratórios em cada uma das diferentes concentrações deste isótopo (Tabela 2). Os desvios-padrões das análises de cada laboratório variaram de acordo com a concentração do isótopo, uma vez que, quanto maior o enriquecimento isotópico, maior o desvio padrão dos resultados. Considerando que os valores são descritos em delta per mil, $5\text{‰} = 0,005$ da variação do deutério, essa variação é considerada aceitável por alguns pesquisadores quando em amostras com alto grau de enriquecimento neste isótopo. No entanto, nas análises de amostras com variação isotópica natural, o desvio-padrão $< 2\text{‰}$ é considerada ideal (AHMAD; et al. 2012).

Essa diferença entre os valores de delta de deutério nos levou a buscar respostas quanto a mensuração deste e a comparação inter-laboratórios para este isótopo. Em estudo publicado por Wong e colaboradores (1993), o qual avaliou os resultados de análises de 2 amostras de água enriquecidas no deutério consideradas padrões internacionais, em 23 laboratórios, evidenciou-se o desvio-padrão de $\pm 4,7\text{‰}$ a $\pm 13,5\text{‰}$ nas análises das amostras com menor ($\bar{x} = 506,17\text{‰}$) e

maior grau (\bar{x} = 992,3‰) de enriquecimento, respectivamente, entre os laboratórios, após serem excluídos os valores *outliers*. Adicionalmente, os laboratórios que realizaram mensurações das amostras em duplicatas ou mais análises, mostraram desvio-padrão dos resultados variando entre $\pm 0,4\%$ a $\pm 3,9\%$ para o menor grau de enriquecimento e de $\pm 1,2\%$ a $\pm 14,7\%$ para o maior grau. Explicando as variações nos resultados, os autores citaram as diferenças analíticas entre as técnicas dos laboratórios participantes que podem ter levado a essa variação nos resultados obtidos. Nos resultados desta pesquisa, evidenciamos o desvio padrão entre os laboratórios para os diferentes graus de enriquecimento isotópico em deutério variando entre 7,8‰ a 11,2‰.

De acordo com relato oral da técnica do laboratório da FMRP-USP, as análises de deutério no IRMS-ANCA têm melhores resultados após análises sucessivas deste isótopo, quando ocorre a diminuição dos desvios-padrões das repetições das análises, no entanto, as análises de deutério nas amostras de água natural e levemente enriquecidas desta pesquisa ocorreram logo após a conversão do equipamento que estava analisando o oxigênio-18 das amostras.

Observando o gráfico com a reta de enriquecimento das amostras de água para os 3 laboratórios verificamos que existe uma linearidade na leitura dos dados, podendo ser utilizadas equações matemáticas que corrijam os valores do laboratório no qual queira se fazer as análises e repetir em outro local. Evitando os vieses da leitura dos equipamentos.

Os resultados de oxigênio-18 foram mais precisos em relação às análises intra laboratórios ($\pm 0,18\%$ a $\pm 0,60\%$) e acurados nas análises inter-laboratórios ($\pm 0,29\%$ a $\pm 1,04\%$), apresentando os menores valores de desvio padrão em comparação aos resultados intra e inter-laboratórios para deutério.

Os resultados das análises do CENA-USP, tanto para as amostras naturais quanto para as amostras com 25% de concentração dos isótopos apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) em relação aos resultados da FMRP-USP e CIE-UNESP, estes últimos já não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) entre os resultados das amostras naturais e das com diferentes graus de enriquecimento (Tabela 3).

Evidenciada na revisão de literatura, o desvio padrão de análises de oxigênio-18 em amostras naturais é adequado quando abaixo de $\pm 0,2\text{‰}$, no entanto, quando analisadas em amostras enriquecidas, é aceitável a variação de $\pm 2\text{‰}$ (WASSENAAR; et al. 2012; WONG; et al. 1993).

Tabela 2. Comparação dos valores de $\delta^2\text{H}$ entre os laboratórios participantes.

		FMRP- USP ¹ ($\delta^{\text{‰}}$)	CIE- UNESP ² ($\delta^{\text{‰}}$)	CENA- USP ^{3*} ($\delta^{\text{‰}}$)	Desvio Padrão inter- laboratórios ($\delta^{\text{‰}}$)	
Análise de Deutério	Amostras Naturais	Média	-33,89 ^a	-54,04 ^b	-45,11 ^c	7,8
		DP	4,19	1,09	0,40	
		Mediana	-34,48	-54,52	-45,18	
		1º Quartil	-37,90	-54,65	-45,42	
		3º Quartil	-30,36	-53,37	-44,90	
		p*	< 0,001			
	Amostras Levemente Enriquecidas 25%	Média	138,20 ^a	113,47 ^b	127,32 ^c	9,5
		DP	5,91	1,57	0,59	
		Mediana	137,40	113,87	127,32	
		1º Quartil	133,84	112,37	126,85	
		3º Quartil	142,88	114,74	127,93	
		p*	< 0,001			
	Amostras Enriquecidas 50%	Média	310,57	293,18	-	9,0
		DP	4,21	1,63	-	
		Mediana	311,38	293,11	-	
		1º Quartil	309,69	291,80	-	
		3º Quartil	313,50	294,63	-	
		p**	< 0,001			
	Amostras Enriquecidas 75%	Média	488,08	470,68	-	11,2
		DP	8,47	5,46	-	
		Mediana	489,39	469,80	-	
		1º Quartil	482,64	466,61	-	
		3º Quartil	494,96	475,50	-	
		p***	< 0,001			
Amostras Enriquecidas 100%	Média	657,14	639,75	-	10,5	
	DP	5,75	4,12	-		
	Mediana	658,68	641,15	-		
	1º Quartil	653,94	635,74	-		
	3º Quartil	661,34	643,26	-		
	p**	< 0,001				

* O laboratório do CENA-USP se dispôs a analisar apenas as amostras naturais e enriquecidas a 25%. p* = ANOVA Médias seguidas da mesma, letra na linha, não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste TUKEY. p** = Teste T "Student" 1= Técnica Hydra; 2= Técnica da Pirólise; 3= Técnica à Laser.

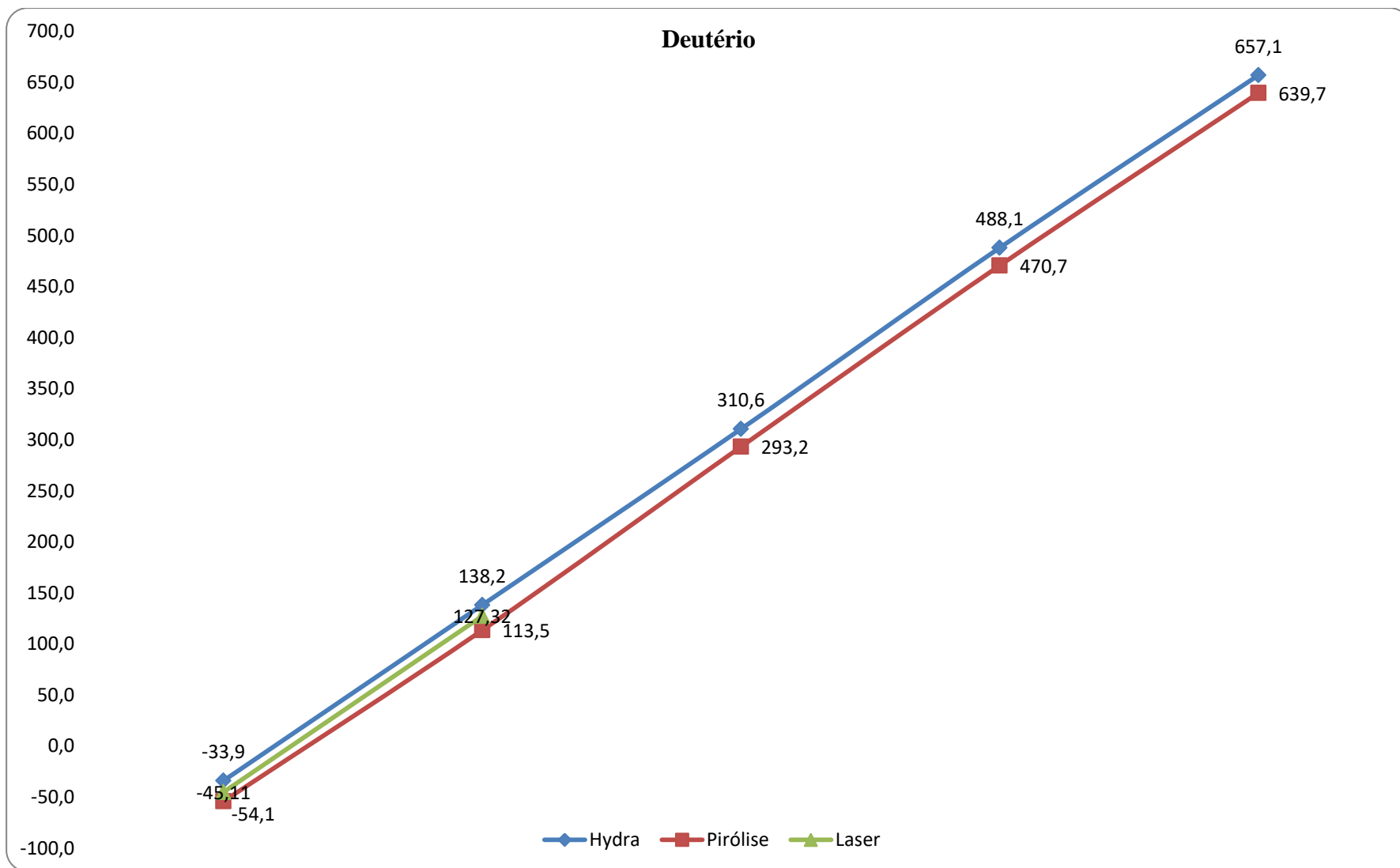


Figura 3. Gráfico para comparação visual dos valores médios de $\delta^2\text{H}$ entre os laboratórios participantes.

Tabela 3. Comparação dos valores de $\delta^{18}\text{O}$ entre os laboratórios participantes.

		FMRP- USP ¹ (‰)	CIE- UNESP ² (‰)	CENA- USP ^{3*} (‰)	Desvio Padrão inter- laboratórios (‰)	
Análise de Oxigênio-18	Amostras Naturais	Média	-7,41 ^a	-7,43 ^a	-7,03 ^b	0,29
		DP	0,24	0,22	0,22	
		Mediana	-7,41	-7,34	-7,02	
		1º Quartil	-7,50	-7,60	-7,17	
		3º Quartil	-7,31	-7,24	-6,93	
		p*	< 0,001			
	Amostras Levemente Enriquecidas 25%	Média	19,44 ^a	19,39 ^a	21,51 ^b	1,04
		DP	0,25	0,18	0,23	
		Mediana	19,38	19,39	21,54	
		1º Quartil	19,27	19,27	21,35	
		3º Quartil	19,59	19,54	21,66	
		p*	< 0,001			
	Amostras Enriquecidas 50%	Média	47,10	46,91		0,34
		DP	0,34	0,33		
		Mediana	47,06	46,96		
		1º Quartil	46,89	46,65		
		3º Quartil	47,37	47,15		
		p**	0,86			
	Amostras Enriquecidas 75%	Média	74,39	74,20		0,42
		DP	0,37	0,51		
		Mediana	74,31	74,15		
		1º Quartil	74,27	73,81		
		3º Quartil	74,60	74,69		
		p**	0,34			
Amostras Enriquecidas 100%	Média	100,68	100,49		0,48	
	DP	0,43	0,60			
	Mediana	100,66	100,69			
	1º Quartil	100,36	100,45			
	3º Quartil	100,92	100,86			
	p**	0,85				

* O laboratório do CENA-USP se dispôs a analisar apenas as amostras naturais e enriquecidas a 25%. p* = ANOVA. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste TUKEY. p** = Teste T "Student". 1= Técnica Hydra. 2= Técnica da Pirólise 3= Técnica à Laser.

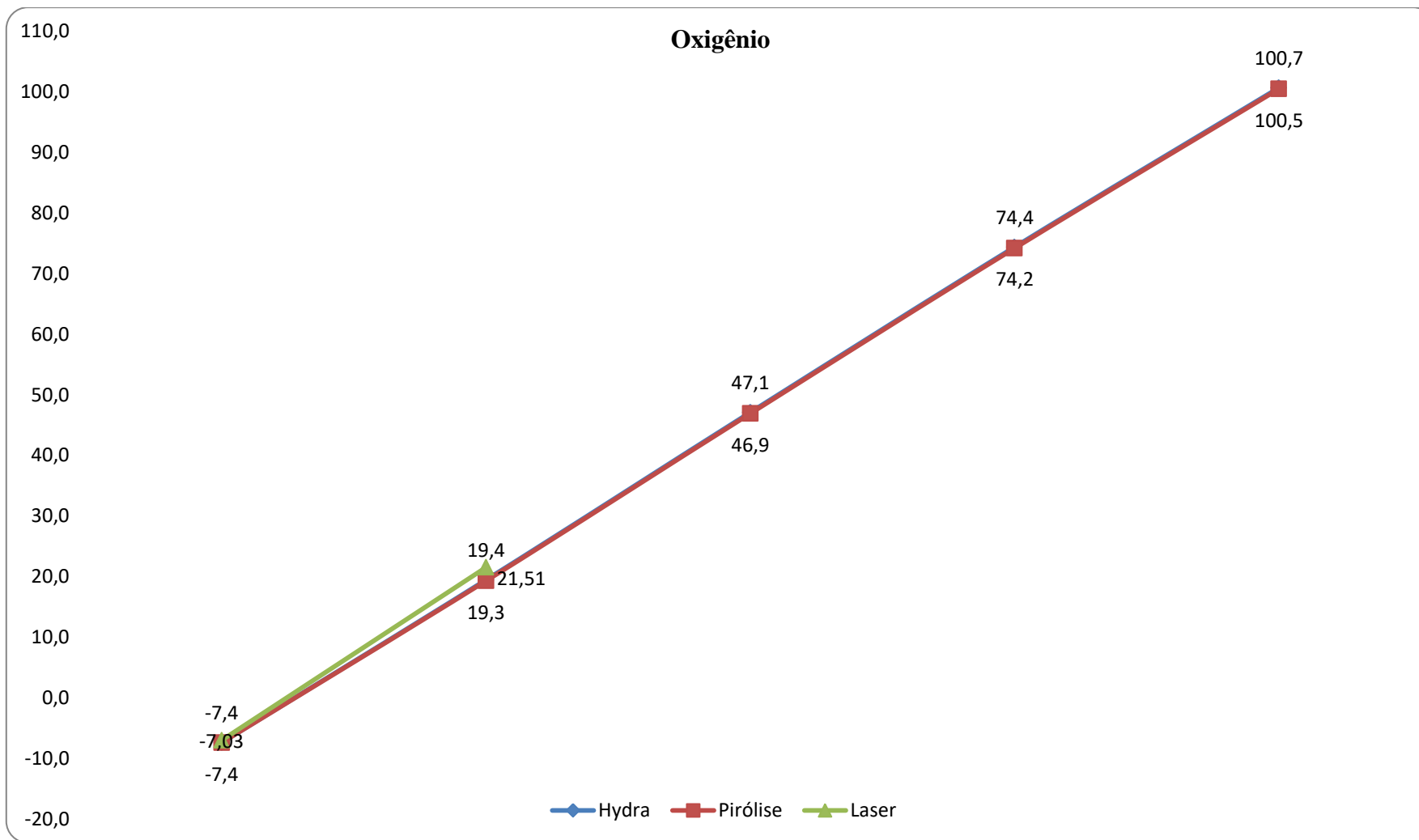


Figura 4. Gráfico para comparação visual dos valores médios de $\delta^{18}\text{O}$ entre os laboratórios participantes.

6. Conclusão

Com o objetivo de futuras pesquisas biomédicas a serem aplicadas em humanos no CIE-UNESP, verificamos que os valores de mensuração de águas enriquecidas estão adequados para a aplicação da metodologia na elucidação de questões metabólicas que envolvem a saúde do indivíduo. Os valores de análise do CIE-UNESP próximos aos da FMRP-USP nos permitirá, em futuras análises caso seja necessário, que possamos avaliar amostras em ambos os laboratórios, realizando apenas as correções de valores para as variações inter-laboratórios, como no caso das análises de deutério.

De acordo com informações de WONG, et al. (1993), existem padrões internacionais (Deutério: IAEA 302A e IAEA 302B; Oxigênio-18: IAEA 304A e IAEA304B) de amostras de águas enriquecidas que também simulam o processo de diluição isotópica pós dose em seres humanos, os quais já foram testados em 23 laboratórios na determinação do valor padrão reconhecido internacionalmente, de sua variação e na avaliação das variações inter-laboratórios, e que podem ser solicitados à Agência Internacional de Energia Atômica para análises em outros centros de pesquisa que desejem verificar a precisão e a acurácia das análises. Com este interesse, a equipe de pesquisa deste projeto esta disposta a solicitar estas amostras e fazer novas mensurações isotópicas de repercussão internacional, mesmo com a segurança dos resultados obtidos neste pesquisa.

Referências

CRISS, R.E. **Principles of stable isotope distribution**. Oxford University Press, 1^o ed. New York, 1999.

FERRIOLLI, E. **Estudos gerontológicos empregando isótopos estáveis e espectrometria de massa: implantação da metodologia e estudos da composição corporal, metabolismo energético e protéico de idosos**. Ribeirão Preto, 2006. Tese (livre-docência) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Departamento de Clínica Médica.

