**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA**

PAULA CAROLINA BEZZAN PISI

**Influência da perda de peso induzida por cirurgia bariátrica na resposta
imune em pacientes com obesidade grau III**

**Ribeirão Preto
- 2016 -**

PAULA CAROLINA BEZZAN PISI

**Influência da perda de peso induzida por cirurgia bariátrica na resposta
imune em pacientes com obesidade grau III**

Tese apresentada à Pós-Graduação da Faculdade
de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo, para obtenção do Título de Doutora em
Clínica Médica

Área de Concentração: Clínica Médica.

ORIENTADORA: PROF(A). DRA. MARIA CRISTINA FOSS-FREITAS

**Ribeirão Preto
- 2016 -**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Pisi, Paula Carolina Bezzan

Influência da perda de peso induzida por cirurgia bariátrica na resposta imune em pacientes com obesidade grau III. Ribeirão Preto, 2016.

102 p.: il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Clínica Médica.

Orientador(a): Foss-Freitas, Maria Cristina.

1. obesidade; 2. inflamação; 3. mononucleares de sangue periférico;
4. cultura de células.

Paula Carolina Bezzan Pisi

Influência da perda de peso induzida por cirurgia bariátrica na resposta imune em pacientes com obesidade grau III

Tese apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo, para obtenção do Título de Doutora em Clínica
Médica

Área de Concentração: Clínica Médica

Ribeirão Preto, ____ de _____ de 2016.

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Ao Paulo, meu amado esposo, por compreender
minha dedicação ao projeto e conceder paz e
doçura aos meus dias.

Ao meu filho Pedro, que dá sentido a tudo.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, que precede e sustenta meus passos.

Agradeço aos meus 30 voluntários, pois sem eles o trabalho não teria sido possível.

Aos meus pais, Ivo e Liege, pelo amor incondicional, incentivo e exemplo de vida.

A Clevocir, por estar sempre presente e dividir as dificuldades e conquistas.

Aos irmãos, cunhados, cunhadas, sobrinhos, sobrinhas, Dona Elvira que me apoiaram e torceram sinceramente por mim.

A minha orientadora, professora doutora Maria Cristina Foss-Freitas, pelos ensinamentos e estímulo à pesquisa.

Ao professor doutor Milton César Foss, pela oportunidade de aprendizado.

À médica Patrícia Moreira, pelo suporte e por ser exemplo brilhante de profissional e pessoa.

À professora doutora Vivian Marques Miguel Suen, que contribuiu na seleção dos primeiros voluntários.

Ao médico Márcio Henrique Vieira Ferracioli, por sua ajuda imprescindível.

Ao nutricionista Rafael Ferraz, pela ajuda na confecção dos gráficos.

Ao Renan Pisi, pela ajuda na adaptação das figuras.

A técnica do Laboratório de Cultura de Células da FMRP-USP, Maria Aparecida Nunes Ferreira, pela ajuda com as culturas de células e dosagem das citocinas.

À técnica do Laboratório de Osteometabolismo da FMRP-USP, Marta Nakao, pela ajuda com as dosagens de insulina.

Às queridas amigas Marina, Christiane, Camila, Soraia, Nathalie e Adriana, pelo apoio e incentivo constantes.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo apoio financeiro para realização deste estudo.

RESUMO

PISI, PCB. **Influência da perda de peso induzida por cirurgia bariátrica na resposta imune em pacientes com obesidade grau III. 2016.** 102 p. Tese (Doutorado). – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

A inflamação associada à obesidade é caracterizada por uma ativação crônica e de baixa intensidade do sistema imune. Diversos autores demonstraram mudanças em parâmetros inflamatórios após perda de peso. A cirurgia bariátrica é um método para tratar obesidade com alta eficiência e menor risco de recidiva. Os mononucleares de sangue periférico (MNSP) constituem um material biológico interessante para pesquisa, visto a capacidade de refletir alterações de expressão gênica de diferentes tecidos e o fácil acesso para análise. O presente estudo teve por objetivo avaliar os efeitos da obesidade e da perda de peso induzida por cirurgia bariátrica sobre a atividade imunológica, por meio de cultura primária de MNSP de pacientes com obesidade grau III ($\text{IMC} \geq 40 \text{ kg/m}^2$). Foram coletadas amostras de sangue de veia periférica de 10 voluntários com peso normal (grupo controle) e antes e após a cirurgia de 20 voluntários com obesidade grau III. Após a separação dos mononucleares pelo gradiente de Ficoll-HyPaque, as células foram estimuladas por lipopolissacarídeo (LPS) ou concanavalina A (Con-A) e os sobrenadantes das culturas coletados para dosagem de IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ , IL-10 e IL-17 por teste ELISA. As amostras de sangue também foram utilizadas para exames bioquímicos, dosagens de adiponectina, leptina e citocinas séricas. Os resultados evidenciaram maiores concentrações de IL-6, TNF- α , IL-1 β e IL-10 nos sobrenadantes das culturas de MNSP do grupo com obesidade em relação ao grupo controle. Na comparação entre dosagens de citocinas do grupo com obesidade, observamos redução de TNF- α , IL-1 β e IL-10 após 6 meses da cirurgia, a qual não foi observada após 1 ano, e aumento de IL-17 após 1 ano de tratamento. Não houve diferença significativa nas concentrações de citocinas séricas na comparação entre os grupos com obesidade e controle ou pré e pós-operatório. Observamos correlações das citocinas de sobrenadante das culturas de MNSP e séricas com resultados laboratoriais relacionados à homeostase glicêmica em pacientes com obesidade antes e após a cirurgia bariátrica, além da correlação entre citocinas do sobrenadante e o estado de adiposidade no pós-operatório. Concluimos que a obesidade grau III está associada a modificações da produção de citocinas por MNSP e a perda de peso induzida por cirurgia bariátrica influencia esta produção no primeiro ano de tratamento.

Palavras-chave: obesidade, inflamação, mononucleares de sangue periférico, cultura de células.

ABSTRACT

PISI, PCB. **Influence of weight loss induced by bariatric surgery on immune response in morbidly obese patients.** 2016. 102 p. Thesis - School of Medicine at Ribeirão Preto, University of São Paulo.

The obesity-associated inflammation is characterized by a chronic and low intensity activation of the immune system. Several authors have shown changes in inflammatory parameters after weight loss. Bariatric surgery is a method for treating obesity with high efficiency and less risk of recurrence. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) are an interesting biological material for research, due to the ability to reflect changes in gene expression in different tissues and easy access to analysis. This study aimed to evaluate the effects of obesity and weight loss induced by bariatric surgery on immune activity through PBMC culture of morbidly obese patients ($\text{BMI} \geq 40 \text{ kg/m}^2$). Peripheral vein blood samples were collected from 10 volunteers with normal weight (control group) and before and after the surgery in 20 volunteers with morbid obesity. After separation of the mononuclear cells by Ficoll-Hypaque gradient centrifugation, cells were stimulated with lipopolysaccharide (LPS) and concanavalin A (Con-A) and culture supernatants collected for IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ , IL-10 and IL-17 dosage by ELISA. Blood samples were also used for biochemical examinations and adiponectin, leptin and serum cytokine dosage. The results showed higher concentrations of IL-6, TNF- α , IL-1 β and IL-10 in the supernatants of the MNSP cultures of the obesity group in relation to the control group. In the comparison between cytokine dosages of the obesity group, we observed reduction of TNF- α , IL-1 β and IL-10 after 6 months of surgery, which was not observed after 1 year, and IL-17 increased after 1 year of treatment. There was no significant difference in serum cytokine concentrations in the comparison between obesity and control groups or operated group. We observed correlations of cytokines obtained in PBMC culture supernatant and serum with laboratory results related to glucose homeostasis in patients with obesity before and after bariatric surgery, as well as correlation between cytokines of the supernatant and the state of adiposity postoperatively. We conclude that morbid obesity is associated with changes in cytokine production by PMNC and weight loss induced by bariatric surgery influences cytokine production in the first year of treatment.