HORITA, J.; KENDALL, C. Stable Isotope Analysis of Water and Aqueous Solutions by Conventional Dual-Inlet Mass Spectrometry. In: GROOT, P.A(ed.). **Handbook of Stable Isotope Analytical Techniques**. Elsevier, v. 1, 2004. Cap. 1.

INTERNATIONAL DIETARY ENERGY CONSULTANCY GROUP (IDECG WORKING GROUP). **The Doubly labeled water method for measuring energy expenditure: a consensus by the IDECG Working Group**. PRENTICE, A.M.(ed). Viena: International Atomic Energy Agency, 1990.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY (IAEA). **Laser Spectroscopic Analysis of Liquid Water Samples for Stable Hydrogen and Oxygen Isotopes**. Training Course Series 35. Vienna, 2009.

KERSTEL, E. Isotope Ratio Infrared Spectrometry. In: GROOT, P.A. **Handbook of Stable Isotope Analytical Techniques**. Elsevier, v. 1, 2004. Cap. 34.

SPEAKMAN, J.R. **Doubly Labelled Water: Theory and Practice**. Chapman & Hall. 1^oEd. 399p. London, 1997.

THORSEN, T. et al. **Doubly labeled water analysis using cavity ring-down spectroscopy**. Rapid Commun. Mass Spectrom., v. 25, p. 3-8, 2011. DOI: 10.1002/rcm.4795.

WASSENAAR, L.I. et al. **Worldwide proficiency test for routine analysis of $\delta^2\text{H}$ and $\delta^{18}\text{O}$ in water by isotope-ratio mass spectrometry and laser absorption spectroscopy**. Rapid Commun. Mass Spectrom, v. 26, p. 1641–1648, 2012.

WONG, W.W. et al. **Interlaboratory analysis of reference water samples enriched with deuterium and oxygen-18**. Appl. Radiat. Isot. v. 44, n.3, p.561-566, 1993.

WONG, W.W. Energy utilization with Doubly Labeled Water $^2\text{H}_2^{18}\text{O}$. In: ABRAMS, S.A (ed.); WONG, W.W (ed.). **Stable isotopes in human nutrition: laboratory methods and research application**. CABI Publishing, v.1, 2003, cap.6.

APÊNDICE C - Teste piloto da água duplamente marcada

Concomitantemente às atividades de orientação nutricional foram realizados os testes pilotos da água duplamente marcada com o objetivo de determinar o peso da dose destes isótopos para as pacientes nesta fase pré-operatória. Em dados de água corporal total obtidos em pesquisas anteriores por meio de bioimpedância (QUESADA, 2011), verificou-se que as mulheres obesas tinham no peso corporal total, 50 % de água.

Para o teste piloto foram selecionadas duas participantes da pesquisa com o maior peso corporal e ofertadas doses de água marcada. As doses foram calculadas considerando 70% de água corporal (dose tradicional para indivíduos eutróficos) e 50% de água corporal (dose calculada para as pacientes com obesidade¹). A utilização de diferentes doses teve como objetivo verificar se a dose para 50% de água corporal era suficiente para visualizar a cinética dos isótopos da dose ofertada na água corporal a ponto de verificar o enriquecimento dos líquidos corporais e a diluição ao longo dos dias de coleta.

As pacientes foram orientadas a estar em jejum alimentar por 8 horas, podendo tomar água ao longo deste período. Ao chegar à clínica foi coletada uma amostra de urina basal e posteriormente as pacientes receberam as doses de água marcada (181g para a paciente considerando 70% da massa total sendo água corporal e 140g para a paciente considerando 50% da massa total sendo água corporal). Após a dose, as pacientes receberam um lanche isocalórico composto por frutas, sucos e biscoitos, e água (750 ml para cada paciente). Amostras de urina foram coletadas hora a hora até 6 horas após a dose de água marcada e diariamente até 10 dias de teste. As amostras foram

¹ Informação pessoal obtida em reunião com o professor Eduardo Ferrioli, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

coletadas descartando a primeira urina do dia ou, exceto se a paciente urinou no período noturno, anotando assim as datas e horários das coletas de todos os momentos.

Após coletadas, as amostras de urina foram pipetadas em criotubos de 4,5ml os quais foram selados com *parafilm* e armazenados em geladeira. As amostras foram submetidas à destilação para separar as impurezas da urina do líquido que a compõe, sendo que a água destilada desta amostra biológica foi submetida à análise isotópica. Devido a problemas técnicos ocorridos no equipamento *Isotope Ratio Mass Spectrometry* (IRMS) do Centro de Isótopos Estáveis – CIE do Instituto de Biociências de Botucatu IBB – UNESP, parceiro neste projeto, as análises isotópicas foram realizadas no *Isotope Ratio Infrared Spectroscopy* (IRIS) do Laboratório de Ecologia Isotópica do Centro de Energia Nuclear na Agricultura – CENA/USP Piracicaba/SP, sob supervisão do prof. Marcelo Zacharias Moreira. Foram realizadas apenas as análises das amostras de urina da paciente que recebeu a dose considerando 50% de água corporal.

Basicamente, os resultados isotópicos das amostras de urina, obtidos em delta per mil (δ ‰) no IRIS, foram transformados em parte por milhão (ppm). Posteriormente foi calculado o excesso de cada isótopo em cada ponto de coleta com os dados isotópicos pré-dose (basal). Estes resultados, apresentados numa função exponencial sofreram transformação em logaritmo neperiano (ln) com o objetivo de linearizar os dados (Tabela 1).

Tabela 1. Valores das análises isotópicas das amostras de urina da paciente antes e após a dose considerando 50% de água corporal.

Momentos Coletas	$\delta^{18}\text{O}$ (‰)*	$\delta^2\text{H}$ (‰)*	ppm ^{18}O **	ppm ^2H **	Ln(Exc ^{18}O)***	Ln(Exc ^2H)***
Basal	-3,16	-21,79	1998,87	152,37	0,00	0,00
1ª hora	135,68	754,58	2277,28	273,29	5,63	4,80
2ª hora	186,94	1044,58	2380,05	318,46	5,94	5,11
3ª hora	184,27	1033,33	2374,69	316,71	5,93	5,10
4ª hora	181,11	1018,40	2368,37	314,39	5,91	5,09
5ª hora	165,74	1015,86	2337,55	313,99	5,83 †	5,09 †
6ª hora	161,90	995,91	2329,84	310,88	5,80	5,07
1º Dia	146,45	898,44	2298,85	295,70	5,70	4,97
2º Dia	130,10	839,72	2266,08	286,55	5,59	4,90
3º Dia	113,67	760,12	2233,12	274,16	5,46	4,80
4º Dia	98,76	667,23	2203,23	259,69	5,32	4,68
5º Dia	83,76	587,47	2173,15	247,26	5,16	4,55
6º Dia	64,97	482,68	2135,47	230,94	4,92	4,36
7º Dia	66,44	491,62	2138,43	232,33	4,94	4,38
8º Dia	57,58	435,36	2120,66	223,57	4,80	4,27
9º Dia	51,48	401,87	2108,42	218,36	4,70	4,19
10º Dia	44,39	352,56	2094,22	210,68	4,56	4,07
10º Dia + 1 hora	39,49	322,03	2084,39	205,92	4,45	3,98

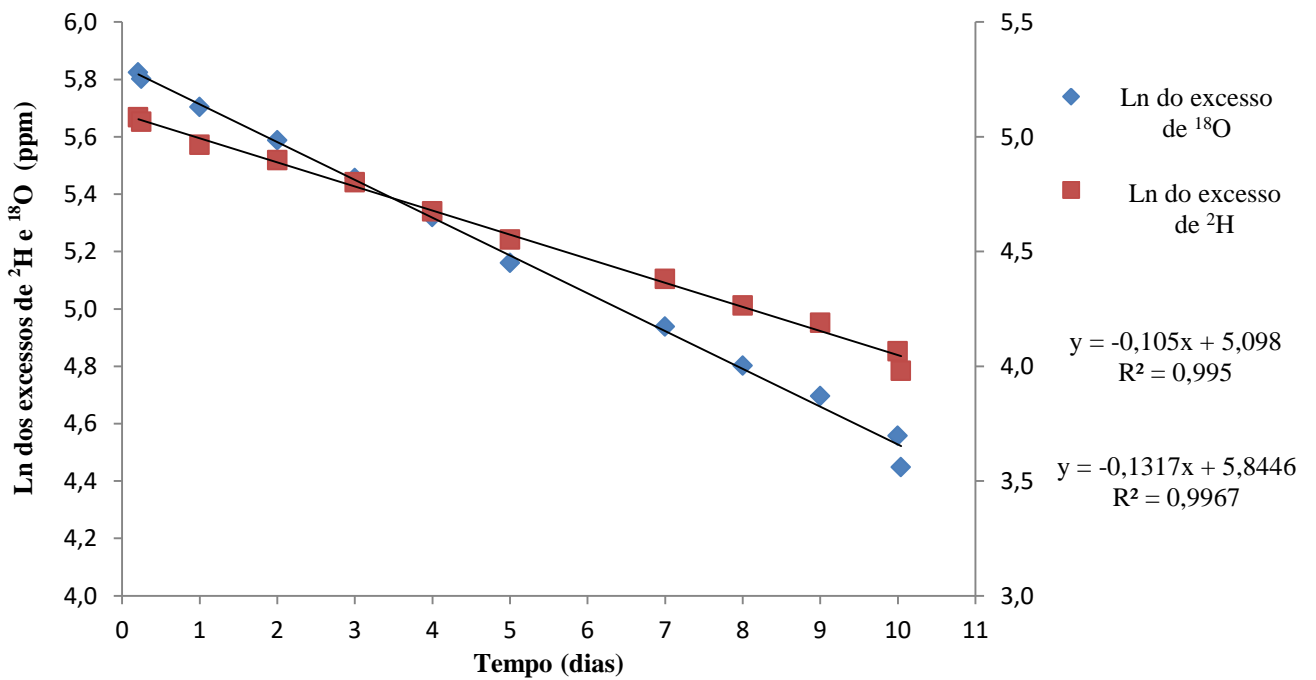
* delta per mil de oxigênio-18 e de deutério.

** partes por milhão de oxigênio-18 e de deutério.

*** logaritmo neperiano (ln) do excesso de oxigênio-18 e Logaritmo neperiano (ln) do excesso de deutério.

† início das escalas na figura 1

Os resultados da figura 1 mostram o processo de diluição isotópica a partir da 5ª hora após o consumo da dose, seguindo para os dias posteriores a este.



^{18}O = Oxigênio-18.
 ^2H = Deutério.

Figura 2. Logaritmo Neperiano (Ln) dos excessos de deutério e oxigênio-18 (ppm) versus o tempo (dia). Visualização do processo de diluição isotópica dos compostos marcados na água corporal de uma paciente obesa.

A apresentação dos resultados do teste piloto evidenciou que a dose considerando 50% da massa total sendo água corporal é suficiente para cobrir a demanda de isótopos na dose das pacientes do grupo que apresentam maior peso corporal. A diferença na diluição dos isótopos ao longo do tempo foi utilizada na equação de determinação de produção de CO_2 a qual posteriormente é aplicada determinação do gasto energético total das pacientes. Essa diferença na diluição era esperada, sendo explicada pela perda do deutério nos líquidos corporais (urina, fezes, suor, saliva, etc.) enquanto que oxigênio-18, além das perdas nos líquidos corporais, também é perdido na eliminação do C^{18}O_2 (enriquecido com ^{18}O).

Desenvolvimento das equações para determinação da composição corporal e do GET por meio da água duplamente marcada de acordo com documento da Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA, 2009)

Informações da Participante

Gênero: Feminino; **Idade:** 24 anos; **Peso atual:** 132,7 kg; **Altura:** 1,70m;

IMC: 45,9 kg/m²

Informações sobre a Dose ofertada à participante

Peso da dose de água duplamente marcada ofertada: 140,006g

Peso da dose para a “dose diluída”: 0,42g

Peso da água TAP para a dose diluída: 200,004g

Abundância do ²H na água TAP: 151,03 ppm

Abundância do ¹⁸O na água TAP: 1992,8 ppm

Abundância do ²H na dose diluída: 261,05 ppm

Abundância do ¹⁸O na dose diluída: 2239,26 ppm

Abundância do excesso do ²H na dose diluída: 261,05 – 151,03 = 110,02 ppm

Abundância do excesso do ¹⁸O na dose diluída: 2239,26 – 1992,8 =
246,46 ppm

Intercepto Y do ²H: 5,098

Antilog do ²H: 163,69 ppm

Intercepto Y do ¹⁸O: 5,8446

Antilog do ¹⁸O: 345,36 ppm

$K_D = -0,105 \text{ d}^{-1}$

$K_O = -0,1317 \text{ d}^{-1}$

a. Cálculo do espaço de diluição dos isótopos

$$N_x = \left[\left(W \times \frac{A}{a} \right) \times \left(\frac{\Delta DD}{\Delta BW} \right) \right] \div 1000$$

Onde:

N_x = Espaço de diluição do isótopo analisado, em Kg.

W = quantidade de água TAP usada para preparo da dose diluída.

A = dose de água duplamente marcada ofertada à participante.

a = quantidade da dose usada para a “dose diluída”

ΔDD = enriquecimento isotópico em excesso, mensurado na dose diluída, em ppm.

ΔBW = antilog do intercepto Y do gráfico de Logarito Neperiano (Ln) do enriquecimento isotópico em excesso da água corporal versus o tempo.

Espaço de diluição do Deutério do teste piloto

$$N_D = \left[\left(W \times \frac{A}{a} \right) \times \left(\frac{\Delta DD}{\Delta BW} \right) \right] \div 1000$$

$$N_D = \left[\left(200,004 \times \frac{140,006}{0,42} \right) \times \left(\frac{110,02}{163,69} \right) \right] \div 1000$$

$$N_D = [(200,004 \times 333,34761) \times (0,6721241)] \div 1000$$

$$N_D = [(66670,855) \times (0,6721241)] \div 1000$$

$$N_D = 44811,088 \div 1000 = \mathbf{44,81kg}$$

Espaço de diluição do Oxigênio-18 do teste piloto

$$N_O = \left[\left(W \times \frac{A}{a} \right) \times \left(\frac{\Delta DD}{\Delta BW} \right) \right] \div 1000$$

$$N_O = \left[\left(200,004 \times \frac{140,006}{0,42} \right) \times \left(\frac{246,46}{345,36} \right) \right] \div 1000$$

$$N_O = [(200,004 \times 333,34761) \times (0,7136321)] \div 1000$$

$$N_O = [(66670,855) \times (0,7136321)] \div 1000$$

$$N_o = 47578,462 \div 1000 = \mathbf{47,58kg}$$

Razão do pool do espaço de diluição $\left(\frac{N_D}{N_o}\right)$ deveria entrar entre 1,000 e 1,070, com uma média aproximada de 1,034 para adultos. Para o teste piloto a razão para o valor da razão foi de 0,942.

b. Cálculo da água corporal

A água corporal total (*Total Body Water* – TBW) é calculada a partir do espaço de diluição (N_x) dividido pelo fator de troca dos isótopos com o meio não aquoso, sendo este fator de 1,007 para ^{18}O e de 1,041 para ^2H .

TBW a partir do espaço de diluição do deutério:

$$TBW_D = \frac{N_D}{1,041}$$

$$TBW_D = \frac{44,81}{1,041} = \mathbf{43,05 kg}$$

TBW a partir do espaço de diluição do oxigênio-18:

$$TBW_o = \frac{N_o}{1,007}$$

$$TBW_o = \frac{47,58}{1,007} = \mathbf{47,25kg}$$

Média da água corporal total:

$$TBW_{méd} = \frac{TBW_D + TBW_o}{2}$$

$$TBW_{méd} = \frac{43,05 + 47,25}{2} = \mathbf{45,15kg}$$

Conversão da média de água corporal total de quilogramas para mol:

$$TBW_{méd}(mol) = \frac{TBW_{med}(kg) \times 1000}{18,0153}$$

Onde, 18,0153 é o peso molecular da água.

$$TBW_{méd}(mol) = \frac{45,15 \times 1000}{18,0153} = 2506,203 \text{ mol}$$

c. Cálculo da produção do CO₂ e Gasto Energético Total

As taxas de eliminação dos isótopos (K_D e K_O) são a inclinação da reta do logaritmo neperiano (ln) do enriquecimento da água corporal em função do tempo, desde o consumo da dose.

$$K_D = -0,105 \text{ d}^{-1}$$

$$K_O = -0,1317 \text{ d}^{-1}$$

Razão $\left(\frac{K_O}{K_D}\right)$ deve situar-se entre 1,1 e 1,7.

$$\left(\frac{-0,1317}{-0,105}\right) = 1,2543$$

Produção de rCO_2

$$rCO_2 (mol. d^{-1}) = 0,455 \times TBW (mol) \times [(1,007 \times -K_O) - (1,041 \times -K_D)]$$

$$rCO_2 (mol. d^{-1})$$

$$= 0,455 \times 2506,203$$

$$\times [(1,007 \times -(-0,1317)) - (1,041 \times -(-0,105))]$$

$$rCO_2 (mol. d^{-1}) = 1140,3223 \times [0,1326219 - 0,109305]$$

$$rCO_2 (mol. d^{-1}) = 1140,3223 \times 0,0232719$$

$$rCO_2 (mol. d^{-1}) = 26,537466$$

A produção do rCO_2 em $mol. d^{-1}$ deve ser transformada em gás ($L. d^{-1}$) por meio da constante 22,414.

$$rCO_2 (L. d^{-1}) = rCO_2 (mol. d^{-1}) \times 22,414$$

$$rCO_2 (L. d^{-1}) = 26,537466 \times 22,414 = \mathbf{594,81}$$

Determinação do Gasto Energético Total

O cálculo do GET requiere uma estimativa do coeficiente respiratório (R), e, em seguida, a produção de energia pode ser calculada usando equações de calorimetria indireta padrão. A equação é mais fácil de utilizar é a equação de Weir modificada.

$$GET (Kcal. d^{-1}) = rCO_2(L. d^{-1}) \times \left(1,10 + \frac{3,90}{R}\right)$$

O R usualmente é assumido entre 0,86 ou 0,85, mas é recomendado que os valores representem a dieta local.

$$GET (Kcal. d^{-1}) = 594,81 \times \left(1,10 + \frac{3,90}{0,85}\right)$$

$$GET (Kcal. d^{-1}) = 594,81 \times (1,10 + 4,5882352)$$

$$GET (Kcal. d^{-1}) = 594,81 \times 5,6882352 = \mathbf{3389,22 kcal}$$

d. Saída de dados com a técnica de água duplamente marcada:

Composição Corporal

Água corporal total: 45,15 kg

Massa Magra: $\frac{45,15}{0,732} = 61,68 \text{ kg}$, onde 0,732 é a constante de hidratação de massa magra.

$$Massa Gorda = \text{Peso Total do Indivíduo} - \text{Massa Magra}$$

Gordura Corporal (Peso total – Massa Magra): 132,7 – 61,68 = 71,02kg.

% de Gordura Corporal: 53,52%

Gasto Energético Total

$$rCO_2(L.d^{-1}) = 594,81; GET (Kcal.d^{-1})= 3389,22$$

Conclusão

Com a dose de água marcada considerando 50% de água corporal total na paciente do teste piloto foi possível verificar o enriquecimento dos líquidos corporais com os isótopos marcados e a diluição destes ao longo do tempo, portanto, a determinação de uma dose fixa considerando 50% de água corporal da paciente mais obesa irá cobrir a quantidade da dose para as pacientes com maior peso e conseqüentemente para as que apresentam menor peso corporal. Com o desenvolvimento das equações específicas obtivemos os resultados esperados para as variáveis que compreendem os compartimentos corporais (massa magra e massa gorda) e o gasto energético total.

Referências

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY (IAEA). **Assessment of body composition and total energy expenditure in human using stable isotope techniques**. IAEA HUMAN HEALTH SERIES, Nº 3. Vienna, 2009.

QUESADA, K.R. **Subnotificação da ingestão energética entre obesas candidatas a cirurgia bariátrica**. Araraquara, 2011. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP. Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição.

São Paulo Research Foundation - FAPESP

Research Internship Abroad Report

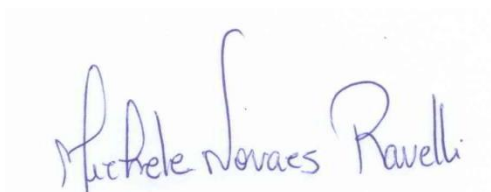
**Energy metabolism, body composition and food intake
in bariatric surgery.**

Number of the FAPESP Process: 2016/02306-8

Number of the FAPESP Process linked: 2013/03998-2

Period of validity: 15/08/2016 a 14/02/2017

Period covered by report: 15/08/2016 a 14/02/2017



Beneficiary: Michele Novaes Ravelli



Supervisor from Brazil: Profa. Dra. Maria Rita Marques de Oliveira



Supervisor from United States of America: Prof. Dr. Dale A. Schoeller

**Madison/WI – United States of America
2016-2017**

1. Abstract of the Initial Plan

Today obesity surgery is the procedure of choice for severely obese individuals because it promotes greater and longer-lasting weight losses and effectively controls chronic, body adiposity-related metabolic disorders, a serious and common global health problem. However, surgery results are not the same for all obese individuals since a small part of the population does not benefit from surgery, obtaining a smaller weight loss than expected and even having a recovery of the lost weight. This may be related to adaptive metabolic processes with probable genetic implications.

Energy restrictions imposed by clinical treatments induce changes in weight and body composition reducing the metabolically active mass and consequent reduction of the components of energy expenditure (LEIBEL, ROSENBAUM, HIRSCH, 1995; HEILBRONN et al, 2006; REDMAN et al., 2009). Contradictorily, energy restrictions caused by physiological methods, such as in cases of surgical approaches, have shown not induce this metabolic adaptation (COUPAYE et al. 2005; CAREY et al. 2006; FOGAÇA, 2009; OLIVEIRA et al, 2011). There are still doubts about the discrepancies in the results, and an efficient evaluation of the compounds of the metabolism is essential to verify the performance of these components in the weight control and metabolic adaptation.

Studies of energy expenditure are usually conducted in metabolic chambers that do not allow free-living of the participants, therefore restricting normal activities which can lead to bias on the data obtained. The use of stable metabolic tracers in nutritional sciences is very active in international research and under development in Brazil. In the doubly labeled water (DLW) technique deuterium (^2H) and oxygen-18 (^{18}O) allow the evaluation of Total Energy

Expenditure (TEE) with the individual free-living, as opposed to metabolic chamber where activities are restricted to the environment. Furthermore, these stable isotope dilutions in water body allows the evaluation of body compartments (lean mass, fat mass) with greater precision than those obtained by other methods. Thus, the application of stable isotopes has strong potential to lead to a more precise and accurate elucidation of the issues related to metabolic changes and food intake caused by obesity surgery.

In an attempt to investigate TEE and underreporting of energy intake, which could interfere with weight loss after surgery, and taking advantage of the favorable technical and scientific landscape, the objective of this project was to assess how factors associated with energy metabolism, body composition and food consumption influence the body's response to bariatric surgery 6 and 12 months after the procedure. This was a self-controlled clinical trial involving 22 women with body mass index (BMI) between 40 and 50 kg/m². TEE and body composition was determined by DLW. The dietary intake and physical activity level was assessed through records of three non-consecutive days. All these data were collected in Brazil and the DLW data has been organized and discussed with the help of Dr. Dale A. Schoeller who developed the technique in humans.

The internship at the Stable Isotope Lab of the Biotechnology Center at the University of Wisconsin - Madison, under the supervision of prof. Dale A. Schoeller was executed with the objective of providing academic gains aimed at deepening the knowledge of the DLW technique applied in the studies of obesity and discussion of the energetic metabolism alterations caused by the surgery, as well as other benefits about this academic experience.

Hopefully the study will provide answers to the hypotheses raised in previous studies and help with decisions regarding treatment and postoperative care.

2. Summary

During the period of this internship the goals which were described in the planning were achieved. Meetings with the technicians of this laboratory were carried out with the aim to learn about the equations and preparation of the DLW subjects' doses and about the diluted dose to analyze and use the information in the equations to determine the TEE and the Total Body Water (TBW). They taught me about these equations, how to use spreadsheets to calculate data with two or many points of sample analysis.

During the internship the technicians taught me how to use the Delta Plus mass spectrometer (Finnigan MAT, Bremen, Germany) to analyze ^2H samples and a continuous flow Isotope Ratio Mass Spectrometer – IRMS (Delta V; Thermo Scientific, Bremen, Germany) for ^{18}O analysis.

I worked on a specific project, helping to process urine specimens, prepare vials with these samples, putting them in an auto-sampler and running the analysis on IRMS. I worked with the data to learn about the scale correction equation, the TEE and TBW equations and about the quality control parameters.

I accompanied the work of a post-doctoral student of Dr Schoeller's laboratory who worked with human urine, blood and saliva samples, and the work of the technicians of this lab with all the projects which were conducted during the internship period.

I participated in meetings with Dr. Schoeller to discuss the data I worked on to learn about the equations, to organize and discuss the data from my doctoral research, learn about the memory effect in the results, how to verify the quality of the data, and how to identify the error on the analysis on the sample collection or on the equations. We have discussed the possibilities of papers which can be published with all the data collected.

During all this period, I have had the opportunity to meet new researchers who work with stable isotopes in different areas of the science and I have done the bibliographic survey for the production of paper and thesis.

I have kept in touch with our laboratory in Brazil to help them to correct the memory effect and the protocol of analysis.

3. Detailing of Progress

a) Preparation of Doubly Labeled Water Doses

For my doctoral study in Brazil, I calculated the dose of DLW for a specific group of individuals (overweight). During the internship, I have learned how to calculate the dose for groups of people with different degrees of body mass.

The human dose of DLW was calculated initially considering the enrichment around 98,8‰ for the ^{18}O in the richest biological sample with this compound, analyzed on the IRMS machine (SCHOELLER, 1983). However, after a period with high cost of this element, the dose has suffered a slightly lower modification, achieving about 90‰ enriched in richest sample. For this purpose, the dose is around $0.22\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ TBW of ^{18}O enriched in 99.8 atom% excess or around $2.05\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ TBW of ^{18}O enriched in 10.8 atom% excess. For

deuterium analysis, it is necessary to achieve around 814‰ in the richest biological sample with this compound, thus a dose about 0.14g.kg⁻¹ TBW of ²H enriched in 99.8 atom% excess.

Considering these premises, the quantity of the DLW dose can be around 2.19 or 2.2g.kg⁻¹TBW. It can have small changes in cases when the period of data collection is lower (7 days) or higher (14 days), or if the physiological conditions of the participants are abnormal as in the case of athletes where isotope turnover is fast. To decide how much of the dose should be ingested, it is necessary to do a critical analysis about the study, the methodology and the subjects.

A fixed dose has the aim to prepare the same quantity of DLW for range of subjects considering their body mass and water. This is possible in the USA because there are largescale epidemiological studies that have evaluated the nutritional status from males and females in a large range of weight and age, analyzing the body composition with DLW and bioimpedance techniques (CHUMLEA, et al., 2002; SUN, et al., 2003). The National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) and the Observing Protein and Energy Nutrition (OPEN) Study are huge studies which assess the health and nutritional status of adults and children in the United States. With the information from these surveys, was possible to determine the quantity of dose that corresponds to ranges of weight and Body Water (BW) which is used in other studies with DLW technique (Table 1 and 2).

Table 1. Dose of Doubly Labelled Water for range of the population based on the body weight.

Ranges	A	B	C	D	E
Dose weight (g)	54.0	63.0	74.0	89.0	100.0
Female (Body Weight – Kg)*	<60.0	60.1 – 75.0	75.1 – 95.0	>95.0	none
Male (Body Weight – Kg)*	none	<65.0	65.1 – 80.0	80.1 - 95	>95.0

Source: DA Schoeller, Stable Isotope Laboratory – Biotechnology Center / UW-Madison.

Table 2. Dose of Doubly Labelled Water for range of weight for overweight and obese population.

Ranges	A	B	C	D	E
Dose weight (g)	58.0	67.0	79.0	95.0	114.0
Female (Body Weight – Kg)*	<55.0	55.0 – 75.0	75.1 – 110.0	>110.0	none
Male (Body Weight – Kg)*	none	<60.0	60.0 – 70.0	70.1 - 95	>95.0

Source: DA Schoeller, Stable Isotope Laboratory – Biotechnology Center / UW-Madison.

To produce a large amount of DLW and to separate the doses by the ranges, it is necessary to mix the both isotopically labeled waters, as specified on the next table (Table 3).

Table 3. Quantity of isotopically labeled waters to be mixed and produce the Doubly Labelled Water.

Oxygen-18 10.8 atoms%	Deuterium 99.8 atoms%
(Kg)	(g)
2	136
3	206
4	273
5	342




Source: T. Shriver, Stable Isotope Laboratory – Biotechnology Center / UW-Madison.

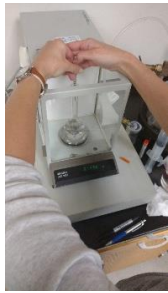
b) Preparing the Dose Diluted

The Dose Diluted (DD) is a small quantity (between 0,10xx; 0,15xx; 0,20xx) of DLW diluted in 80.0 grams of natural water which is analyzed in the IRMS and the results are used in the equation to determine the TBW and TEE.

In this laboratory, at UW-Madison, I learned a simple way to prepare the DD. For this purpose, is necessary to follow the next instructions:

Chart 1. Instructions to prepare the Dose Diluted.

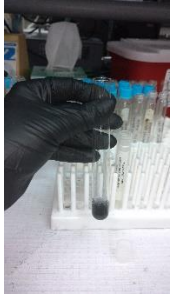

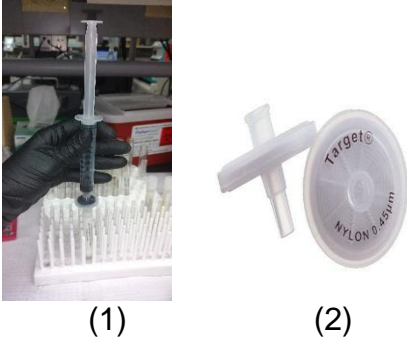
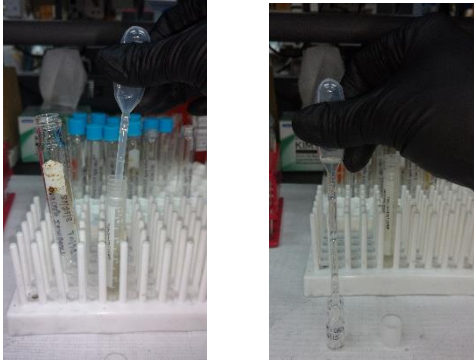
<p>1</p>		<p>Tools used:</p> <ul style="list-style-type: none"> • volumetric flask • Insulin Syringe • 60 ml syringe • Double distilled water • Cryotubes • Parafilm • Precision Balance • Labeled Water – Dose Sample
<p>2</p>		<p>Place the volumetric flask in a precision scale and zero the value.</p>
<p>3</p>		<p>Using a 60 ml syringe, add 80 ml of double distilled water in the volumetric flask. Be careful not to get water out of the flask and change the value of the scale. Hold a steady hand. Upon reaching 80 ml, write down the exact amount of the scale and zero the value of this.</p>

4		<p>Using an insulin syringe, add the desired amount of labeled dose (between 0,10xx; 0,15xx; 0,20xx). Do not press the plunger, just rotate it slowly until it reaches the desired value.</p> <p>Wait for the value to stabilize and note.</p>
5	Close the volumetric flask and mix 10 times.	
6	Wait 12 hours to transfer to cryotubes, considering complete mixing of the labelled water with natural water.	
7	Reserve 4,5 ml of the diluted dose in cryotube, use parafilm to seal the cryotube.	
8	Reserve 4,5 ml of the natural water in cryotube, use parafilm to seal the cryotube.	
9	Analyze together with the urine samples.	

c) Preparing the Samples to be Analyzed via IRMS – Kohrt Study

There are different techniques to analyze enriched urine samples. In our laboratory we work with pyrolysis technique, in which it is necessary to distill the samples in a vacuum cryogenic line. The Stable Isotope Laboratory at UW-Madison uses the chromium reduction technique to analyze deuterium in urine samples. For this laboratory, the samples are cleaned with a carbon black and filter technique. This procedure is done following the next instructions:

Chart 2. Instructions to prepare the samples to be analyzed.