Keywords: Obesity, inflammation, peripheral blood mononuclear cell, cell culture.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização da casuística.....	54
Tabela 2. Características antropométricas e laboratoriais do grupo controle e do grupo com obesidade antes da cirurgia bariátrica	55
Tabela 3. Características antropométricas e laboratoriais do grupo com obesidade antes e após cirurgia bariátrica.....	56
Tabela 4. Dosagem de citocinas no soro dos grupos controle e com obesidade antes e após cirurgia bariátrica	65
Tabela 5. Correlação entre produção de citocinas em cultura de mononucleares estimulados do grupo com obesidade antes e após cirurgia bariátrica.....	66
Tabela 6 - Correlação entre produção de citocinas em cultura de mononucleares estimulados e características clínicas e laboratoriais do grupo com obesidade antes da cirurgia bariátrica.....	67
Tabela 7 - Correlação entre produção de citocinas em cultura de mononucleares estimulados e características clínicas e laboratoriais do grupo com obesidade após cirurgia bariátrica.....	68
Tabela 8. Correlação entre dosagens séricas de citocinas e características clínicas e laboratoriais do grupo com obesidade antes da cirurgia	69
Tabela 9. Correlação entre dosagens séricas de citocinas e características clínicas e laboratoriais do grupo com obesidade após cirurgia bariátrica.....	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenvolvimento da inflamação do tecido adiposo na obesidade.....	30
Figura 2. Intersecção de vias moleculares na inflamação e obesidade.....	31
Figura 3. Relação da metainflamação com fisiopatologia de doenças associadas à obesidade.....	35
Figura 4. Produção de citocinas por células mononucleares, de pacientes no pré-operatório de cirurgia bariátrica e controles, estimuladas em cultura.....	58
Figura 5. Produção de citocinas por células mononucleares, de pacientes no pré e pós-operatórios de cirurgia bariátrica, estimuladas em cultura.....	59
Figura 6. Produção de citocinas por células mononucleares, de pacientes no pré e pós-operatório de cirurgia bariátrica e controles, estimuladas em cultura.....	60
Figura 7. Diferença entre produção de citocinas por células mononucleares, de pacientes no pré-operatório de cirurgia bariátrica e controles, estimuladas ou não estimuladas em cultura.....	62
Figura 8. Diferença entre produção de citocinas por células mononucleares, de pacientes no pré e pós-operatórios de cirurgia bariátrica, estimuladas ou não estimuladas em cultura.....	63
Figura 9. Diferença entre produção de citocinas por células mononucleares, de pacientes no pré e pós-operatório de cirurgia bariátrica e controles, estimuladas ou não estimuladas em cultura.....	64
Figura 10. Representação esquemática das conclusões.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS

- AGL** – Ácidos graxos livres
- ATDSC** – *Adipose tissue-derived stem cell*
- ATM** – *Adipose tissue macrophage*
- BIA** – Bioimpedância elétrica
- CLR** – *C-type lectin receptor*
- ConA** – Concanavalina – A
- CT** – Colesterol total
- DGYR** – Derivação gastrojejunal com reconstrução em Y de Roux
- DM2** – Diabetes mellitus tipo 2
- DNA** - Ácido desoxirribonucleico
- ECA** – Enzima conversora de angiotensina I
- ELISA** – Ensaio de imunoabsorção ligado à enzima
- FABP-4** – *Fatty acid binding protein 4*
- FMRP** – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
- GPX-3** – *Glutathione peroxidase 3*
- HC-FMRP** – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
- HDL** – *High density lipoprotein*
- HOMA-IR** – *Homeostasis Model Assessment Insulin Resistance*
- HSL-RP** – Hospital São Lucas de Ribeirão Preto
- IBGE** – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- ICAM-1** – *Intercellular adhesion molecule-1*
- IFN- γ** - Interferon-*gamma*
- IKB** – Inibidor do fator de transcrição *kappa B*
- IKK** – Quinase do inibidor do fator de transcrição *kappa B*
- IL** – Interleucina
- IMC** – Índice de massa corporal
- iNK** – *Natural killer* invariante
- IRS-1** – Substrato do receptor de insulina 1
- JAK-2** – *Janus kinase-2*
- JNK** – *c-Jun NH2-terminal kinase*
- LCR** – Líquido cefalorraquidiano
- LDL** – *Low-density lipoprotein*

LPS – Lipopolissacarídeo

MAIT – *Mucosal associated invariant T-cell*

MAPK – *Mitogen-activated protein kinase*

MHC – *Major histocompatibility complex*

MIF - *Migration inhibitor factor*

MMP-9 - *Matrix metalloproteinase-9*

MNSP – Mononucleares de sangue periférico

mTOR - *Mammalian target of rapamycin*

MyD88 – Proteína de diferenciação mieloide 88

NFκB – Fator de transcrição nuclear *kappa* B

NK – *Natural killer*

NLR – *Nod-like receptor*

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCR – Proteína C reativa

PKR – Proteína quinase dependente do RNA

PO – Pós-operatório

POF – Pesquisa de Orçamentos Familiares

RE – Retículo endoplasmático

RNA – Ácido ribonucleico

ROS – *Reactive species of oxygen*

SOS – *Swedish Obese Subjects*

TAB – Tecido adiposo branco

TAS – Tecido adiposo subcutâneo

TAV – Tecido adiposo visceral

Tc – T citotóxico

TG – Triglicerídeos

TGF-β – *Transforming growth factor-beta*

Th – *T helper*

TLR – *Toll-like receptor*

TNF-α – *Tumor necrosis factor-alpha*

Treg – T regulador

UPR – *Unfolded protein response*

VCAM-1 – *Vascular cell adhesion molecule-1*

ZAG – Zinco-alfa 2-glicoproteína

SUMÁRIO

Resumo	
Abstract	
Lista de Figuras	
Lista de Tabelas	
Lista de Abreviaturas	
1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Obesidade.....	17
1.2 Cirurgia bariátrica.....	20
1.3 Tecido adiposo como órgão endócrino.....	21
1.4 Inflamação e obesidade.....	24
1.4.1 Definição e aspectos históricos.....	24
1.4.2 Visão geral do sistema imunológico.....	25
1.4.3 Sistema imunológico inato e obesidade.....	27
1.4.4 Sistema imunológico adaptativo e obesidade.....	28
1.4.5 Desencadeantes da resposta imune na obesidade.....	30
1.4.6 Inflamação na interface entre obesidade e outras patologias.....	34
1.5 Efeito da perda de peso na inflamação.....	38
1.6 Mononucleares do sangue periférico.....	40
2. OBJETIVOS.....	43
2.1 Objetivo geral.....	44
2.2 Objetivos específicos.....	44
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	45
3.1 Casuística e critérios de inclusão.....	46
3.2 Critérios de exclusão.....	46
3.3 Métodos.....	46
3.4 Exames laboratoriais.....	48
3.5 Avaliação imunológica.....	49
3.5.1 Método de separação das células.....	49
3.5.2 Cultura de macrófagos.....	50
3.5.3 Cultura de linfócitos.....	51