1		<ul style="list-style-type: none"> • Transfer the urine sample from the cryotube to a disposable culture tube. • Put a small quantity of carbon black powder.
2		<p>In a Vortex Machine, mix the urine sample with the carbon black powder during 40 seconds, or until the sample becomes homogeneous.</p>
3	 <p>(1) (2)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Transfer the homogeneous mixture to a 10 mL syringe (picture 1) with a nylon acrodisc syringe 0.45µm filter (picture 2) • Press the syringe plunger so the clean sample returns to the original cryotube.
4	 <p>(1) (2)</p>	<p>With transfer pipets, put 1mL of the sample in a vial to analyze Oxygen-18 (picture 1) and Deuterium (picture 2) in the specific IRMS.</p>

d) Isotope Ratio Mass Spectrometer

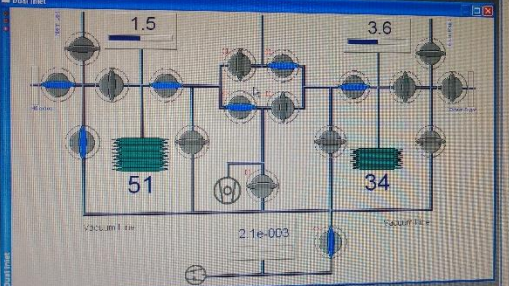
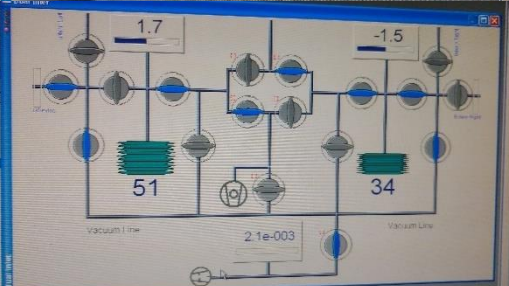
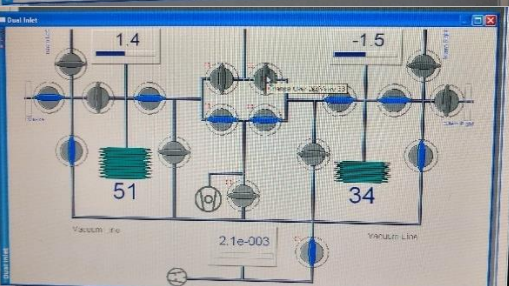
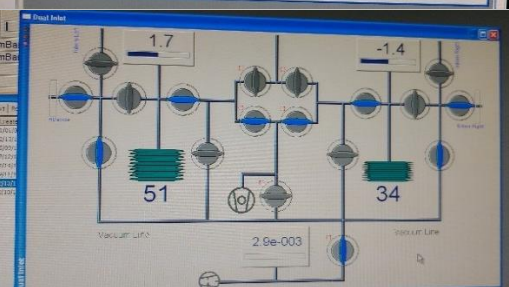
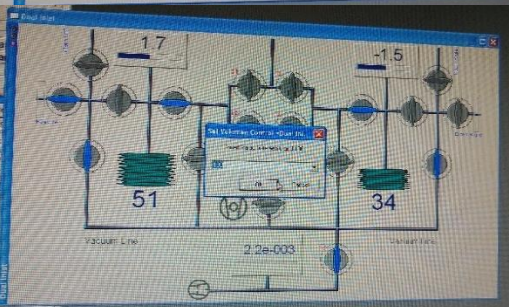
Currently, there are several types of instruments and peripherals to analyze isotope ratios in solid and liquid samples, for example the cavity ring-down spectrometer (CRDS) and Isotope Ratio Mass Spectrometer (IRMS). Samples are introduced in the gas phase into the IRMS via either a Dual Inlet

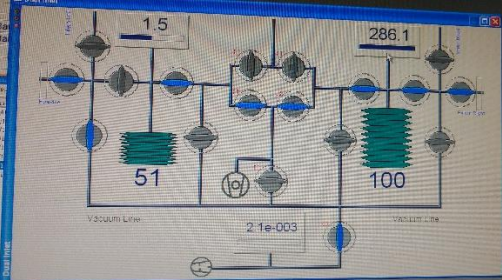
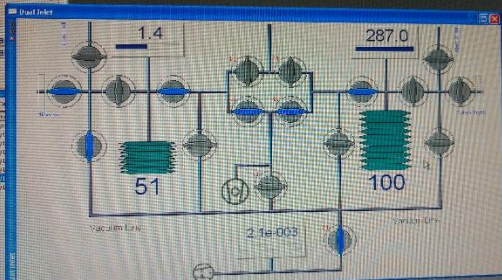
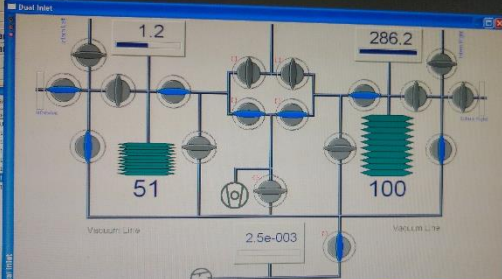
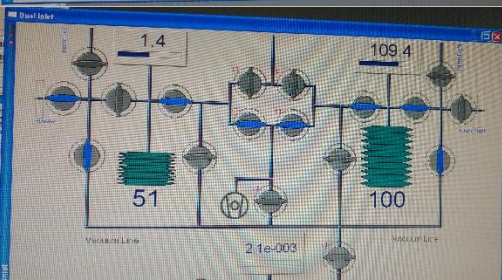
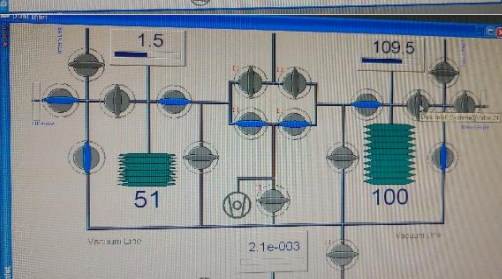
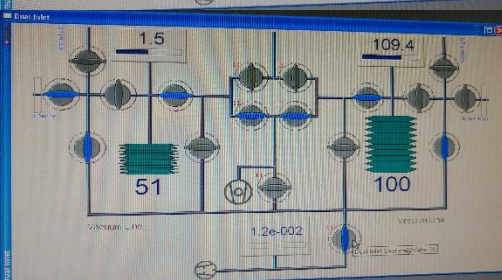
(DI) or Continuous Flow (CF) system. Liquid water can be analyzed for ^2H by evolving hydrogen gas from the sample in an oxidation reduction reaction with hot (850°C) chromium ($2\text{Cr} + 3\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Cr}_2\text{O}_3 + 3\text{H}_2$). The sample is then analyzed against a standard using the dual inlet for m/z of 2 and 3.

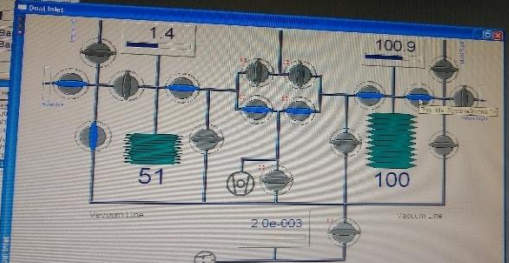
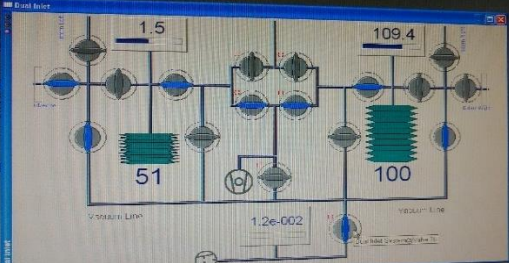
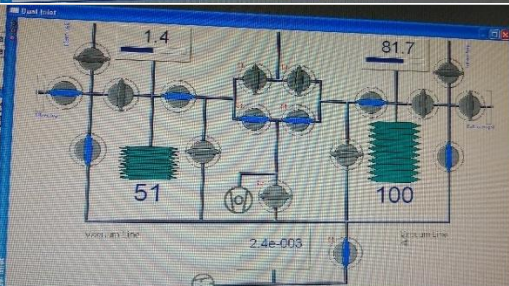
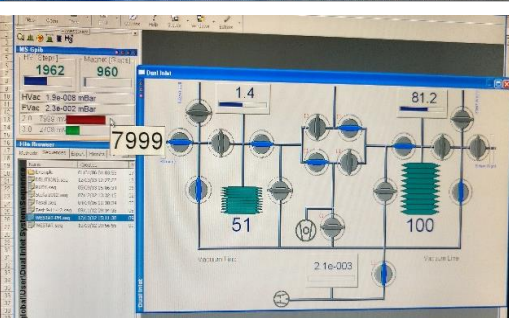
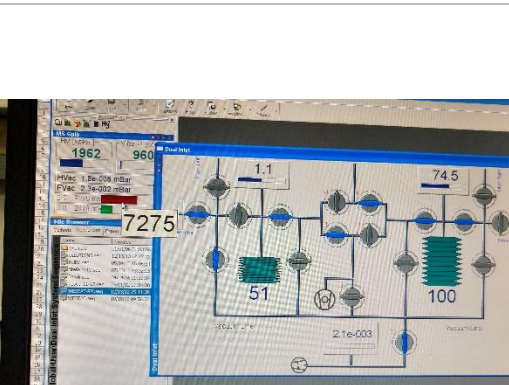
The ^{18}O is measured by equilibrating CO_2 (gas) with H_2O (liquid) ($\text{CO}_{2(g)} + \text{H}_2\text{O}_{(l)} \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3$) and then, after the equilibrium, analyzing the carbon dioxide utilizing continuous flow for the detection of m/z of 44, 45 and 46. The Stable Isotope Laboratory at UW-Madison uses both techniques to analyze doubly labeled water in biological fluids in both humans and animals.

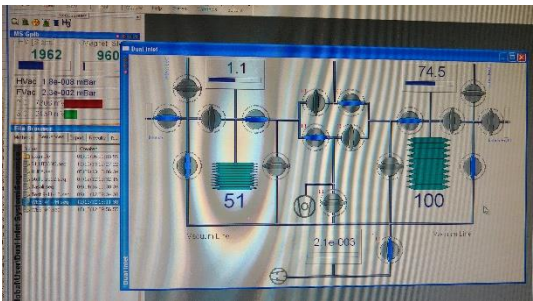
During the internship I learned and worked with both of these techniques which are different from what I have learned in Brazil (pyrolysis technique). The chromium reduction reaction coupled to the IRMS using the dual inlet is an older method than pyrolysis, however, it is considered here a more accurate method in the measurement of the isotope ratio. Although using the dual inlet requires more preparation time than the continuous flow needed for the pyrolysis system. In order to use the dual inlet, I have learned the following step by step instructions (Chart 3).

Chart 3. Step by Step to prepare the DI -IRMS to analyze deuterium in liquid samples.

1	Check if the last sequence of analysis was completed.
2	Check if the needle of the syringe analysis is appropriate.
3	Close the windows of last analysis.
4	 <p data-bbox="874 593 1343 660">Open the window for the gas line.</p>
5	 <p data-bbox="874 817 1343 1030">Open valves 23, 24, and 39 to eliminate the gas of the last analysis which is inside the bellows. The pressure value related to the bellows decreases to zero.</p>
6	 <p data-bbox="874 1164 1343 1265">To open the reference gas, valve number 33 for the source should be closed.</p>
7	 <p data-bbox="874 1422 1343 1601">Close valve 24 and open valve 21 to clean the gas line of the reference gas cylinder. Check for the pressure to decrease and stabilize.</p>
8	 <p data-bbox="874 1680 1343 1758">Close valve 21 and open the reference gas bellows (100%).</p> <p data-bbox="874 1792 1343 1937">Open the reference cylinder valve for 5 seconds to allow the reference gas to enter in the system.</p>

9		<p>Close valve 23 and open valves 21 and 24 to allow the reference gas to enter the bellows. Wait until the pressure of the bellows stabilizes.</p>
10		<p>Close valves 21 and 24 to keep the gas in the bellows.</p>
11		<p>Open valves 23 and 39 to release the excess gas from the line. The optimum pressure of the reference gas bellows is below 80.</p>
12		<p>Close valve 39 and open valve 24 to release gas for a large gas line extension, aiming gas bellows for 80 pressure. Wait for the pressure to stabilize.</p>
13		<p>Close valve 24 to maintain the gas inside the bellows.</p>
14		<p>Open valve 39 to release the excess gas in the large line gas extension.</p>

15		<p>Close valves 39 and 23 and open valve 24 to release small amount of gas in the gas line lesser extent. Wait for the bellows pressure to stabilize.</p>
16		<p>Close valve 24 and open valve 23 and 39 to release this excess gas in the small stretch league.</p>
17		<p>Repeat the previous two processes (15 and 16) to the reference pressure of the gas bellows reaches values near 80.</p>
18		<p>Open valve 33 so the reference gas in the bellows accesses the source and reaches equilibrium. Attention to millivolt value for mass 2 (deuterium). Wait for the balance between the bellows and the source, this occurs when the millivolt value is stable.</p>
19		<p>The optimal value for the analysis is 4000-8000 millivolts. If you leave too low, it is possible that the gas runs out before finalizing the analysis of all samples. Therefore, seek to balance the bellows gas to the source between 7000 to 7500. For this, close valve 23 and open valve 24 to release some of the gas from the bellows. Observe the value in millivolts to decrease and stabilize.</p>

20		<p>After stabilizing the millivolt value, close valve 24 and open valve 23 for the gas to be released.</p> <p>When the values of the gas pressure in the bellows and source millivolts reach the ideal, you are ready to begin the analysis.</p>
21	Prepare the samples in the analysis system, placing them in wave system (from low to high enrichment).	
22	Enter the name of the samples and the routine running of the analysis in the software.	
23	Select all the samples which will be analyzed.	
24	Press play and save in a new folder.	

The number of the analysis of each sample is decided by the technician and the supervisor of the IRMS Laboratory. It is important to consider the memory effect in the machine after analyzing samples with high enrichment. Since the chromium reduction reaction method has high accuracy and precision, it is possible to run the sample analysis in duplicate or triplicate and achieve numbers with acceptable standard deviation value. In the IRMS Lab at UW-Madison, the deuterium analysis begins and ends with two laboratory standard samples with natural and high enrichment (Figure 1). These laboratory standard samples were created in large quantity and measured in relation to International standards sample (SMOW and SLAP) from International Agency Energy Atomic (IAEA). The aim of standards measurement is to evaluate the precision and accuracy of the IRMS and use the average of these values in the normalization equation of the samples analyzed, which is explained later.

The analysis begins with Madison TAP Water (MTW), which is a laboratory standard sample with a known value for deuterium in natural environment ($-56.25 \delta\text{‰}$). Then they analyze another laboratory standard sample, called Working Standard 5 (WS5) with high and known enrichment ($796.75 \delta\text{‰}$). Since a sample with high enrichment is analyzed, it is

recommended the next sample also has a high degree of enrichment. Then, the first post-dose urine sample (4 hours after dose) is analyzed in triplicate and the next sample (5 hours after dose) in duplicate. Since the difference in the enrichment between them is low, it is possible to achieve a small standard deviation in the same sample even in duplicate measurement.

The next sample to be analyzed is the 10th day after the dose, but it needs to be at the same hour of the day that the first urine sample was collected (4 hours after the dose time). This sample is analyzed in triplicate because there is a large difference in this enrichment in relation to the enrichment of the previous sample. It will help to achieve a precision value in the analysis. Next, the 10th day (5 hours after the dose time) is measured in duplicate (Figure 1).

The baseline sample is measured after a duplicate analysis of the MTW, which is done with the aim to “clean” the IRMS and obtain a precise value for the baseline sample. Since the baseline sample also has natural enrichment, this analysis is done in duplicate after the MTW measurement (Figure 1).

Sometimes the values of the analysis appear different from expected and it indicates that some problem occurred with either the IRMS or with the sample. It is important to have a technician with extensive knowledge about the machine and the technique to find the problem and fix it.

Figure 1. Example of data input to analyze deuterium in the DI-IRMS at IRMS lab – UW – Madison (Two points method).

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	Study Name								avg mem step 1	#DIV/0!
2	Sample								avg mem step 2	#DIV/0!
3	Use with 1.2ul Hamilton syringe								3DAY 1	#DIV/0!
4		savs smow	mem step 1	mem step 2	corr mem	mem adj	scale adj		3DAY2	#DIV/0!
5	Madison TAP Water (MTW) - Standard Sample Natural enrichment					0,00	#DIV/0!			
6	Madison TAP Water (MTW) - Standard Sample Natural enrichment					0,00	#DIV/0!	MTW		
7	Madison TAP Water (MTW) - Standard Sample Natural enrichment					0,00	#DIV/0!	WS5		
8	Work Standard 5 (WS5) - Standard Sample High enrichment		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!			
9	Work Standard 5 (WS5) - Standard Sample High enrichment		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!			
10	Work Standard 5 (WS5) - Standard Sample High enrichment		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!			
11	High Enrichment Sample (4 hours after dose)		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!			
12	High Enrichment Sample (4 hours after dose)		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!			
13	High Enrichment Sample (4 hours after dose)		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!			
14	High Enrichment Sample (5 hours after dose)		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!			
15	High Enrichment Sample (5 hours after dose)		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!			
16	Low Enrichment Sample (4 hours 10 days after dose)		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!			
17	Low Enrichment Sample (4 hours 10 days after dose)		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!			
18	Low Enrichment Sample (4 hours 10 days after dose)		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!			
19	Low Enrichment Sample (5 hours 10 days after dose)		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!			
20	Low Enrichment Sample (5 hours 10 days after dose)		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!			
21	Madison TAP Water (MTW) - Standard Sample Natural enrichment		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!			
22	Madison TAP Water (MTW) - Standard Sample Natural enrichment		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!			
23	Baseline Subject		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!			
24	Baseline Subject		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!			
25	Madison TAP Water (MTW) - Standard Sample Natural enrichment		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!			
26	Madison TAP Water (MTW) - Standard Sample Natural enrichment		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!			
27	Madison TAP Water (MTW) - Standard Sample Natural enrichment		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!			
28	Work Standard 5 (WS5) - Standard Sample High enrichment		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!			
29	Work Standard 5 (WS5) - Standard Sample High enrichment		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!			
30	Work Standard 5 (WS5) - Standard Sample High enrichment		#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!			

Sample Value from the IRMS.

Equation to determine the memory effect, step 1.

Equation to determine the memory effect, step 2.

Equation to correct the memory effect.

Equation to adjust the sample value with the memory effect value.

Value of the Sample after applying the equation to

Average of Memory Step 1.

Average of Memory Step 2.

Average memory effects STEP 1 of the last 2 days + current day

Average memory effects STEP 2 of the last 2 days + current day

Average of MTW from the beginning and ends of the running analyze.

Average of WS5 from the beginning and ends of the running analyze.

To analyze oxygen-18 in urine samples, I learned and worked with the CO₂ equilibration technique utilizing CF-IRMS. This kind of machine has a simple process to prepare and analyze the sample. First it is necessary to flush the head gas from the sample vial adding CO₂ with a known value and wait 24 hours until the oxygen in CO₂ changes with the oxygen in the H₂¹⁸O. After this period, it is possible to analyze the C¹⁸O₂ enriched in a continuous flow system.

In the Stable Isotope Laboratory at UW-Madison, after every 5 replicates analyzed of the same sample, the standard gas is measured with the purpose of "cleaning" the machine for the next sample analysis (Figure 2). The analysis begins and ends with the laboratory standard samples (MTW and WS5) which also have known values for ¹⁸O (MTW = -7.74 ‰; WS5 = 109.29 ‰). They are used to evaluate the precision and accuracy of the IRMS and the average of this values is used in an equation to normalize the value of the subject samples

analyzed. The data input to analyze ^{18}O in the IRMS is done by putting the subject samples day-by-day, because the memory effect for the ^{18}O is quite low.

The samples are measured in 5 replicates but only the last three are used to calculate the average value of the sample which is corrected in an equation to normalize the value in relation to the standards samples. The standard deviation between the last three repetition of the sample needs to be below 0.3 ‰ to be considered acceptable.

Figure 2. Example of data input to analyze oxygen-18 in the CF-IRMS at IRMS lab – UW – Madison (Two points method).

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1											TAP	#DIV/0!
2											V55	#DIV/0!
3												#DIV/0!
4	Time Code	Identifier 1	Identifier 2	d 18O/16O	d 46CO2/44C1	d 13C/12C	45CO2/44CC	Peak Nr	Area 44	Ampl 44	Ave StDev	ADJUSTED
5		Gas										
6		Gas										
7		Gas										
8		MTV - Standard Sample - TAP									#DIV/0!	#DIV/0!
9		MTV - Standard Sample - TAP										
10		MTV - Standard Sample - TAP									#DIV/0!	#DIV/0!
11		MTV - Standard Sample - TAP										
12		MTV - Standard Sample - TAP									#DIV/0!	
13		Gas										
14		Gas										
15		Gas										
16		V55 - Standard Sample - HIGHT									#DIV/0!	#DIV/0!
17		V55 - Standard Sample - HIGHT										
18		V55 - Standard Sample - HIGHT									#DIV/0!	#DIV/0!
19		V55 - Standard Sample - HIGHT										
20		V55 - Standard Sample - HIGHT									#DIV/0!	
21		Gas										
22		Gas										
23		Gas										
24		Baseline subject 1										
25		Baseline subject 1										
26		Baseline subject 1									#DIV/0!	#DIV/0!
27		Baseline subject 1										
28		Baseline subject 1									#DIV/0!	
29		Gas										
30		Gas										
31		Gas										
32		4h post dose										
33		4h post dose										
34		4h post dose									#DIV/0!	#DIV/0!
35		4h post dose										
36		4h post dose									#DIV/0!	
37		Gas										
38		Gas										
39		Gas										
40		5h post dose										
41		5h post dose										
42		5h post dose									#DIV/0!	#DIV/0!
43		5h post dose										
44		5h post dose									#DIV/0!	
45		Gas										
46		Gas										
47		Gas										
48		Day 10 4h post dose										
49		Day 10 4h post dose										
50		Day 10 4h post dose									#DIV/0!	#DIV/0!
51		Day 10 4h post dose										
52		Day 10 4h post dose									#DIV/0!	
53		Gas										
54		Gas										
55		Gas										
56		Day 10 5h post dose										
57		Day 10 5h post dose										
58		Day 10 5h post dose									#DIV/0!	#DIV/0!
59		Day 10 5h post dose										
60		Day 10 5h post dose									#DIV/0!	
61		Gas										
62		Gas										
63		Gas										
64		MTV - Standard Sample - TAP										
65		MTV - Standard Sample - TAP									#DIV/0!	#DIV/0!
66		MTV - Standard Sample - TAP										
67		MTV - Standard Sample - TAP									#DIV/0!	
68		MTV - Standard Sample - TAP										
69		Gas										
70		Gas										
71		Gas										
72		V55 - Standard Sample - HIGHT										
73		V55 - Standard Sample - HIGHT									#DIV/0!	#DIV/0!
74		V55 - Standard Sample - HIGHT										
75		V55 - Standard Sample - HIGHT									#DIV/0!	
76		V55 - Standard Sample - HIGHT										
77												
78												
79												
80												

- Average of MTW from the beginning and ends of the running analyze.
- Average of WS5 from the beginning and ends of the running analyze.
- Last 3 replicate values of the sample from
- Average of the last 3 replicates value of the sample.
- Standard Deviation of the last 3 replicates of the sample.
- Average Value of the Sample after applying the equation to normalize

e) Correction of the Memory Effect in Deuterium Analysis

The isotope term “memory effects” indicates situation in which the isotopic composition from a high enrichment sample affects the following

analysis. The memory effect during the conversion of H₂O to H₂ is typically overcome after repeated injections of each sample until a value reaches the equilibrium plateau.

When there is a large difference (200 ‰ or more) in the deuterium enrichment between two different samples analyzed, equations are applied with the aim to correct the memory effects (Figure 3).

Figure 3 shows these equations. In column “D” called memory step 1 (Figure 3) is calculated the percentage of memory effects between the last and the first replicate of one sample in relation to the last replicate of this sample and the last replicate of the sample analyzed before. In the memory step 2 column “E” (Figure 3) is calculated the percentage of memory effects between the last and the second replicate of one sample in relation to the last replicate of this sample and the last replicate of the sample analyzed before. The value of this second memory step needs to be lower than the first step. This equation is applied every time on samples with 200 ‰ of difference between them. Later an average of these values are calculated in the column “J”, line 1 and 2.

To correct the memory effects with more precision, an average is calculated with the values of the memory effect from the current day and the last 2 days of analysis (column “J”, line 3 and 4).

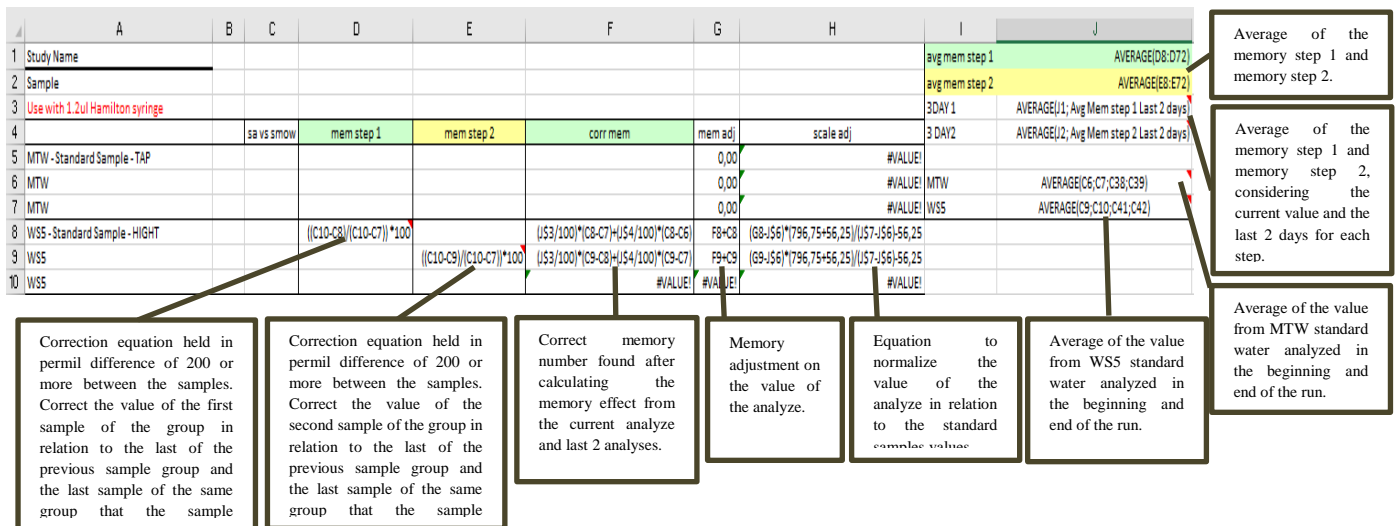
The correcting value of the memory effect is calculated on the column “F”, Multiplying the percentage of the memory mean of step 1 (column J, line 3) with the delta value of the sample in relation to the value of the last sample analyzed above (“Column C line 8” minus “column C, line 7”), and multiplying the percentage of the memory mean of step 2 (column J, line 4) with the delta value of the sample in relation to the value of the last-to-last sample previously analyzed (“Column C line 8” minus “column C, line 6”). These two values of the

multiplying equations are then summed and the corrected value of the memory effect between the analysis are obtained.

In column “G” is calculated the adjusted value of the sample, adding to the value of the sample obtained from the IRMS (column C), the value of the corrected memory effect (Column F).

The last adjustment in the value is done in the column “H” applying an equation to normalize the value in relation the laboratory standards values. This equation is applied in the oxygen-18 results and is explained bellow.

Figure 3. Equations to correct the memory effects in deuterium analysis.

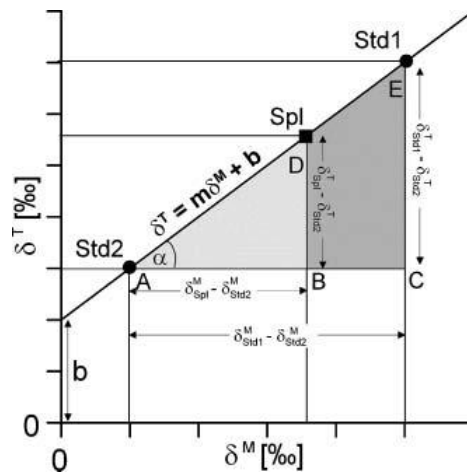


f) Equation to normalize the isotope values.

The normalization of the isotope value has the aim to obtain the true δ -value of the sample and an accurate inter-laboratory comparison of results. This equation is a two-point linear normalization done in the stable isotopic composition of sample, measured relative to the isotopic composition of a reference gas, which converts and reports the value in a respective international stable isotope reference scale.

This normalization is applied for any isotopes values, like ^2H and ^{18}O compounds. The true δ -value of any unknown sample can be estimated using a geometrical relationship between two congruent triangles after plotting the measured value of the reference standards on the X-axis and the true value of these standards on the Y-axis (DEBAJYOTI, SKRZYPEK, FÓRIZS; 2007). Figure 4, illustrated by Debajyoti and collaborators (2007), shows the basis for two-point normalization equation.

Figure 4. The slope ($m = \tan \alpha$) of the regression line, ADE, is represented by the trigonometric relationship between the base and height of two right-angle congruent triangles ABD and ACE (DEBAJYOTI, SKRZYPEK, FÓRIZS; 2007).



The slope (tangent of angle α) of the linear regression is given by equation 1:

$$\text{slope } (m) = \tan \alpha = \frac{\delta_{Spl}^T - \delta_{Std2}^T}{\delta_{Spl}^M - \delta_{Std2}^M} = \frac{\delta_{Std1}^T - \delta_{Std2}^T}{\delta_{Std1}^M - \delta_{Std2}^M} \quad (1)$$

Where:

δ_{Spl}^T = true delta value of the isotope analyzed in any sample.

δ_{Std1}^T = true delta value of the isotope in a standard sample (high enrichment).

δ_{Std2}^T = true delta value of the isotope in a standard sample (low enrichment).

δ_{std1}^M = Measured delta value of the isotope analyzed in a standard sample (high enrichment).

δ_{std2}^M = Measured delta value of the isotope analyzed in a standard sample (low enrichment).

δ_{spl}^M = Measured delta value of the isotope analyzed from any sample.

Simplifying the equation 1 for the δ_{spl}^T , results in equation 2:

$$\delta_{spl}^T = \frac{\delta_{std1}^T - \delta_{std2}^T}{\delta_{std1}^M - \delta_{std2}^M} \times (\delta_{spl}^M - \delta_{std2}^M) + \delta_{std2}^T \quad (2)$$

This equation to normalize the isotopic values is necessary to decrease the errors in the results of the analysis and is applied in all laboratories with stable isotope technique.

g) Calculating Total Energy Expenditure (TEE) and Total Body Water (TBW) using Spreadsheets

I have been studying the equation to determine TEE and TBW since I started my postgraduate studies. During this internship, I had the opportunity to deepen the knowledge about this technique and the equations with the scientist who developed these calculations and with his co-workers.

All of them, Dr. Dale Schoeller, Natalie Racine and Timothy Shriver, who have been working with this technique for many years, shared with me everything that was possible about their knowledge during these six months of internship.

I learned how to work with and calculate the information about TEE and TBW in their spreadsheet, and this allowed me to correct miscalculations in the spreadsheet that I have created was using before this activity. Kindly, they have allowed me to get copies of the spreadsheets of equations they use to start to work with my data in these spreadsheets.

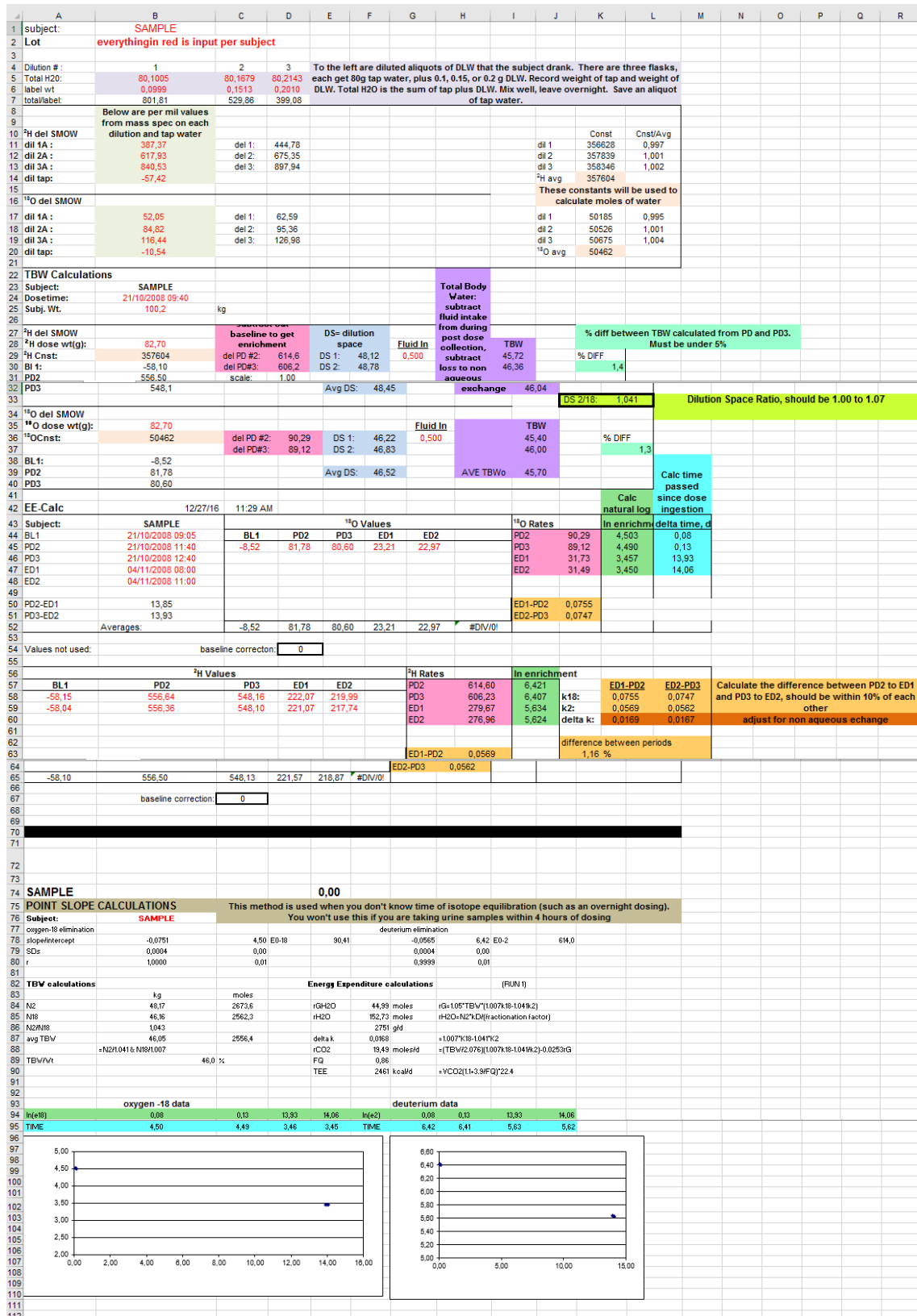
I worked with two (Figure 5) or multiple points equations (Figure 6), designed in spreadsheets considering the quality control parameters to evaluate the quality of the analysis and the results of TEE and TBW.

These spreadsheets are easily used, however, knowledge about equations and metabolism is essential, which will help in the critical evaluation of the results.

Figure 5. Image of the Spreadsheet used to calculate TEE and TBW with two points equation.

isotope		O-18 enrichment						Deuterium enrichment						PPT DATA																				
ID	ID	EE3Prime	EE4Prime	SU3	SU4	zdiff	SU5	SU6	SU3	SU4	zdiff	SU5	SU6	Lot	O-18 const	H-2 const	No	nd	DSratio	ratio	TBW	r-H2O	rCO2-3H	rCO2-4H	zdiff	RQ	TEE	TEE	FFM%	%fat	BMI	ID	Comment	Date Report
check	fbpass	days	days	per mil	per mil	z	per mil	per mil	per mil	per mil	z	per mil	per mil				kg	kg	kg	kg	kg/d	kg/d	kg/d	z		MJ	kcal/d	kg	%					
example	1	13.83	13.83	37.13	86.61	0.543	18.51	18.38	788.3	789.6	1.1%	222.7	218.8	1	44693	370581	36.6	37.1	1.011	0.48	35.5	5.90	21.96	21.62	1.6%	0.86	11.43	2150	48.6	52.6%	35.2	example		

Figure 6. Image of the Spreadsheet used to calculate TEE and TBW with multiple points equation.



h) How the Changes in Isotope Abundance Affect TEE and TBW

The precision and accuracy of the data from IRMS are essential both for the evaluation of inter-laboratory results and for the metabolic outcomes obtained from the analysis. It is required to achieve a small standard deviation between the analysis of the same sample, meaning the value of the analysis achieved the equilibrium plateau and the memory effect in the machine was minimum or null.