3.5.4 Detecção de citocinas em sobrenadante de cultura primária de mononucleares de sangue periférico.....	51
3.5.5 Detecção de citocinas séricas.....	52
3.6 Análise estatística.....	52
4. RESULTADOS.....	53
4.1 Antropometria e exames laboratoriais.....	54
4.2 Parâmetros imunológicos.....	57
4.2.1 Comparação da produção de citocinas por células mononucleares estimuladas.....	57
4.2.2 Comparação da diferença entre a produção de citocinas por células mononucleares estimuladas ou não estimuladas em cultura.....	61
4.2.3 Comparação dos níveis séricos de citocinas.....	65
4.2.4 Correlações dos parâmetros imunológicos.....	65
5. DISCUSSÃO.....	71
6. CONCLUSÃO.....	81
7. REFERÊNCIAS.....	84
8. ANEXOS	98
Anexo A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).....	99
Anexo B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	100

1. INTRODUÇÃO

1. 1 Obesidade

A obesidade é uma condição crônica, multifatorial e epidêmica caracterizada pelo excesso absoluto ou relativo de reservas corporais de gordura. A Organização Mundial da Saúde (OMS) definiu em 1997 o diagnóstico de excesso de peso por meio do índice de massa corpórea (IMC), variável calculada através do peso (em quilos) e altura (metros) (Organization, 2015).

A classificação do peso corporal segundo a OMS define: sobrepeso IMC na faixa 25 – 29,9 kg/m², obesidade grau I IMC na faixa 30 – 34,9 kg/m², obesidade grau II IMC na faixa 35 – 39,9 kg/m² e obesidade grau III IMC maior ou igual a 40 kg/m² (Alberti e Zimmet, 1998).

O tecido adiposo está anatomicamente distribuído em diferentes proporções no corpo humano. Um padrão de distribuição androide de gordura (em tronco ou central) associa-se a maior risco de doença do que um padrão de distribuição ginecoide (em extremidades ou periférica). O IMC é uma ferramenta essencial para avaliação do perfil nutricional dos indivíduos ao longo do tempo. Entretanto o IMC deve ser interpretado em conjunto com a determinação da massa gorda e a distribuição da gordura no corpo.

A impedância bioelétrica ou bioimpedância (BIA) é um método de avaliação da composição corporal com base na condução de uma corrente elétrica de baixa intensidade através do corpo. As medidas fornecidas pela BIA são decorrentes de medidas da água corporal e, a partir de equações preditivas validadas para uma população, estimam massa gorda, massa livre de gordura e água corporal total. Estudos propõem valores do percentual de massa gorda conforme faixas de IMC, idade e etnia. Em termos gerais, o percentual de normalidade de massa gorda é em torno de 12% para homens e 15% para mulheres (Gallagher *et al.*, 2000)

Segundo a OMS, em 2014, 39% dos adultos com idade maior de 18 anos estavam acima do peso (IMC $\geq$ 25 kg/m²) e 13% eram obesos, 11% dos homens e 15% das mulheres. Assim, cerca de dois bilhões de adultos em todo o mundo estão acima do peso e, destes, mais de meio bilhão são obesos (Organization, 2015).

No Brasil, a Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) 2008-2009, realizada por uma parceria entre o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) e o Ministério da Saúde, verificou que aproximadamente 50% da população adulta têm excesso de peso, sendo que 12,5% dos homens e 16,9% das mulheres têm diagnóstico de obesidade (Estatística, 2010).

Quanto à obesidade grau III, não há dados bem definidos, porém de acordo com estudo realizado em 2007, a prevalência de obesos com IMC maior ou igual a 40 kg/m² na

população brasileira apresentou um crescimento de 255% em 30 anos, passando de 0,18% em 1974-1975 para 0,33% em 1989 e 0,64% em 2002-2003 (De Oliveira, 2007).

A obesidade e sobrepeso estão associados a inúmeras patologias e por isso o excesso de peso provoca grande impacto na saúde pública. As principais doenças crônicas associadas ao sobrepeso são: doença cardiovascular, diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2), dislipidemia, hipertensão arterial, colelitíase, osteoartrose, apneia do sono, demência, distúrbios psiquiátricos e certos tipos de câncer (DeFronzo e Ferrannini, 1991; Field *et al.*, 2001; Calle *et al.*, 2003; De Sousa *et al.*, 2008; Koyama *et al.*, 2013)

A obesidade também aumenta a susceptibilidade a infecções. Crianças e adultos obesos mostram uma incidência elevada de infecções nosocomiais e comunitárias (Martí *et al.*, 2001). Vários estudos realizados após a pandemia de infecção por Influenza H1N1 em 2009 demonstraram um pior desfecho desta infecção em pacientes com obesidade, os quais mostraram maior número de hospitalização, maior duração de internação em unidade de terapia intensiva e uso de ventilação mecânica e maior taxa de mortalidade comparada com indivíduos com peso normal (Genoni *et al.*, 2014). Mais ainda, a obesidade pode alterar a farmacocinética dos antibióticos e afetar as respostas às vacinas (Bearden e Rodvold, 2000).

Durante muito tempo a obesidade foi considerada consequência apenas de fatores comportamentais. Entretanto, hoje a obesidade é vista como uma doença complexa, na qual inúmeros fatores genéticos, ambientais e comportamentais causam um desequilíbrio energético que resulta no acúmulo excessivo de tecido adiposo (Stunkard *et al.*, 1986; Whitaker *et al.*, 1997).

Os seres humanos e os mamíferos em geral, são capazes de equiparar a ingestão alimentar ao gasto energético, o que possibilita a manutenção do peso corporal por longos períodos de tempo. Isso é resultado de um complexo sistema de regulação da homeostase energética, que atua principalmente por meio da integração de sinais periféricos a centros reguladores hipotalâmicos. O desequilíbrio energético é determinado por um ou mais dos seguintes fatores, que atuam de forma conjugada ou alternada: aumento da ingestão alimentar, diminuição do gasto energético, aumento da capacidade de estocar gordura, diminuição da capacidade de oxidação da gordura. Cada um desses fatores, por sua vez, tem múltiplas causas (Cone e Elmquist, 2008).

A adequação da ingestão calórica e o incremento da atividade física são estratégias fundamentais para ajuste do peso corporal. O tratamento da obesidade não deve ser em curto prazo, mas um contínuo ao longo da vida para manutenção do peso normal ou o mais próximo do normal (Elfhag e Rössner, 2005).

O indivíduo com obesidade deve ser avaliado profundamente em relação a erros em hábitos alimentares e de atividade física, presença de complicações ou doenças associadas à obesidade, tratamentos prévios e possibilidade de desenvolvimento de efeitos colaterais. O tratamento farmacológico só se justifica em conjunção com orientações dietéticas e mudança de estilo de vida. Os agentes farmacológicos ajudam a aumentar a adesão dos pacientes a mudanças nutricionais e comportamentais.

Os tratamentos medicamentosos para obesidade podem ser classificados de acordo com o mecanismo envolvido na promoção do balanço energético negativo. No Brasil, as drogas antiobesidade disponíveis são sibutramina, liraglutida e orlistate. Enquanto as duas primeiras têm o mecanismo de reduzir a ingestão energética, o orlistate tem o mecanismo de mudar o metabolismo normal de nutrientes. Outras medicações frequentemente usadas para tratamento de obesidade não têm esta indicação em bula, como topiramato, bupropiona, sertralina e fluoxetina. Apesar da quantidade de perda de peso imputável às medicações antiobesidade seja modesta (em média 2,5 a 5,8 kg), esse montante tem se mostrado suficiente para melhorar o controle de doenças associadas à obesidade (Mordes *et al.*, 2015).