In the beginning of my internship, with the aim to start working with the spreadsheets and understand what is happening with the results, Dr. Schoeller has asked me to study and prepare a presentation about "How the changes in isotope abundance affect the TEE and TBW calculation results?".

For this purpose, I worked in his spreadsheet with data from my study to understand what happens when 5.0 ppm or 0.5 ppm is considered an acceptable standard deviation for repetition of the values of ^2H or ^{18}O in the baseline sample analysis.

The first number that I evaluated was the Dilution Space – Ratio (N_d/N_o) (DS-Ratio) of the isotopes in the aqueous and non-aqueous compartments of the body. The acceptable value of the DS-Ratio is 1.00 to 1.070, with the ideal for adults being 1.034 (IAEA, 2009; RACETTE et al., 1994). In a study with data from 2,297 humans which were obtained over the 30 years of work analyzing many samples from metabolic researches in this laboratory, Sagayama and his co-workers (2016), have showed the ideal DS-ratio is 1.035 – 1.037 and the average is 1.036 for adults between 1 and 80 years old.

Even with large changes (± 5.0 ppm) in the values of ^2H or ^{18}O in the baseline samples, the value of the DS-ratio remains within the accepted values described in the literature (IAEA, 2009; RACETTE et al., 1994) (Figure 4).

However, a wrong value in this parameter can affect the calculation of the TEE and TBW, leading to errors in reading and in understanding the physiology of the metabolism.

Table 4. Differences in the dilution space ratio value, accepting ± 5.0 ppm or ± 0.5 ppm in the ^2H and ^{18}O baseline values.

Changes	Isotope Values Baseline (ppm)		Intercept Value		DS-Ratio (N_d/N_o)	Difference (%)
	^{18}O	^2H	^{18}O	^2H		
+ 5.0 ppm	1999.55	160.07	386.24	212.4	1.047 \uparrow	+ 1.07
+ 0.5 ppm	1995.05	155.57	389.88	216.5	1.037 \uparrow	+ 0.10
Right	1994.55	155.07	390.29	217.0	1.036	-
- 0.5 ppm	1994.05	154.57	390.70	217.4	1.035 \downarrow	- 0.10
-5.0 ppm	1989.55	150.07	394.40	221.6	1.025 \downarrow	- 1.06

A variation between $\pm 10\%$ in the value of the TEE and TBW was described, in relation to the right value, after change ± 5.0 ppm in the baseline ^2H or ^{18}O results, and around 1% of difference was previewed when ± 0.5 ppm were acceptable in these results (Table 5 and 6).

Table 5. Differences in the TEE and TBW value, accepting ± 5.0 ppm or ± 0.5 ppm in the ^{18}O baseline values.

Changes	Isotope Values Baseline (ppm)		TEE (kcal)	Difference (%)	TBW (kg)	Difference (%)
	^{18}O	^2H				
+ 5.0 ppm	1999.55	-	2870 \uparrow	+ 11.97	35.62 \uparrow	+ 0.51
+ 0.5 ppm	1995.05	-	2593 \uparrow	+ 1.17	35.45 \uparrow	+ 0.03
Right	1994.55	155.07	2563	-	35.44	
- 0.5 ppm	1994.05	-	2534 \downarrow	- 1.13	35.42 \downarrow	- 0.06
-5.0 ppm	1989.55	-	2277 \downarrow	- 11.16	35.25 \downarrow	- 0.54

The difference of the TEE values means around ± 300 kcal in the energy expenditure in relation to the real outcome (Table 5 and 6). This large variance in the energy expenditure can affect considerably the comprehension of the metabolic response and the real results of a study.

Table 6. Differences in the TEE and TBW value, accepting ± 5.0 ppm or ± 0.5 ppm in the ^2H baseline values.

Changes	Isotope Values Baseline (ppm)		TEE (kcal)	Difference (%)	TBW (kg)	Difference (%)
	^{18}O	^2H				
+ 5.0 ppm	-	160.07	2262↓	- 11.74	35.82↑	+ 1.07
+ 0.5 ppm	-	155.57	2535↓	- 1.09	35.47↑	+ 0.09
Right	1994.55	155.07	2563	-	35.44	
- 0.5 ppm	-	154.57	2592↑	+ 1.13	35.40↓	- 0.11
-5.0 ppm	-	150.07	2833↑	+ 10.54	35.07↓	- 1.04

Reliable outcomes can be obtained certifying the quality of the results from the analysis. Some errors in the results can be from problems with the analysis in IRMS such as low repeatability in the values, accepting large standard deviation between the repeatability of the same sample, and problems with memory effect in the IRMS. Other problems with the values can be from mistakes with the sample collection such as cross-contamination of samples (low or high enrichment), patient error while collecting the sample, and errors in recording in the date or time of the sample collection.

To ensure the quality of the results, is important to check to some information:

- ✓ The quality control numbers from the MS (Internal References, Memory in the IRMS).
- ✓ The reproducibility of the samples (Low Standard Deviation).
- ✓ The quality control numbers in the TEE sheets.
 - ✓ Dilution Space Ratio
 - ✓ Verify if the values of ^{18}O and ^2H reached the equilibrium plateau, mainly in samples after 4 and 5-hour post-dose.

- ✓ Check if the difference between the isotopes follow the same magnitude and direction, and represent a real physiological response.

i) Working with the Data from my PhD Research.

After learning how to use the spreadsheets and how to critically analyze the results, I started to work with the data from my PhD research.

In meetings with Dr. Schoeller, it was verified that the values of the DLW analysis from my research were not adequate, mainly because of the memory effect in the IRMS analysis. So, we asked the laboratory in Brazil to repeat the analyses of specific days of urine samples (baseline and 1^o, 2^o, 3^o, 12^o, 13^o and 14^o days after the subject has ingested the dose of DLW). The period to repeat the samples of urine has taken longer than we were expecting, and it has delayed the schedule of writing the associated manuscripts.

As the samples were analyzed and sent, I performed the evaluation of the values and calculated the true values using the two-point linear normalization. Subsequently, I calculated the TEE and TBM values in the multipoint worksheet.

The first review of the results was done in meetings with the technician of the laboratory Natalie Racine, who helped me to verify the quality of the results, correct some errors and analyze critically the values. After these consultations, I had meetings with Dr. Schoeller to show him the results and fix some problems in an attempt to obtain the best information about energy expenditure and body water for each subject using math strategies to correct the values.

Some results were not possible to correct mathematically, so we asked the laboratory in Brazil to analyze all fifteen urine samples per subject, and it has helped us to correct the results and obtain better outcomes.

All the researchers in this laboratory have explained the quality control information of the data and, after I finished the equations, they discussed my results with me and helped me to analyze and understand them, mathematically and physiologically. With the right results of the analyses and others parameters of this study, we have started to work with the statistical analyses and prepare data tables.

During the period of this internship, I have done bibliographic survey about the themes that we have discussed and decided which manuscripts to write. With all the information collected in this research, Dr. Schoeller proposed initially three papers to be written, (1) to compare the values of energy expenditure obtained by DLW in relation to prediction equations for obese population; (2) to compare the values of energy expenditure obtained by DLW in relation to prediction equations after 6 and 12 months of bariatric surgery; and (3) to compare the values of body composition obtained by the dilution of the isotopes in the body water in relation to the values obtained by bioimpedance in the period before the bariatric surgery and 6 and 12 months after the procedure.

j. Methodology of Study Variables Presented in this Report

- ***Food Consumption Variables – 24 Hour Register (24hR) and Food Frequency Questionnaire (FFQ)***

24hR: To obtain food consumption information through the 24-hour Register (24hR) participants were asked to record in detail all foods, beverages and dietary supplements consumed on the day, as well as the types and quantities of the preparations. The quantities of food consumed were recorded in home utensil sizes. Later they were transformed into grams of food with the aid of the food consumption assessment table in home utensil sizes (PINHEIRO et al., 2005; IBGE, 2011a). The data of three Rg24h were tabulated in a Microsoft Excel worksheet and the quantitative data of the nutrients consumed were obtained from calculations based on the information related to the consumption of 100 grams of food in the Food Consumption table of the Brazilian population (IBGE, 2011b). The nutrients were then corrected by the variation of intra- and interindividual consumption by means of the single-factor ANOVA statistic.

FFQ: The patients were individually interviewed and asked to provide information on the consumption of the listed foods, consumed or not in the last 30 days. The information was reported at daily, weekly or monthly frequency, and described in home utensil sizes, which were transformed into food grams, with the aid of the food consumption assessment table in home utensil sizes (PINHEIRO et al., 2005; IBGE, 2011a). The data obtained through the FFQ were tabulated in a Microsoft Excel worksheet and the quantitative data of the nutrients consumed were obtained from calculations based on the information

related to the consumption of 100 grams of food in the food consumption table of the Brazilian population (IBGE, 2011b).

- ***Physical Activity Level Variables***

Physical Activity Level (PAL) data were obtained on the same days as 24hR. Participants were asked to record all activities performed during the day, including the time spent in each activity. Information on time spent sleeping, type of commuting (by car, walking, by bus), physical activities performed at work, performance of domestic tasks, leisure activities, sports and scheduled physical exercises performed during the day were recorded.

PAL of the participants was characterized according to the references of the DRIs - Dietary References Intakes (IOM, 2005). The time spent on each activity was multiplied by a factor derived from the metabolic equivalents (METs). Thus, for each activity, an energy cost was obtained, provided by an activity / energy expenditure conversion table that is multiplied by the time of physical activity. For the reported activities that were not in the DRIs table, the compendium of physical activities (AINSWORTH et al., 2000) was used to convert these activities considering the equivalence in the energy expenditure.

The women were classified by the Activity Factor (AF) (Table 7), corresponding to PAL ranges, according to the DRIs document (IOM, 2005) and afterwards the calculation of Total Energy Requirement (TER) was performed.

Table 7. - Classification by Factor Activity (FA) according to Physical Activity Level (PAL)

Classification	PAL	FA
Sedentary	1.0 — 1.4	1.0
Low Active	1.4 — 1.6	1.16
Active	1.6 — 1.9	1.27
Very Active	1.9 —	1.44

- ***Estimation of Total Energy Requirement (TER)***

TER was estimated by predictive equation for overweight adults (Equation 3), described in the references of DRIs (IOM, 2005), according to gender. Age and AF of each woman participant.

$$TER = 448 - (7.95 \times A) + [AF \times (11.4 \times W) + (619 \times H)] \quad (3)$$

Onde:

A = Age (years).

AF = Activity Factor, coefficient of classification derived from the PAL (IOM, 2005).

W = Real Weight (kilograms).

H = High (meters).

- ***Energy Expenditure in Physical Activity (EEPA)***

Energy Expenditure in Physical Activity (EEPA) was monitored using the Actigraph triaxial accelerometer (GT3X, Pensacola, FL), calibrated individually for each participant using the ActiLife 6 software. The equipment (~ 27g; 3.8 x 3.7 x 1.8 cm) was positioned at the waist (right side) using an elastic band. The

participants were instructed to perform routine physical activities using the equipment for two weeks, during which time they carried out the collection of labeled urine with stable isotopes, and remove only during the bath. The data obtained using Actilife 6 software were: kcal/day, percentage of sedentary activity, mild and moderate, and step count (n/day).

- ***Body Composition by Bioimpedance***

Body composition was determined by the InBody 230 (Biospace) equipment, which uses the multi-frequency and segmented direct bioimpedance method. Briefly, the volunteers will remain standing on the equipment for body mass determination. After the initial measurement, the volunteers positioned their hands and feet correctly on the tactile electrodes of the equipment for the impedance measurements. The volunteers were instructed: a) not to bathe in the morning; B) to go to the bathroom at least 30 minutes before the test; And c) do not use metal fittings during the evaluation (eg earrings, watches); D) completely empty the bladder and bowel prior to examination.

- ***Total Energy Expenditure and Body Composition by Doubly Labeled Water***

39. Dose of Doubly Labeled Water (DLW)

The DLW dose was calculated for each period of the study considering that the mean of 50% of the total body mass of the participants was composed of body water, data confirmed by electrical bioimpedance. The oral dose was 2 grams per kilogram of total body water of oxygen-18 enriched at 10.8 atom%

and 0.12 g per kilogram of total body water of deuterium enriched at 99.8 atom%. An aliquot of 2 mL of the dose was separated into cryotube, closed and sealed with parafilm for analysis and use of the isotope values in the equations. The patients were instructed to fast for 12 hours. They could drink water during this period. The dose of DLW was ingested with the aid of a straw to avoid losses. Subsequently, to ensure complete ingestion of the dose, 50mL of potable water was administered twice in the same vial of the dose.

40. Sample collection and analysis

Baseline urine samples were collected pre-dose and daily for 14 days. The patients were instructed to discard the first urine of the day and collect the samples at the same time, noting it in each collection bottle. The samples were kept under refrigeration until delivery at the clinic. After being collected, the urine samples were pipetted into 4.5 ml cryotubes which were sealed with parafilm and stored in a refrigerator.

The baseline samples, 1st, 2nd, 3rd, 12th, 13th and 14th days after the dose were analyzed in triplicate in Isotope Ratio Mass Spectrometry (IRMS), models Hydra 20-20 and Hydra 20-22, Europe Scientific – Cheshire/UK, to obtain the isotopic turnover of the compounds enriched in body water.

41. Equations

To determine the Total Energy Expenditure (TEE) and body composition in lean mass and fat mass for each subject in each period of the protocol, the equations were developed according to the protocol proposed by Dr. Dale Schoeller, in his IRMS Laboratory, which is similar to the protocol proposed by

the International Atomic Energy Agency (INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, 2009).

i. Calculation of the isotope dilution space (equation 4)

$$N_x = \left[\left(W \times \frac{A}{a} \right) \times \left(\frac{\Delta DD}{\Delta BW} \right) \right] \div 1000$$

(4)

Where:

N_x = Dilution Space for each isotope, in kilograms.

W = Amount of TAP water used to prepare the Diluted Dose.

A = Dose of DLW offered to the participant.

a = Amount of the DLW used for the "diluted dose"

ΔDD = Excess of isotope enrichment, measured in the diluted dose, in ppm.

ΔBW = Antilog of the Y intercept value in the Napierian Logarithm (Ln) graph of excess isotope enrichment in body water versus time.

ii. Calculation of Total Body Water (TBW)

TBW was calculated from the dilution space (N_x) divided by the isotope exchange factor with the non-aqueous space, which is 1.007 for ¹⁸O and 1.041 for ²H.

TBW from ¹⁸O dilution space (equation 5):

$$TBW_o = \frac{N_o}{1.007} \tag{5}$$

Where:

TBW_0 = Total Body Water from the ^{18}O dilution space.

N_0 = Dilution space of the ^{18}O .

TBW from the 2H dilution space (equation 6):

$$TBW_D = \frac{N_D}{1.041} \quad (6)$$

Where:

TBW_D = Total Body Water from the 2H dilution space.

N_D = Dilution space of the 2H .

Average of total body water (equation 7):

$$TBW_{méd} = \frac{TBW_D + TBW_0}{2} \quad (7)$$

Where:

$TBW_{méd}$ = Average of Total Body Water.

TBW_D = Total Body Water from the 2H dilution space.

TBW_0 = Total Body Water from the ^{18}O dilution space.

iii. Calculation of body composition

Fat Free Mass (FFM) (equation 8) was determined through the mammalian hydration constant (73.2%) and the Fat Mass (FM) (equation 9) by subtracting the value of FMM from the Real Weight (RW):

$$FFM = \frac{TBW \text{ (kg)}}{0.732} \quad (8)$$

Where:

FFM = Fat Free Mass, in kilograms.

TBW = *Total Body Water* (average of both isotopes).

$$FM = RW - FFM \quad (9)$$

Where:

FM = Fat Mass, in kilograms.

RW = Real Weight, in kilograms.

FFM = Fat Free Mass, in kilograms.

iv. Calculation of CO₂ production and Total Energy Expenditure (TEE)

To calculate the TEE, the average of TBW was converted from kilograms to moles (equation 10), and the value obtained was used in the equation of the CO₂ Production Rate:

$$TBW_{avg}(mol) = \frac{TBW_{avg}(kg) \times 1000}{18.015} \quad (10)$$

Where:

TBW = Total Body Water, in kilograms

18.015 = Constant of the molecular weight of water.

The elimination rates of the isotopes (K_D and K_O) are the value of the slope (ln) of enrichment of body water in function of time since dose consumption.

CO₂ Production Rate (equation 11):

$$rCO_2 \text{ (mol. d}^{-1}\text{)} = 0.455 \times TBW \text{ (mol)} \times [(1.007 \times -K_O) - (1.041 \times -K_D)]$$

(91)

Where:

rCO₂: CO₂ Production Rate (mol/day).

0.455 = Constant of the fractionation factors (f_1 ; f_2 ; f_3) of the isotopes in water vapor and in CO₂ production.

TBW = Amount of TBW obtained by the dilution space equation (moles).

1.007 = Correction of the ¹⁸O dilution space.

K_O = ¹⁸O exchange constant.

1.041 = Correction of the ²H dilution space.

K_D = ²H exchange constant.

The production of rCO₂ (equation 12) in mol.d⁻¹ was transformed into gas (L.d⁻¹) through the constant 22.414.

$$rCO_2 \text{ (L. d}^{-1}\text{)} = rCO_2 \text{ (mol. d}^{-1}\text{)} \times 22.4$$

(12)

Where:

rCO₂ = Rate of CO₂ production, in liters and moles per day.

22.4 = Constant for transformation in liters and moles per day.

Calculation of Total Energy Expenditure

The value of the TEE was obtained through the Weir's equation (13).

$$TEE (Kcal. d^{-1}) = rCO_2(L. d^{-1}) \times \left(1,10 + \frac{3,90}{FQ}\right)$$

(13)

Where:

TEE = Total Energy Expenditure (kcal/day).

rCO₂(L. d⁻¹) = Rate of CO₂ production (liters/day).

FQ = Food Quotient, used 0.86.

v. Statistical Analysis

We have worked with simple statistics for the report, but the manuscripts will use robust statistical analysis. Data were tabulated and tested for normality by the Kolmogorov-Smirnov test. The variables have showed normality, being expressed in mean and standard deviation (SD). The variables according to the time of surgery (before, 6 and 12 months after) were tested by ANOVA method followed by TUKEY test. Variables of different groups (> and < weight loss) were tested by the T-test method. Statistical analyzes were performed in the IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0 software. Armonk, NY: IBM Corp.

vi. Results

Twenty-two obese women who underwent to bariatric surgery participated in the study, however, the data of 6 and 12 months refer to 20 and 18 women, respectively, since one of them has gave up participating after surgery, two were unable to participate in the data collection in the 6th period and the data of body composition and energy metabolism (DLW information) in the period of the 12th postoperative month were inadequate for other two participants (Table 8).

Comparing the data between the periods (before, 6th and 12th months after the surgery) significant difference ($p < 0.05$) was evidenced for body composition, energy metabolism, energy consumption and for some nutrient consumption reported data. This difference was not showed for data about PAL, percentage of sedentary or light activity, number of step and additional sugar and fiber consumption reported in 24hR and FFQ (Table 8).

Table 9 presents the delta values (difference between the value of the variables in periods 6th and 12th months and value of the variables in the preoperative period) between the variables analyzed for groups classified with greater or lesser weight loss, in each collection period with the objective of evidencing possible variables associated to the lower weight loss.

Less weight loss ($> 20\text{kg} < 30\text{kg}$) was observed in 9 participants at the time of 6 months' post-surgery, while 11 presented weight loss equal to or greater than 30kg during the 6 postoperative months. At 12 months after the surgery, 8 women have showed weight loss between 20 to 35kg, and 12 presented weight loss equal to or greater than 35 kg (Table 9).

In both the 6-month and 12-month postoperative periods, the delta values for the variables BMI (kg/m^2), excess weight lost (kg and %), fat mass evaluated by DLW and bioimpedance and TEE (kcal / day) were significantly

higher for the group of women with greater weight loss (> 30 kg and > 35 kg). The consumption of protein and fat, in the 6 and 12 postoperative months respectively, had the lowest consumption reported in the 24-hour registry for the group of women with the highest weight loss. The other variables did not present a significant difference between the groups (Table 9).

Table 8. General information of the participants in the research at the pre, six and twelve months after surgery.

General Information	Before Surgery (n=20)	6 months after surgery (n=20)	12 months after surgery (n=18)	P
	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	
Body Weight (kg)	112.4 ± 7.4 ^a	81.8 ± 7.5 ^b	75.1 ± 8.8 ^c	<0.001
BMI (kg/m ²)	44.9 ± 2.4 ^a	32.7 ± 3.0 ^b	30.0 ± 3.7 ^c	<0.001
Excess of Weight (kg)	54.8 ± 6.6 ^a	24.2 ± 7.6 ^b	17.5 ± 9.1 ^c	<0.001
Excess of Weight (%)	95.4 ± 11.8 ^a	42.3 ± 13.7 ^b	30.6 ± 16.4 ^c	<0.001
PAL– DRI	1.9 ± 0.2	1.9 ± 0.3	1.9 ± 0.2	0.98
TER – DRI (kcal)	3274 ± 313 ^a	2840 ± 258 ^b	2720 ± 256 ^b	<0.001
EEPA (Kcal/day) - accelerometer	1035 ± 384 ^a	750 ± 216 ^b	762 ± 263 ^b	0.005
% Sedentary / day	75.8 ± 6.4	75.7 ± 5.8	74.2 ± 7.0	0.67
% Light Activity / day	21.4 ± 5.4	20.9 ± 5.0	51.8 ± 5.8	0.86
% Moderate Activity / day	2.8 ± 1.4 ^a	3.4 ± 1.1 ^{a,b}	4.2 ± 1.9 ^b	0.02
Nº of steps / day	7895 ± 3232	8529 ± 2782	9499 ± 3826	0.31
TBW (kg)- DLW	39.3 ± 3.4 ^a	35.5 ± 3.4 ^b	35.1 ± 3.3 ^b	<0.001
FFM (Kg) – DLW	53.9 ± 4.7 ^a	48.6 ± 4.7 ^b	48.1 ± 4.6 ^b	<0.001
BF (%) – DLW	52.0 ± 3.2 ^a	40.3 ± 6.0 ^b	34.8 ± 6.3 ^c	<0.001
TEE (kcal / day) – DLW	2930 ± 524 ^a	2319 ± 430 ^b	2538 ± 336 ^b	<0.001
TEE/FFM (kcal/kg) - DLW	54.4 ± 8.3 ^a	47.9 ± 8.7 ^b	52.9 ± 6.5 ^{a,b}	0.034
TBW (kg) - BIA	38.6 ± 2.6 ^a	34.2 ± 2.7 ^b	33.9 ± 3.0 ^b	<0.001
FFM (kg)- BIA	52.6 ± 3.6 ^a	46.8 ± 3.7 ^b	46.3 ± 4.1 ^b	<0.001
BF (%) - BIA	52.8 ± 1.7 ^a	41.4 ± 5.2 ^b	37.3 ± 6.9 ^c	<0.001
Skeletal Muscle Mass (kg) - BIA	29.6 ± 2.3 ^a	25.5 ± 2.3 ^b	25.3 ± 2.5 ^b	<0.001
Elrep (kcal/day)	1405 ± 377 ^a	955 ± 296 ^b	1097 ± 386 ^b	0.001
Carbohydrate (g/day)	163.9 ± 60.9 ^a	114.2 ± 40.6 ^b	129.3 ± 58.3 ^{a,b}	0.014
Protein (g/ day)	79.5 ± 22.7 ^a	56.5 ± 20.2 ^b	54.1 ± 16.0 ^b	<0.001
Total of Fat (g/ day)	50.3 ± 22.0 ^a	30.5 ± 10.7 ^b	37.6 ± 13.7 ^b	0.001
Fatty Acid Saturated (g/ day)	17.6 ± 8.2 ^a	10.3 ± 4.3 ^b	12.7 ± 4.6 ^b	0.001
Additional Sugar (g/ day)	26.3 ± 26.0	17.4 ± 13.3	16.6 ± 14.1	0.197
Fiber (g/ day)	14.1 ± 4.9	10.8 ± 4.4	11.9 ± 5.6	0.108
Elrep (kcal/day)*	1675 ± 632 ^a	1098 ± 504 ^b	1236 ± 560 ^b	0.005
Carbohydrate (g/day) *	211.6 ± 104.8	148.1 ± 91.3	158.5 ± 82.8	0.069
Protein (g/ day) *	79.8 ± 38.0 ^a	55.7 ± 28.8 ^b	58.0 ± 28.9 ^{a,b}	0.034
Total of Fat (g/ day) *	54.1 ± 27.9 ^a	32.8 ± 16.4 ^b	40.6 ± 20.4 ^{a,b}	0.010
Fatty Acid Saturated (g/ day) *	19.9 ± 10.9 ^a	11.6 ± 6.2 ^b	15.0 ± 8.4 ^{a,b}	0.012
Additional Sugar (g/ day) *	54.6 ± 72.5	28.1 ± 43.2	36.1 ± 37.1	0.26
Fiber (g/ day) *	17.2 ± 7.3	14.7 ± 11.0	15.8 ± 9.3	0.69

p < 0.05 for ANOVA.

Medians followed by the same letter did not differ significantly at the 5% level by the Wilcoxon test. BMI = Body Mass Index; PAL – DRI = Physical Activity Level – *Dietary Reference Intake*; EEPA = Energy Expenditure in Physical Activity; TBW = Total Body Water obtained by Doubly Labeled Water; FFM = Fat Free Mass obtained by Doubly Labeled Water; BF = Body Fat obtained by Doubly Labeled Water; TEE = Total Energy Expenditure obtained by Doubly Labeled Water; TBW – BIA = Total Body Water obtained by bioimpedance electric; FFM = Fat Free Mass obtained by bioimpedance electric; FM = Fat Mass obtained by bioimpedance electric; Elrep = Energy Ingestion reported. * Estimated energy and nutrient intake through a Food Frequency Questionnaire (FFQ).

Table 9. Differences between the variables evaluated at the pre and postoperative moments between a group of women with greater and lesser weight loss.

Study Variables (Difference between periods)	Period 6 months in relation to initial			Period 12 months in relation to initial		
	Weight Loss ≥ 20kg < 30kg (n=9)	Weight Loss ≥ 30 kg (n=11)	p	Weight Loss ≥ 20kg < 35kg (n=8)	Weight Loss ≥ 35 kg (n=12)	p
	Mean ± SD	Mean ± SD		Mean ± SD	Mean ± SD	
Body Weight (kg)	-26.8 ± 2.5	-33.7 ± 3.4	<0.001	-31.4 ± 4.2	-41.3 ± 5.3	<0.001
BMI (kg/m ²)	-10.8 ± 1.0	-13.3 ± 1.1	<0.001	-12.6 ± 1.7	-16.4 ± 1.6	<0.001
Excess of Weight (kg)	-26.8 ± 2.5	-33.7 ± 3.4	<0.001	-31.4 ± 4.2	-41.3 ± 5.3	<0.001
Excess of Weight (%)	51.6 ± 8.5	60.5 ± 9.9	0.043	60.0 ± 11.8	74.9 ± 12.7	0.017
PAL– DRI	0.15 ± 0.45	-0.10 ± 0.26	0.17	0.1 ± 0.3	0.0 ± 0.3	0.50
TER – DRI (kcal)	-337 ± 303	-514 ± 252	0.18	-460 ± 285	-789 ± 408	0.054
EEPA (Kcal/day) - accelerometer	-177 ± 357	-373 ± 307	0.21	-113 ± 320	-379 ± 400	0.12
% Sedentary / day	-0.6 ± 7.4	0.4 ± 3.6	0.70	-4.3 ± 4.2	0.2 ± 8.4	0.14
% Light Activity / day	-0.2 ± 5.7	-0.7 ± 3.0	0.80	3.0 ± 3.8	-1.2 ± 6.7	0.09
% Moderate Activity / day	0.8 ± 1.9	0.4 ± 1.2	0.58	1.2 ± 1.9	1.5 ± 2.2	0.75
Nº of steps / day	1237 ± 3898	140 ± 2643	0.48	2225 ± 4054	1189 ± 3918	0.58
TBW (kg)- DLW	-3.5 ± 0.9	-4.2 ± 1.7	0.25	-3.4 ± 2.2	-5.1 ± 3.5	0.23
FFM (Kg) – DLW	-4.7 ± 1.3	-5.7 ± 2.4	0.25	-4.6 ± 3.0	-7.0 ± 4.8	0.23
FM (%) – DLW	-9.9 ± 2.4	-13.2 ± 4.3	0.048	-14,3 ± 2.1	-18.7 ± 5.9	0.043
TEE (kcal / day) – DLW	-455 ± 211	-738 ± 312	0.027	-6 ± 523	-596 ± 620	0.047
TEE/FFM (kcal/kg) - DLW	-4.3 ± 4.6	-8.2 ± 5.2	0.092	4.6 ± 11.5	-3.9 ± 11.9	0.16
TBW (kg) - BIA	-4.2 ± 0.9	-4.6 ± 1.1	0.39	-4,3 ± 1.3	-5.0 ± 1.5	0.33
FFM (kg)- BIA	-5.5 ± 1.2	-6.0 ± 1.6	0.48	-5.8 ± 1.8	-6.6 ± 2.1	0.36
FM (%) - BIA	-9.3 ± 3.4	-13.1 ± 3.9	0.032	-11.1 ± 4.7	-18.3 ± 5.2	0.005
Skeletal Muscle Mass (kg) - BIA	-3.9 ± 0.8	-4.3 ± 1.0	0.29	-4.0 ± 1.0	-4.5 ± 1.2	0.24
Elrep (kcal/day)	-191± 456	-656 ± 557	0.055	-84 ± 319	-475 ± 563	0.07
Carbohydrate (g/day)	-14.4 ± 67.9	-79,0 ± 84.0	0.74	-4.5 ± 68.4	-53.7 ± 84.1	0.18
Protein (g/ day)	-7.8 ± 24.9	-36.0 ± 27.9	0.028	-19.6 ± 21.2	-32.5 ± 30.1	0.29
Total of Fat (g/ day)	-10.3 ± 22.6	-26.8 ± 28+9	0.17	1.4 ± 13.0	-24.2 ± 24.7	0.01
Fatty Acid Saturated (g/ day)	-4.6 ± 8.1	-9.2 ± 11.4	0.30	0.1 ± 5.5	-52.6 ± 143.2	0.25
Additional Sugar (g/ day)	-4.2 ± 31.3	-14.5 ± 35.1	0.50	-6.4 ± 28.3	-22.1 ± 38.1	0.32
Fiber (g/ day)	-0.7 ± 5.7	-5.1 ± 7.4	0.16	0.8 ± 8.6	-3.5 ± 8.9	0.30
Elrep (kcal/day)*	-510 ± 645	-667 ± 878	0.65	-209 ± 663	-603± 851	0.26
Carbohydrate (g/day) *	-18.9 ± 64.5	-96.3 ± 174.2	0.20	15.7 ± 110.7	-97.4 ± 152.3	0.07
Protein (g/ day) *	-33.3 ± 56.9	-20.5 ± 26.3	0.55	-33.1 ± 48.5	-13.6 ± 28.1	0.33
Total of Fat (g/ day) *	-39.7 ± 33.0	-17.6 ± 22.8	0.37	-14.4 ± 25.9	-14.7 ± 24.3	0.98
Fatty Acid Saturated (g/ day) *	-11.8 ± 12.0	-65.4 ± 195.2	0.38	-4.9 ± 8.0	-5.3 ± 9.8	0.93
Additional Sugar (g/ day) *	-12.7 ± 26.0	-40.2 ± 112.5	0.45	13.3 ± 48.6	-42,5 ± 99.4	0.11
Fiber (g/ day) *	2.0 ± 11.0	-4.9 ± 10.5	0.18	2.8 ± 11.9	-2.5 ± 10.9	0.32

p ≤ 0.05 for T-Test.

BMI = Body Mass Index; PAL – DRI = Physical Activity Level – *Dietary Reference Intake*; EEPA = Energy Expenditure in Physical Activity; TBW = Total Body Water obtained by Doubly Labeled

Water; FFM = Fat Free Mass obtained by Doubly Labeled Water; FM = Fat Mass obtained by Doubly Labeled Water; TEE = Total Energy Expenditure obtained by Doubly Labeled Water; TBW – BIA = Total Body Water obtained by bioimpedance electric; FFM = Fat Free Mass obtained by bioimpedance electric; FM = Fat Mass obtained by bioimpedance electric; Elrep = Energy Ingestion reported.

* Estimated nutrient intake through a Food Frequency Questionnaire (FFQ).

j) Inter-laboratory Discussion of Memory Effect of Brazilian Equipment and Correction Methods

During meetings with Dr. Schoeller, we discussed my analyses which was done in Brazil and the problem with the memory effect, common in pyrolysis technique. He has given some tips to correct the memory effect in our analyses.

He explained the importance of achieving equilibrium plateau to ensure the right value of the sample. For this, Dr. Schoeller has advised to analyze as many times as necessary a water sample with natural abundance until achieving values with low standard deviation. Another tip he has given us was about analysis block of samples in enrichment range around 200‰, as many times as necessary, until reaching the equilibrium plateau.

With his help, the technicians and researcher in our laboratory in Brazil are doing analysis in samples and trying to fix this problem in the pyrolysis IRMS machine.

k) Other Activities

During the internship, I have had the opportunity do other activities which improved my knowledge and professional experience.

- 1. Follow the activities of the researchers*

I participated in activities that the technicians performed during my period in their laboratory. I followed their jobs of analysis of samples with doubly labeled water, analysis of the data and discussion of these with Dr. Schoeller.

Tim Shriver taught me about the IRMS machines and their devices. He showed me activities about the analysis, cleaning the devices, changing the columns of analyses, changing the gases and about analyzing the results.

Natalie Racine helped me with the weighing the doses, with the preparation of the dose diluted and the equations about this procedure. She has taught me about the equations in the spreadsheets, how to analyze the results and fix some problems.

Dr. Schoeller helped me with the TEE and TBW equations. He taught me to understand the values of the analyses in the IRMS. He helped me to think how to correct some wrong numbers from the analyzes and try to get better results using math corrections. We had meetings weekly or every fifteen days to discuss results of my research. I also followed the meetings with his technicians to discuss data from other researchers.