O termo cirurgia bariátrica reúne técnicas cirúrgicas com respaldo científico destinadas ao tratamento da obesidade (Buchwald e Williams, 2004). Trata-se de um método com maior eficiência e menor risco de recidiva em comparação ao tratamento clínico para obesidade (Sjöström *et al.*, 2007). Utiliza-se o IMC para standardizar a indicação do tratamento operatório da obesidade. De acordo com portaria do Ministério da Saúde de 2013, no Brasil o tratamento cirúrgico para obesidade é indicado (Padilha, 2013):

- a. Indivíduos que apresentem IMC maior ou igual a 50 kg/m²;
- b. Indivíduos que apresentem IMC maior ou igual a 40 kg/m², com ou sem comorbidades;
- c. Indivíduos com IMC maior que 35 kg/m² e com comorbidades, tais como pessoas com alto risco cardiovascular, diabetes *mellitus* e/ou hipertensão arterial sistêmica de difícil controle, apneia do sono, doenças articulares degenerativas;

A portaria define que indivíduos elegíveis a cirurgia bariátrica devam ter ausência de resposta ao tratamento clínico longitudinal, que inclui orientação e apoio para mudança de hábitos, realização de dieta, atenção psicológica, prescrição de atividade física e, se necessário, farmacoterapia, realizado na Atenção Básica e/ou Atenção Ambulatorial Especializada por no mínimo dois anos e que tenham seguido protocolos clínicos.

1.2 Cirurgia bariátrica

Os primeiros experimentos com cirurgia bariátrica utilizaram cães submetidos a diferentes tipos de desvios intestinais, de modo a provocar emagrecimento intenso, sem, no entanto, comprometer a sobrevivência do animal. Apesar de Dr. Richard Varco ter provavelmente realizado em 1954 o primeiro *bypass* jejunoileal especificamente para redução de peso, a primeira publicação científica com resultados de uma série de 10 cirurgias realizadas em mulheres obesas para emagrecimento (*bypass* jejunocolônico) foi em 1963. A redução da capacidade gástrica, restringindo a ingestão de alimentos iniciou-se com Mason e Ito em 1967 (Buchwald e Buchwald, 2002).

A derivação gastrojejunal que conhecemos atualmente, com a bolsa junto à pequena curvatura gástrica, foi introduzida por Torres e Oca no início da década de 1980. Esses mesmos autores introduziram o conceito dos diferentes tamanhos de alças, visando maior ou menor perda ponderal. Fobi e Capella aprimoraram a derivação gastrojejunal com reconstrução em Y-de-Roux (DGYR) com anel de restrição e padronizaram, cada qual com seus próprios pormenores técnicos, esta técnica cirúrgica (Capella *et al.*, 1991; Fobi, 1991).

A padronização das técnicas cirúrgicas, a evolução do material cirúrgico e equipamentos anestésicos associadas a bons resultados levaram, a partir do final da década de 1990, a um aumento expressivo do número de cirurgias bariátricas realizadas, passando de aproximadamente 10.000/ano nos EUA, em 1998, para 100.000/ano em 2003 (Buchwald *et al.*, 2004).

A redução da porcentagem de gordura corporal observada após a cirurgia bariátrica está associada à redução da resistência periférica à insulina, melhora de doenças metabólicas, além de benefícios mecânicos e hemodinâmicos.

O estudo *Swedish Obese Subjects* (SOS) demonstrou a superioridade do tratamento cirúrgico da obesidade quando comparado ao tratamento clínico. Além da maior perda de peso sustentada no grupo operado, os autores observaram melhora substancial no controle do DM2, hipertrigliceridemia, hiperuricemia e aumento dos níveis da lipoproteína de alta densidade (HDL, do inglês *High Density Lipoprotein*). Além disso, observou-se que os procedimentos ditos restritivos produzem perda de peso menor em comparação aos procedimentos denominados mistos (Sjöström *et al.*, 2000). Em 2007, pesquisadores publicaram a comparação da mortalidade por todas as causas dos participantes do SOS durante o tempo médio de 10,9 anos de acompanhamento. Os pacientes submetidos ao

tratamento cirúrgico tiveram redução da mortalidade quando comparados ao grupo controle (Sjöström *et al.*, 2007).

Em geral, as técnicas cirúrgicas para tratamento da obesidade são classificadas como:

- a) Restritivas: banda gástrica ajustável laparoscópica e gastroplastia vertical laparoscópica – *sleeve*. Neste grupo, é criado um pequeno reservatório gástrico que comporta reduzida quantidade de alimento e que leva à saciedade precoce.
- b) Restritiva e disabsortiva: derivação gástrica com reconstrução em Y-de-Roux (DGYR); derivação biliopancreática e sua variante com preservação do piloro – *duodenal switch*. Nestas técnicas há associação de restrição gástrica à derivação do duodeno e do jejuno.
- c) Disabsortivas: derivação jejuno-ileal. Neste grupo ocorre maior disabsorção de nutrientes, já que somente no íleo terminal os alimentos ingeridos entram em contato com o suco pancreático. Cirurgias disabsortivas não são mais aprovadas para realização.

A DGYR compreende a construção de uma pequena bolsa gástrica de aproximadamente 25 mL de volume, que é conectada a um segmento distal do jejuno (chamada alça alimentar). O estômago excluído é deixado *in situ*, mas desconectado do fluxo de alimentos e é ligado à alça alimentar por uma anastomose jejunojejunal formando a alça biliopancreática. A perda de peso esperada após DGYR é de 68% do excesso de peso (Inabnet *et al.*, 2005).

1.3 Tecido adiposo como órgão endócrino

O tecido adiposo branco (TAB) é o tipo de gordura predominante em mamíferos adultos e pode ser dividido nos compartimentos subcutâneo (tecido adiposo subcutâneo, TAS) e visceral (tecido adiposo visceral, TAV). As características metabólicas destes tecidos são distintas, sendo que o TAV exibe maior correlação com síndrome metabólica e risco cardiovascular (Fox *et al.*, 2007).

O TAB contém adipócitos com uma única inclusão lipídica grande, com o citoplasma comprimido em uma borda fina. O tecido conectivo ao redor do adipócito contém células precursoras, fibroblastos, células do sistema imunológico, fibras reticulares e nervos não mielinizados. O tecido adiposo secreta peptídeos bioativos, coletivamente chamados

adipocinas, que têm um papel central na homeostase energética e vascular, bem como na imunidade (Macdougald e Burant, 2007).

As adipocinas produzidas no TAB têm ação autócrina, parácrina e endócrina, podendo ser classificadas como citocinas, hormônios, fatores de crescimento, ácido graxo livre e proteínas de ação cardiovascular (Trayhurn e Wood, 2004).

Com o aumento da adiposidade, muitas adipocinas relacionadas à patogênese da resistência à insulina e síndrome metabólica encontram-se elevadas. Ao contrário, algumas adipocinas com propriedades anti-inflamatórias ou insulina-sensibilizantes, como a adiponectina, estão diminuídas. Na obesidade, a resistência à ação de adipocinas pode impedir seus efeitos, como o que ocorre com a leptina. Virtualmente todas as adipocinas conhecidas estão marcadamente desreguladas na obesidade (Maury e Brichard, 2010).

Proteína C Reativa (PCR), haptoglobina e proteína amilóide A são proteínas de fase aguda liberadas primariamente pelo fígado, em resposta a um estado inflamatório leve observado em humanos obesos. Algumas adipocinas não têm suas origens bem esclarecidas. Em revisão de 2010, Fain JN comparou a liberação de trinta e sete adipocinas por células adiposas e não adiposas do tecido adiposo humano e o efeito da obesidade nos níveis circulantes. Sumarizando os resultados do estudo, apenas quatro adipocinas foram mais expressas em adipócitos: leptina, proteína ligadora de ácido graxo (*fatty acid binding protein 4* - FABP-4), peroxidase glutathione 3 (*glutathione peroxidase 3* - GPX3) e adiponectina. Outras adipocinas, como interleucina (IL)- 8, inibidor do ativador do plasminogênio-1 (*plasminogen activator inhibitor 1* - PAI-1), proteína quimioatraente de monócitos (*monocyte chemoattractant protein 1* - MCP-1), interleucina (IL)-6, enzima conversora da angiotensina 1 (ECA), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e fator transformador do crescimento- β (*transforming growth factor-beta* - TGF- β) foram secretadas principalmente por célula não adiposas do tecido adiposo, enquanto a omentina e a intelectina foram secretadas por células endoteliais dos vasos sanguíneos do omento, mas não da gordura subcutânea (Fain, 2010).

Os níveis circulatórios da adipocina Zinco- α 2-glicoproteína (ZAG) têm sido reportados como sendo inalterados pelo aumento da adiposidade, mas o nível da expressão do gene ZAG no tecido adiposo humano é reduzido na obesidade (Xu *et al.*, 2006). Este achado ilustra o fato de que mudanças nos níveis circulatórios de adipocinas não necessariamente refletem mudanças na sua liberação ou se correlacionam com níveis de RNA mensageiro no tecido adiposo. Culturas de adipócitos também são limitadas como modelo de funcionamento do tecido adiposo, já que a regulação do metabolismo deste tecido *in vivo* é desempenhada

pela interação da atividade do sistema nervoso autônomo, fluxo sanguíneo e mecanismos de *feedback* por ações autócrinas e parácrinas das adipocinas (Fain *et al.*, 2004).

O TNF- α é produzido principalmente por macrófagos e se liga aos receptores TNFR-1 e TNFR-2, presentes em tecido adiposo, fígado e outros tecidos ligados ao metabolismo (Cawthorn e Sethi, 2008). Os macrófagos no tecido conectivo são responsáveis por quase todo TNF- α expresso pelo tecido adiposo. Duas vias de transcrição de fatores nucleares têm sido ligadas aos efeitos pró-inflamatórios do TNF- α na obesidade: a via de ativação do fator de transcrição nuclear *kappa* B (NF κ B) e a via *c-Jun NH2-terminal kinase* (JNK). A ativação destas vias leva ao aumento da transcrição de genes de citocinas, receptores de citocinas, fatores de crescimento, moléculas de adesão e óxido nítrico. Adicionalmente, o TNF- α pode desencadear apoptose através do recrutamento de caspases (Romanatto *et al.*, 2009). O aumento do TNF- α pode auxiliar a limitar o ganho de peso por meio da lipólise, da resistência à insulina e da diminuição da diferenciação de pré-adipócitos (Prins e O'rahilly, 1997).

A IL-6 é uma citocina originada em vários tecidos, incluindo adipócitos, miócitos, ilhotas, células do sistema imunológico e endoteliais, envolvida na resposta de fase aguda, inflamação, regulação imune e regeneração tecidual. Os receptores da IL-6 são solúveis ou transmembranosos. Ao se ligar ao receptor transmembrana, a IL-6 promove a fosforilação da proteína gp130 em resíduos de tirosina desencadeando a ativação das vias de sinalização da quinase ativada por mitógeno (MAPK, do inglês *mitogen-activated protein kinase*) e da quinase Janus-2 (JAK-2, do inglês *Janus kinase 2*). Por essas vias, IL-6 induz a expressão de proteínas de fase aguda, moléculas de adesão, quimiocinas, proteínas antiapoptóticas e citocinas pró-inflamatórias. A produção crônica e anormal de IL-6 tem um papel importante na patogênese de várias doenças inflamatórias, obesidade e resistência à insulina (Tanaka e Kishimoto, 2014). Entretanto, há evidências que a IL-6 tem efeitos duplos uma vez que no músculo aumenta sensibilidade a insulina. Também há evidência que a administração de dieta leva ao aumento da liberação de IL-6 em tecido adiposo humano e a atividade da lipase lipoproteica é reduzida pela IL-6 (Orban *et al.*, 1999).

Algumas adipocinas com efeitos anti-inflamatórios podem ter níveis mais altos na obesidade como parte de um mecanismo homeostático para contrapor os efeitos de mediadores pró-inflamatórios. Provavelmente a interleucina (IL)-10 tem este papel (Fain, 2010). A IL-10 é produzida por monócitos, macrófagos, linfócitos B e linfócitos Th2. Esta citocina inibe a ativação do fator de transcrição NF κ B induzida por TNF- α através da redução da quinase do inibidor do NF κ B (IKK) e protege da resistência à insulina induzida por IL-6 e

TNF- α . Dados de estudos com modelos animais sugerem que a deficiência de IL-10 predispõe a aterosclerose (Esposito *et al.*, 2003).

A leptina é um produto do gene *ob* produzida por adipócitos diferenciados, estômago, músculo esquelético, fígado, placenta entre outros tecidos. Sua principal função é a regulação do peso corporal. No sistema nervoso central leva ao aumento do gasto energético, reduz a ingestão alimentar, participa da maturação sexual e controle da reprodução. A leptina também age diretamente nos macrófagos, aumentando sua ação fagocítica e capacidade de produção de citocinas. O receptor de leptina tem seis isoformas, mas apenas o ObRb (altamente expresso no hipotálamo) tem domínio citoplasmático capaz de promover a sinalização celular via JAK-2. Também pode estimular a via MAPK. Em humanos, existe a dessensibilização para o sinal da leptina, um fenômeno conhecido como resistência à leptina. Esse fenômeno pode ocorrer por pelo menos dois mecanismos: saturação do transporte da leptina pela barreira hematoencefálica e anormalidades na ativação do receptor ou na transdução do sinal (Van Dielen *et al.*, 2001).

A adiponectina é secretada exclusivamente pelo adipócito e tem quatro isoformas, sendo os hexâmeros de alto peso molecular as mais prevalentes. Suas principais ações são a regulação do metabolismo energético, redução dos ácidos graxos livres pelo aumento de oxidação da gordura pelo músculo e estímulo direto da captação de gordura pelo músculo e adipócitos pela ativação do monofosfato de adenosina quinase. A adiponectina tem propriedades sensibilizadoras da ação da insulina, anti-inflamatórias e antiaterogênicas, além de efeito benéfico no metabolismo lipídico através do aumento da atividade da lipase lipoproteica. Os níveis circulantes de adiponectina encontram-se reduzidos na obesidade e no DM2 (Trujillo e Scherer, 2006). Em situações de restrição calórica, a literatura descreve uma redução do tecido adiposo branco e um aumento no tecido adiposo da medula óssea. Cawthorn e colaboradores utilizaram um modelo experimental de cobaias com ausência de tecido adiposo da medula óssea para demonstrar que, em consequência à restrição calórica e perda de peso, o aumento da produção da adiponectina tem participação importante do tecido adiposo da medula óssea (Cawthorn *et al.*, 2014).

1.4 Inflamação e obesidade

1.4.1 Definição e aspectos históricos

O aumento da mortalidade por doenças infecciosas em pacientes com obesidade e a constatação de resposta subótima à vacina na mesma população foram as primeiras observações da relação entre o sistema imunológico e a obesidade (Weber *et al.*, 1985). Posteriormente, o efeito benéfico do ácido acetilsalicílico, um potente agente anti-inflamatório, no controle do DM2 estabeleceu a relação entre inflamação e a homeostase glicêmica (Hundal *et al.*, 2002).