2. Meet new researchers

Besides meeting the researchers who work in this laboratory I had the opportunity to absorb information and learn about their jobs. I have had the opportunity to establish contacts with new researchers from different areas and research lines.

Dr. Hiroyuki Sagayama, a post-doctoral researcher from Japan, was working in this laboratory with results from 30 years of analyses of this laboratory and is applying a new study in a Cavity Ring-Down Spectroscopy (CRDS) machine – Picarro) to standardize the technique of analysis of doubly

labeled water in body fluids. With this researcher, I have followed the activities of this experiment during the end of my time in the laboratory.

Another opportunity I had was to meet researchers who work with animal sciences. Our laboratory in Brazil, which works with stable isotopes in many areas of the discipline is looking towards applying the DLW technique in broilers chickens. For this purpose, a Brazilian researcher who works in this area has come to IRMS laboratory in UW-Madison for a technical visit with the aim to know the technique and make contact with researchers who work in the DLW and broilers chickens' areas. I had the opportunity to participate in her meetings with these researchers and make new contacts.

I had meetings with Dr. William Karasov, a researcher who works with DLW in small birds. He introduced me and the researcher from Brazil to his experiments and taught us how to use the TEE and TBW equations for small animals. He has sent papers about small animals and agreed to be a collaborator in future research with this technique in small birds.

I have made a contact with Dr. Daniel E. Butz who works in research with chickens and humans applying stable isotopes. He introduced his work to me and the researcher from Brazil, showing us the results in his studies. I had an interesting contact with him after I told him about our studies in Brazil with breath tests with stable isotopes. We have created a great possibility of partnership for future metabolic research in humans using the breath test.

1) Importance of this internship for the researches in my country

All the knowledge that I have learned during this internship will allow me to help the researchers and the laboratories in Brazil that use the DLW technique. I will be able to critically analyze the results from DLW analyses and

ensure quality results. I will also be able to help the researchers with the equations to determine the TEE and TBW, analyzing the quality of the results in a physiologically and mathematically way.

m) Limitations and difficulties

The main limitation during this period was the poor results of my doubly labeled water analyses. It was necessary to reanalyze the samples again in the laboratory in Brazil, during my internship abroad, and it took more time than the expected. Unfortunately, this delayed the time for the beginning of the statistical analyzes of my results and consequently the writing of the articles.

4. Chronogram

All activities scheduled for this stage were performed as described in the chronogram, except for the preparation of the papers that, due to the delay in the labeled urine analysis, started after the scheduled period.

Table 10. Calendar for carrying out the research internship abroad.

Activities	1st Month	2nd Month	3rd Month	4th Month	5th Month	6th Month
Accomplish contacts with exchanges of information. thus favoring future partnerships.	X	X	X	X	X	X
Accompany the work of students from prof. Dale A. Schoeller.	X	X	X	X	X	X
Participate in a project that is somewhat similar to my proposed project.	X	X	X	X	X	X
Collaborate in the activities to be performed in the Laboratory of Professor Dale A. Schoeller.	X	X	X	X	X	X
Learn more about the doubly labeled water technique.	X	X	X			
Organize all my results for the writing and preparation of manuscripts and perform the writing of the manuscript with the collaboration of Professor Dale A. Schoeller.			X	X	X	X
Discuss a post-doctoral project for future activities.				X	X	X
Confection my internship report in late outside.					X	X

5. Application of the resources of the Technical Reserve

The resource of the Technical Reserve has not been used.

6. Importance of this internship in the view of Dr. Schoeller:

The internship was highly important to the development of Michele Novaes Ravelli's research skills for the study of human energy metabolism, obesity, and its treatment. It provided her with an opportunity to gain in depth knowledge of the theory and application of doubly labeled water method, the interactions between energy expenditure and obesity and weight loss, body composition, and the technical details of oxygen and hydrogen stable isotope analysis.

Ms. Ravelli took full advantage of this opportunity and dramatically increased these research skills as listed above. Although she had previous basic knowledge in regard to these research skills from extensive reading of the scientific literature, she was able to complement these with practical experience and practice these skills in relation to her research project. In so doing, the internship allowed her to move from a basic level knowledge about these topics to one of a deep understanding of these topics. While that expertise will expand with, and deepen as it does for all scientists with continued research, the internship has greatly increased her research independence in energy metabolism.

At the same time, the internship made it possible to have met with and developed a scientific relationship with other experts in the field who are on the faculty here at the University of Wisconsin. This would not have been possible without the internship. These will be valuable in growing a research portfolio for herself and the university.

In addition, Ms. Ravelli's report will serve as an excellent technical document to support the use of the isotope ratio core in Brazil for the analysis of labeled water in the study of body composition and energy expenditure. The internship made it possible to incorporate many practical details into the report which because of her face-to-face interaction with experienced staff and her hands-on experience.

References

AINSWORTH, B.E. et al. **Compendium of physical activities: an update of activity codes and MET intensities.** *Medicine & Science in Sports & Exercise*, vol. **32** (supl. 9), p. 498-516, 2000.

CAREY, D.G. et al. **Body Composition and Metabolic Changes Following Bariatric Surgery: Effects on Fat Mass, Lean Mass and Basal Metabolic Rate.** *Obes. Surg.* Vol. 16 (4), p. 469-477, 2006. DOI:10.1381/096089206776327378

CHUMLEA, W.C. et al. Body composition estimates from NHANES III bioelectrical impedance data. *Int J Obes Relat Metab Disord.*, vol **26** (12), p. 1596-609, 2002.

COUPAYE, M. et al. **One-Year Changes in Energy Expenditure and Serum Leptin Following Adjustable Gastric Banding in Obese Women.** *Obesity Surgery*, vol. 15, p. 827-833, 2005.

DEBAJYOTI, P.; SKRZYPEK, G.; FÓRIZS, I. **Normalization of measured stable isotopic compositions to isotope reference scales – a review.** *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, Vol. 21, p. 3006–3014, 2007. DOI: 10.1002/rcm.3185

FOGAÇA, K.C.P. **Investigação de Fatores envolvidos na Recuperação de Peso após Derivação Gástrica.** [tese de doutorado]. Programa de Pós - graduação em Alimentos e Nutrição. UNESP – Fcfar, 2009.

HEILBRONN, L.K. et al. **Effect of 6-Month Calorie Restriction on Biomarkers of Longevity, Metabolic Adaptation, and Oxidative Stress in Overweight Individuals - A Randomized Controlled Trial.** *JAMA.* vol. 295. p. 1539-1548. 2006.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. **Assessment of body composition and total energy expenditure in humans using stable isotope techniques.** IAEA Human Health Series, nº 3. Vienna, July, 2009.

LEIBEL., R.L.. ROSENBAUM, M.; HIRSCH, J. **Changes in energy expenditure resulting from altered body weight.** *N. Engl. J. Med.*, vol. 332, p. 621-628, 1995. [Erratum. *N Engl J Med* 1995;333:399].

OLIVEIRA, M.R.M. et al. **Body weight and Energy Intake and Expenditure in Bariatric Surgery.** In: *Advanced Bariatric and Metabolic Surgery.* Dr. Chih-Kun Huang (Ed.), 2011. ISBN: 978-953-307-926-4, InTech. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/advanced-bariatric-andmetabolic-surgery/body-weight-and-energy-balance-after-bariatric-surgery>>

RACETTE, S.B.; SCHOELLER, D.A.; LUKE, A.H.; SHAY, K.; HNILICKA, J.; KUSHNER, R.F. **Relative dilution spaces of ²H- and ¹⁸O-labeled water in humans.** *Am J Physiol Endocrinol Metab.* vol. 267, p. E585–E590, 1994.

REDMAN, L.M. et al. **Metabolic and Behavioral Compensations in Response to Caloric Restriction: Implications for the Maintenance of Weight Loss.** PLoS ONE, vol. 4, n^o. 2 e4377, 2009. doi:10.1371/journal.pone.0004377.

SAGAYAMA, H; YAMADA, Y; 4 RACINE, N.M.; SHRIVER, T. C.; SCHOELLER, D.A.; DLW Study Group. **Dilution space ratio of ²H and ¹⁸O of doubly labeled water method in humans.** J Appl Physiol., vol. 120, p. 1349–1354, 2016. doi:10.1152/jappphysiol.01037.2015.

SCHOELLER. D.A. **Energy expenditure from doubly labeled water: some fundamental considerations in humans.** Am J Clin Nutr., vol. 38(6), p.999-1005, 1983.

SUN. S.S. et al. **Development of bioelectrical impedance analysis prediction equations for body composition with the use of a multicomponent model for use in epidemiologic surveys.** Am J Clin Nutr., vol. 77(2), p. 331-40, 2003.

ANEXOS

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

FACULDADE DE MEDICINA DE
BOTUCATU -UNESP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE FATORES METABÓLICOS E GENÉTICOS SOBRE A HOMEOSTASE ENERGÉTICA NA CIRURGIA BARIÁTRICA.

Pesquisador: Maria Rita Marques de Oliveira

Área Temática: Área 1. Genética Humana.

(Trata-se de pesquisa envolvendo genética humana não contemplada acima.);

Versão: 1

CAAE: 15935713.9.0000.5411

Instituição Proponente: Instituto de Biociências de Botucatu

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 306.538

Data da Relatoria: 17/06/2013

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um ensaio clínico randomizado, a ser realizado em três etapas, uma no momento pré-cirurgia e duas após a realização do procedimento cirúrgico, sendo estes nos períodos 6 e 12 meses após o procedimento. Serão preenchidos questionários de identificação, de consumo alimentar e de atividade física, bem como serão aferidas medidas antropométricas das pacientes. Amostras de sangue em jejum e pós-prandial serão coletadas com o objetivo de dosagens bioquímicas e hormonais. Amostras de urina pré e após dose de água duplamente marcada serão obtidas para avaliação do gasto energético total. O teste do sopro será realizado antes e após o consumo de uma refeição padronizada com o objetivo de avaliar o metabolismo energético de determinadas fontes de carbono. Serão obtidas informações de gasto energético em repouso, gasto energético em atividade física e composição corporal por meio dos equipamentos de calorimetria indireta, acelerômetro e bioimpedância elétrica.

Objetivo da Pesquisa:

Avallar a resposta do peso corporal à cirurgia bariátrica sob a influência de fatores associados ao metabolismo energético, à composição corporal, à regulação hormonal do apetite e ao processo de oxidação pós-prandial, 6 e 12 meses após o procedimento.

Endereço: Chácara Butignoli, s/n

Bairro: Rubião Junior

CEP: 18.618-070

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1008

E-mail: cepellup@fmb.unesp.br

Continuação do Parecer: 306.538

Objetivo Secundário:

Avallar o comportamento do Gasto Energético Total e seus componentes, nos momentos pré e pós-operatórios. Avallar a composição corporal e sua influência sobre os componentes do GET, nos momentos pré e pós-operatórios. Avallar a associação da concentração e expressão gênica de hormônios do apetite com os componentes do GET e da composição corporal, nos momentos pré e pós-operatórios. Avallar a associação dos componentes do metabolismo energético, da composição corporal e das concentrações hormonais sobre o processo de oxidação pós-prandial.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os autores colocam que não existe risco relacionado as atividades propostas, sendo possível haver desconforto devido às horas necessárias para a pesquisa e desconforto no momento de obtenção do material biológico necessário às análises (sangue, ar expirado e urina). Os autores não mencionam os riscos cirurgicos - é possível que isto decorra do fato de que a cirurgia é um procedimento que não esta incluído no protocolo de pesquisa (as pacientes farao a cirurgia em funcao de suas condicoes clinicas, apos a avaliacao pela equipe). Como possíveis benefícios os autores apontam: uma melhor conscientizacao dos pacientes no que tane a alimentacao e a obesidade, o que pode prover melhor qualidade de vida.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto relevante, factível, bem estruturado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE eta na forma de convite e todos as declaracoes necessarias e suficientes form incluidas.

Recomendações:

Nada a declarar.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não identifico pendencias a este projeto.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto de pesquisa aprovado em reunião EXTRAORDINÁRIA de 17/06/2013, sem necessidade de

Endereço: Chácara Butignoli, s/n

Bairro: Rubião Junior

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1608

CEP: 18.618-670

E-mail: capellup@fmb.unesp.br

ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome do Paciente: _____	Registro Clínica: _____	
Data de Nascimento: ___/___/_____	Idade: _____	Estado Civil: _____
Endereço: _____		
Telefones de Contato: () _____, () _____		RG: _____

Eu _____, estou sendo convidada a participar do estudo denominado "Avaliação da influência de fatores metabólicos e genéticos sobre a homeostase energética na cirurgia bariátrica", cujo objetivo geral é: avaliar a resposta do peso corporal à cirurgia da obesidade sob a influência de fatores associados ao metabolismo energético, à composição corporal, à regulação hormonal do apetite e ao processo de oxidação (uso de nutrientes pelo organismo) após consumo de alimentos, 6 e 12 meses após o procedimento.

Sendo os objetivos específicos:

- Avaliar o comportamento do Gasto Energético Total (GET) e seus componentes, nos momentos pré e após a cirurgia.
- Avaliar a composição corporal e sua influência sobre os componentes do GET, nos momentos pré e após a cirurgia.
- Avaliar a associação genética dos hormônios do apetite com os componentes do GET e da composição corporal, nos momentos pré e pós-operatórios.
- Avaliar a associação dos componentes do metabolismo energético, da composição corporal e das concentrações hormonais sobre o processo de oxidação após o consumo de alimentos.

A realização do estudo justifica-se uma vez que as pesquisas tem comprovado que a cirurgia bariátrica é um procedimento efetivo no controle do peso corporal e das doenças associadas à obesidade com respostas muito superiores aos tratamentos clínicos. No entanto, é verificado que estas respostas são diferentes entre os indivíduos obesos, uma vez que uma pequena parcela desta população não se beneficia com os resultados da cirurgia, obtendo emagrecimento menor que o esperado e até mesmo recuperando peso. Os motivos que levam ao insucesso da cirurgia não estão bem esclarecidos, indicando a necessidade de aprofundamento nas pesquisas para que se esclareçam as diferentes respostas deste procedimento e que possam apoiar, de maneira mais segura, a escolha para o procedimento cirúrgico e se desenvolvam abordagens mais efetivas de cuidado deste paciente.

A minha participação no referido estudo será no sentido de preencher um questionário de identificação, de consumo alimentar e de atividade física, permitir a coleta de sangue em períodos determinados, coletar amostras de minha urina e do meu ar expirado (teste do sopro) no momento pré e momentos após a ingestão da água marcada e do consumo de uma refeição padronizada, respectivamente. Além disso, informações de composição corporal, gasto de energia de repouso e gasto de energia em atividade física

também serão coletadas com os exames de bioimpedância elétrica e calorimetria indireta e com o uso equipamento chamado acelerômetro, respectivamente.

Fui informada de que a água marcada contém odor, sabor, textura e cor idênticas ao de água mineral e que não há risco radioativo quanto ao consumo desta água, uma vez que este produto é preparado com elementos químicos inofensivos ao organismo (isótopos estáveis).

Fui alertada de que, da pesquisa a ser realizada, poderei obter benefícios, tais como me conscientizar sobre a importância da alimentação nutricionalmente equilibrada para o controle da obesidade e manutenção do peso perdido e sobre as atividades associadas à alimentação saudável que melhorem a minha qualidade de vida pré e após o procedimento cirúrgico.

Estou ciente de que minha privacidade será respeitada, ou seja, meu nome ou qualquer outro dado ou elemento que possa, de qualquer forma, me identificar, será mantido em sigilo.

Também fui informada de que posso me recusar a participar do estudo, ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar, e de, por desejar sair da pesquisa, não sofrerei qualquer prejuízo à assistência que venho recebendo e ao procedimento cirúrgico do qual estarei aguardando e serei submetida para o tratamento da obesidade.

É assegurada a assistência durante toda pesquisa, bem como me é garantido o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas consequências, ou seja, tudo o que eu queira saber antes, durante e depois da minha participação.

Enfim, tendo sido orientada quanto ao teor de todo o aqui mencionado e compreendido a natureza e o objetivo do já referido estudo, manifesto meu livre consentimento em participar, estando totalmente ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou a pagar, por minha participação.

Receberei cópia deste documento, devidamente assinado pelas pessoas responsáveis pelo estudo.

Participante da Pesquisa

Michele Novaes Ravelli – Nutricionista Pesquisadora

Profa. Dra. Maria Rita Marques de Oliveira – Coordenadora da Pesquisa

Coordenadora da Pesquisa: Profª Drª Maria Rita Marques de Oliveira
Instituto de Biociências de Botucatu, Departamento de Nutrição - UNESP, Rubião Júnior, CEP: 18.600-000, Botucatu- SP. Tel. (14)3880-0163.

Nutricionista Pesquisadora: Michele Novaes Ravelli.

Rua Agamenor Nogueira, 1476, casa D, Vila São Lucas, CEP: 18603-198, Botucatu-SP. (14)99646-3842.

Responsável pela Clínica Bariátrica: Dr. Irineu Razzari Júnior.

Rua Rafael Aloisi, 62 – CEP: 13405-205, Vila Rezenda, Piracicaba/SP. Fone: (19)3421-9100.

Para qualquer informação adicional poderá entrar em contato com o Comitê de Ética e Pesquisa – CEP, pelo telefone: (14) 3880-1609.

Piracicaba _____, de _____ de 20__.