Em 1993, Dr. Bruce Spiegelman estudou a expressão do TNF- α em vários tecidos de camundongos e encontrou altos níveis no tecido adiposo de cobaias obesas (Hotamisligil *et al.*, 1993). Após alguns anos, a função imunoestimulatória da leptina foi descrita (Lord *et al.*, 1998) e reforçou a relação dos adipócitos com a inflamação sistêmica.

A inflamação pode ser definida de forma simples como uma resposta imune a injúria celular. A inflamação é deflagrada por agentes exógenos e também endógenos, que estimulam a limpeza e remodelação dos tecidos, o que resulta na renovação celular (O'Rourke, 2013).

A associação entre obesidade e um estado de inflamação crônica sistêmica de baixa intensidade é denominada metainflamação (Lumeng, 2013). Apesar de serem encontradas evidências de ativação do sistema imunológico associada à obesidade em diversos órgãos como fígado, músculo, hipotálamo e pâncreas, a função das células do sistema imunológico tem sido amplamente estudada e melhor compreendida no tecido adiposo. A hiperativação crônica do sistema imunológico encontra-se subjacente a doenças metabólicas que afetam o indivíduo com obesidade (Johnson *et al.*, 2012).

O sistema imunológico é composto pela imunidade inata e imunidade adaptativa. Inicialmente, a obesidade foi relacionada unicamente a alterações na imunidade inata. Mais recentemente, surgiram evidências da participação da imunidade adaptativa (Sell *et al.*, 2012).

Para o entendimento deste trabalho, consideramos importante rever aspectos básicos do sistema imune e as evidências atualizadas de sua relação com a obesidade, divididas nos tópicos: sistema imunológico inato e obesidade, sistema imunológico adaptativo e obesidade, desencadeantes da resposta imunológica na obesidade e inflamação como interface entre obesidade e outras patologias.

1.4.2 Visão geral do sistema imunológico

A célula-tronco hematopoiética pluripotente dá origem a linhagens mieloides, que participam principalmente da imunidade inata, e a linhagens linfoides, que participam principalmente da imunidade adaptativa. As células originadas do progenitor mielóide são

neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos e células dendríticas. Monócitos e células dendríticas migram para os tecidos periféricos, onde se diferenciam, respectivamente, em macrófagos e células dendríticas maduras. Estas células são especializadas em fagocitar os antígenos e apresentá-los aos linfócitos. O progenitor linfoide dá origem aos linfócitos T, linfócitos B e as células *Natural Killer* (NK), estas últimas sendo um tipo distinto de linfócito que não tem memória ou especificidade por antígeno (Cumano e Godin, 2007).

Os linfócitos T podem ser funcionalmente divididos em linfócitos T auxiliares (*helper*) e linfócitos T citotóxicos, dependendo da expressão diferenciada de CD4+ e CD8+, respectivamente. Os linfócitos T *helper* (Th) são responsáveis por funções efectoras, como estímulo da proliferação de linfócitos e ativação de macrófagos, células NK e linfócitos B, enquanto os linfócitos citotóxicos (Tc) são mediadores de atividades citotóxicas contra células infectadas por vírus e tumores. Em função da natureza do antígeno e das condições de ativação, uma proporção dos linfócitos T CD4+ se diferencia em Th1, Th2, Th17 ou T reguladores (Treg) com padrões de citocinas específicos e funções definidas (Blom e Spits, 2006).

As células do tipo Th1 estão envolvidas nas reações celulares inflamatórias e nas reações de hipersensibilidade tardia. As principais citocinas secretadas por estas células são interleucina (IL)-2, interferon (IFN)- γ e linfotóxina. O IFN- γ ativa macrófagos, aumentando a fagocitose e amplificando sua capacidade microbicida e também linfócitos B, estimulando sua produção de anticorpos. IFN- γ também estimula a atividade citotóxica das células NK, ativa os linfócitos T citotóxicos e induz enzimas antivirais, bloqueando a replicação viral ou levando a eliminação do vírus de células infectadas sem matá-las (Roitt e Delves, 2013).

As células Th2 produzem principalmente as citocinas interleucina (IL)-4, interleucina (IL)-5, IL-10 e interleucina (IL)-13, que estão envolvidas na síntese de imunoglobulina A, imunoglobulina M e, principalmente imunoglobulina E. A IL-4 (principal molécula efectora de Th2) participa da ativação de linfócitos B e favorece a ativação anti-inflamatória dos macrófagos. A IL-10 tem uma potente função anti-inflamatória ao inibir atividade dos linfócitos Th1 (Roitt e Delves, 2013).

As moléculas de interleucina (IL)-1 compreendem uma grande família de citocinas pró-inflamatórias, entre as quais IL-1 α , IL-1 β e IL-1Ra são os principais agonistas e antagonista, respectivamente, do receptor IL-1R. Apesar da IL-1 α e IL-1 β ativarem a inflamação através do estímulo ao fator de transcrição NF κ B, diversos achados sugerem que há diferença na atividade destas duas citocinas. A IL-1 α é expressa constitutivamente em células epiteliais e mesenquimais e possivelmente restringe a inflamação. Já a IL-1 β propaga

o processo inflamatório. Ao contrário da IL-1 α , a IL-1 β não é expressa em células mieloides constitutivamente e é ativada apenas quando há quebra do seu precursor, a caspase-1, no inflamassoma. Enquanto o precursor da IL-1 α recruta neutrófilos para o sítio de inflamação, a IL-1 β recruta macrófagos (Rider *et al.*, 2011).

A interleucina (IL)-17 é produzida principalmente por linfócitos Th17 e está envolvida na inflamação tecidual por estimular a secreção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas de neutrófilos. Esta citocina está envolvida primariamente na gênese de doenças alérgicas e asma brônquica. Também foi demonstrado que a IL-17 juntamente com a IL-6 regula a diferenciação de adipócitos, tendo efeito de inibir a adipogênese (Ahmed e Gaffen, 2010).

1.4.3 Sistema imunológico inato e obesidade

Os macrófagos do tecido adiposo (*adipose tissue macrophage* – ATM) são as células imunes mais abundantes do tecido adiposo, representando mais da metade dos leucócitos da gordura de animais magros e obesos. A população de macrófagos do tecido adiposo branco pode chegar a 60% do total de células deste tecido em animais com dieta rica em lipídeos (Weisberg *et al.*, 2003). Quando avaliado o número de macrófagos presentes no tecido adiposo subcutâneo de pacientes com obesidade grau III e comparado a de indivíduos com peso normal, há um significativo aumento no grupo com obesidade. A diferença entre o número de macrófagos presentes no tecido adiposo subcutâneo e omental de pacientes com excesso de peso também foi demonstrada, sendo maior a infiltração por macrófagos no tecido adiposo do omento (Aron-Wisniewsky *et al.*, 2009).

Os ATMs não são uma população homogênea de células, sendo identificadas diversas subpopulações no tecido adiposo de animais e humanos. Acredita-se que os ATMs originalmente identificados como “classicamente ativado” ou “polarizado M1”, contribuem desproporcionalmente para o fenótipo inflamatório e a disfunção metabólica do tecido adiposo em indivíduos obesos. No tecido adiposo de indivíduos magros, os macrófagos de “ativação alternativa” ou “polarização M2” predominam. Com o aumento da adiposidade, tanto os ATMs com ativação M1 quanto M2 aumentam, mas a expansão dos M1 é muito maior. No entanto, a classificação dicotômica dos ATMs provavelmente é simplista e não reflete completamente a diversidade dos ATMs e suas funções (Nishimura *et al.*, 2007). O papel funcional e a relação ontológica da maioria das subpopulações de ATMs ainda não foram bem estabelecidos.

Além de alterar a quantidade de macrófagos no tecido adiposo, o aumento do peso altera a morfologia e a localização dos ATMs. Em indivíduos magros, os ATMs são pequenos e estão dispersos entre os adipócitos. Com o aparecimento da obesidade eles se agregam e acumulam lipídeos, formando células multinucleadas. A agregação dessas células determina uma estrutura em forma de coroa, que envolve grandes gotículas de lipídeos, conhecida como *crown-like structures*. Acredita-se tratar-se de gotículas de lipídeos vestigiais de adipócitos mortos (Lumeng *et al.*, 2008).

Apesar de mudanças na população de macrófagos terem sido reconhecidas primeiramente, outras populações de células mieloides respondem a alterações no estado metabólico da gordura. No tecido adiposo de animais magros, neutrófilos representam uma pequena fração do total de células do sistema imunológico (menor 1%). Não obstante, quando camundongos são testados com dieta rica em gordura, há um aumento rápido dos neutrófilos no tecido adiposo, de forma que eles passam a representar aproximadamente 2% das células não adiposas. Alguns relatos sugerem que o aumento dos neutrófilos em resposta à alimentação rica em gordura é transitório, enquanto outros forneceram evidências de aumento crônico destas células associado à dieta hiperlipídica (Elgazar-Carmon *et al.*, 2008; Talukdar *et al.*, 2012).

Os mastócitos são clássicos mediadores de reação alérgica, mas estudos recentes têm os implicado em desordens autoimunes e aterosclerose. No tecido adiposo, mastócitos estão aumentados várias vezes em obesos comparados com indivíduos magros e assim como alguns ATMs são encontrados em associação próxima com a vasculatura, tanto em camundongos como em humanos (Sun *et al.*, 2007).

Os eosinófilos são efetores primários da clássica resposta anti-helmíntica e através da produção da IL-4 podem alternativamente ativar macrófagos. Em contraste aos ATMs, células dendríticas, mastócitos e neutrófilos, o aumento da adiposidade parece reduzir a população de eosinófilos produtores de IL-4, e desta forma, distorcer o fenótipo de macrófagos e outras células reguladas por IL-4 no tecido adiposo (Wu *et al.*, 2011).

1.4.4 Sistema imunológico adaptativo e obesidade

Similarmente ao observado nas populações de células mieloides, a obesidade aumenta o total de células T e B no tecido adiposo, mas reduz pequenas subpopulações que têm sido implicadas na supressão da inflamação (Duffaut *et al.*, 2009). Em resposta a incrementos na adiposidade, há um aumento de células Th1 e redução marcante de Treg, sendo estas últimas

críticas para manutenção da tolerância própria e diminuição da resposta Th1 e Th17 (Ferrante, 2013).

Os fatores que levam ao influxo e expansão das células Th1 para o tecido adiposo não são completamente conhecidos, mas devem incluir expansão dirigida por antígenos, produção dos fatores quimiotáticos por adipócitos ou pré-adipócitos (Kintscher *et al.*, 2008). Alguns estudos indicam que a perda de linfócitos Treg no tecido adiposo visceral pode ser o primeiro evento da inflamação na obesidade, visto que a leptina é um supressor da proliferação destas células (De Rosa *et al.*, 2007). Adicionalmente, foram encontradas evidências de que os linfócitos B são recrutados para o tecido adiposo, antes das células T, rapidamente após o início da dieta rica em gordura para indução da obesidade (Duffaut *et al.*, 2009).

A ativação dos macrófagos é mediada por células do sistema imunológico adaptativo. Células Th2 e Treg promovem a polarização dos macrófagos em M2 através da produção de IL-4, IL-10 e IL-13, enquanto Th1 e Th17 secretam IFN- γ e IL-17, que estimulam a polarização dos macrófagos em M1. Recentemente foi demonstrado que as células NK, através da produção de citocinas pró-inflamatórias, estimulam o aumento da população de ATMs do tecido adiposo e seu estado de ativação M1 (Lee *et al.*, 2016).

Portanto, em camundongos eutróficos, há um predomínio no tecido adiposo branco de linfócitos Treg, linfócitos Th2 e macrófagos com ativação M2. Em estágios iniciais da obesidade, há uma alteração na população de linfócitos T do tecido adiposo visceral, com aumento nos linfócitos T CD8+, polarização dos linfócitos Th1 e recrutamento de linfócitos B. Com a progressão da obesidade, a infiltração de células NK e a polarização dos macrófagos em ativação M1 estimulam o aumento na produção de INF- γ e quimiocinas pelos linfócitos CD8+ e linfócitos Th1 (Sell *et al.*, 2012) (Figura 1).

As células NK invariantes (iNK) são linfócitos que expressam um receptor de linfócitos T semi-invariante e proteínas típicas de células NK. As iNK são distinguidas de células T convencionais por sua habilidade em reconhecer lipídeos e glicolipídeos apresentados por outras células e desta forma poderiam ser candidatas ideais para reconhecer e responder a mudanças na homeostase lipídica no tecido adiposo. Obesidade reduz iNK no fígado, mas leva a pequenos aumentos desta população nos depósitos de tecido adiposo (Mantell *et al.*, 2011).

Figura 1 - Desenvolvimento da inflamação do tecido adiposo na obesidade.

A) no tecido adiposo de roedores magros, observa-se predomínio de macrófagos polarizados M2, células T reguladoras e células T polarizadas Th2. B) No início do desenvolvimento da obesidade, há uma mudança nas populações de células T para células T CD8+ e células T polarizadas Th1. Células B são recrutadas para o tecido adiposo. C) Com a progressão da obesidade, a infiltração de células NK e macrófagos pró-inflamatórios polarizados M1 pode ser estimulada pelo aumento da produção de IFN- γ e quimiocinas liberadas pelas células CD8+ e células polarizadas Th1. A agregação de macrófagos polarizados M1 determina uma estrutura em forma de coroa, que envolve grandes gotículas de lipídeos, conhecida como *crown-like structure*. Modificado de Sell e colaboradores (Sell *et al.*, 2012).

1.4.5 Desencadeantes da resposta imune na obesidade

A dinâmica da resposta imune no tecido adiposo sinaliza a existência de uma monitorização dos depósitos de gordura pelo sistema imunológico. Lipídeos, ácidos graxos livres (AGL), morte ou estresse dos adipócitos e hipóxia tecidual são sinais moleculares do aumento da adiposidade. A ativação “acidental” de vias de sinalização já bem estabelecidas na função de defender o organismo de infecções tem sido proposta como desencadeante da resposta imune na obesidade (Kosteli *et al.*, 2010; Lumeng, 2013) (Figura 2).

Um grupo de receptores do sistema imunológico inato, cuja função é reconhecer moléculas não próprias e iniciar a resposta imune, vem sendo relacionados à inflamação na obesidade. Estes receptores são divididos em classes, sendo que há evidência da participação de três grandes famílias na inflamação induzida por obesidade: *Toll-like receptor* (TLR), *Nod-like receptor* (NLR) e *C-type lectin receptor* (CLR) (Lumeng, 2013).

Enquanto a obesidade se desenvolve, a maioria dos ácidos graxos de cadeia longa é mantida dentro de células de tecido adiposo, na forma de lipídeos esterificados. Entretanto o consumo de dietas ricas em gordura e a obesidade resultam no aumento dos níveis séricos de ácidos graxos livres, os quais participam através de diversos mecanismos da deflagração e manutenção da inflamação associada à obesidade (Boden, 2011).

Figura 2 - Intersecção de vias moleculares na inflamação e obesidade.

Múltiplas vias sinalizadoras traduzem sinais inflamatórios e de nutrientes derivados da obesidade. Esses incluem sinais pró-inflamatórios (vermelhos) e anti-inflamatórios (azuis) da superfície celular que integram vias intracelulares comuns para gerar o aumento coordenado da expressão de genes inflamatórios e suprimir a expressão de genes importantes na manutenção do metabolismo de nutrientes adequados. Modificado de Lumeng e colaboradores (Lumeng, 2013).

Estudos têm demonstrado que AGL saturados ativam a sinalização inflamatória através do *Toll-like receptors* (TLR)-4, com consequente ativação da via do NFκB através da proteína de diferenciação mieloide (MyD88) ou não. A ativação desta via leva à fosforilação da IKK, que fosforila o inibidor do NFκB (IKB), que é degradada via proteossomo, deixando o NFκB livre para translocar-se até o núcleo celular e ativar a expressão gênica (Xu *et al.*, 2006). Em 2012, Pal e colaboradores reportaram que a fetoína A, uma glicoproteína inflamatória produzida pelo tecido adiposo e fígado, poderia agir como uma ponte ligando os AGL com TLR-4, levando a sua ativação (Pal *et al.*, 2012).

Em adição ao efeito direto do AGL como gatilho da inflamação metabólica através da ativação do TLR-4, estudos têm mostrado que os níveis circulatórios de lipopolissacarídeo

(LPS) estão aumentados em modelos experimentais de obesidade induzida por dieta e também em roedores ou humanos magros alimentados com dieta rica em gordura. Apesar dos níveis séricos de LPS detectados em obesos ou após o consumo de dietas gordurosas não alcançarem níveis tão altos quanto aquele observado na sepse, são suficientes para ativar TLR-4 nos macrófagos e em células de tecidos metabolicamente ativos. Desta forma, acredita-se que obesidade e dieta rica em gordura podem promover a ativação do TLR-4 por meio da ação direta de AGL em adição da clássica ativação pelo LPS (Cani *et al.*, 2007).

Uma importante informação quanto à ativação do TLR-4 na obesidade e doenças metabólicas foi adicionada por estudos que mostraram mudanças na microbiota intestinal de roedores e humanos obesos. Mudanças no perfil da microbiota intestinal resultam em modificações da fisiologia intestinal que pode ser afetada por um número de mecanismos distintos. Pelo menos dois mecanismos têm impacto direto na obesidade: 1) certas bactérias presentes em maior quantidade no intestino de sujeitos obesos expressam enzimas que aumentam a captação de energia dos nutrientes; 2) a microbiota em intestino de obesos pode mudar a permeabilidade do intestino a nutrientes e toxinas (Murphy *et al.*, 2010). Como consequências destas modificações, há um aumento na disponibilidade de energia total corporal, aumento na absorção de ácidos graxos e aumento da translocação de LPS.

As ceramidas são lipídeos intracelulares que têm a produção estimulada em condições de estresse celular e promovem vias de sinalização, incluindo regulação da apoptose. As ceramidas podem ativar a inflamação através das vias JNK e IKK/I κ B/NF κ B. A indução da síntese de ceramidas por LPS e AGL é dependente do receptor TLR-4 em muitos tecidos metabólicos, incluindo o hipotálamo e o músculo, onde as ceramidas podem inibir a sinalização da insulina. A adiponectina é um dos fatores que modulam a produção de ceramidas (Holland *et al.*, 2011).

Além de perceber ameaças extra-celulares, o sistema imunológico inato tem mecanismos de para vigiar o compartimento citoplasmático. Essa é uma função dos *Nod-like receptors* (NLR). Como ainda não foi demonstrada sua ligação a nenhum produto microbiano cognato, os NLR colaboram com outros receptores para integrar sinais de ativadores patogênicos (toxinas bacterianas, ácido ribonucleico (RNA) viral, glicoproteínas de fungos). Vários estudos demonstraram que a ativação estéril do NLR foi associada à obesidade e contribui pra resistência à insulina. A proteína NLRP-3 forma um complexo proteico conhecido por inflamassoma, que pode ser ativado por estímulos endógenos e exógenos e leva à produção de IL-1 e interleucina (IL)-18 pela caspase-1. Relevante para obesidade é a habilidade do inflamassoma ser ativado por ceramidas, AGL e espécies reativas do oxigênio

(ROS) e regular negativamente a sinalização do receptor de insulina. O inflamassoma pode regular o estado de ativação dos ATMs. Enquanto o inflamassoma é primariamente envolvido na inflamação leucocitária, também há possibilidade dele ter uma função importante em células metabólicas como adipócitos. Camundongos deficientes de caspase-1 demonstram defeito na adipogênese e na sensibilidade a insulina dos adipócitos (Lumeng, 2013).

Os *C-type lectin receptors* (CLR) representam uma classe de receptores expressos proeminentemente em células apresentadoras de antígenos. Esses receptores ligam-se e medeiam a internalização de antígenos glicosilados de fontes próprias e não próprias. Sua função na captura de antígenos é fortemente ligada a sua habilidade em transferir o antígeno para compartimentos endossomais e permitir sua apresentação pelos complexos maiores de histocompatibilidade I e II (MHC, do inglês *major histocompatibility complex*). Muitos CLR têm sido estudados no contexto da obesidade e doenças metabólicas. O receptor lipoproteico oxidado de baixa densidade 1 (LOX1) é um CLR encontrado em células endoteliais, macrófagos, plaquetas e células de músculo liso. A expressão de LOX1 é fortemente induzida em placas ateroscleróticas assim como em tecido adiposo de obesos. Enquanto ele tem um papel importante na endocitose de lipoproteínas de baixa densidade (LDL, do inglês *low density lipoprotein*) oxidado, também induz a ativação de macrófagos e células endoteliais via NFκB e MAPK. Muitos CLR são expressos em ATMs e têm sido estudados no contexto da inflamação do tecido adiposo, entretanto a função não é totalmente compreendida (Lumeng, 2013).

O sistema imunológico inato também utiliza sinais originados nos nutrientes para limitar a inflamação. O receptor GPR120 do ácido graxo poliinsaturado ômega 3 encontrado em macrófagos é capaz de atenuar a ativação M1 e aumentar a expressão dos genes ligados a ativação M2 nos macrófagos (Oh *et al.*, 2010).

A hipóxia tecidual é um forte ativador do processo de neovascularização. Este fenômeno tem sido extensamente estudado na biologia do câncer e em parte depende das funções dos macrófagos (Squadrito e De Palma, 2011). Consistente com o papel da hipóxia em determinar o recrutamento de células do sistema imunológico e macrófagos, dados de camundongos obesos sugerem que com o aparecimento da obesidade a tensão de oxigênio diminui nos depósitos de tecido adiposo. Esse decréscimo da oxigenação tem sido reportado como ativador da expressão de quimiocinas no adipócito (Yin *et al.*, 2009).

O retículo endoplasmático (RE) é a organela responsável pela tradução e dobra de mais de 30% das proteínas das células. Sob certas condições de estresse, o ritmo de síntese e dobra das proteínas pode diminuir, potencialmente ameaçando a viabilidade celular. Para

minimizar a chance de emperramento de proteínas no RE, um sistema de sensores se desenvolveu denominado “resposta à proteína não dobrada” (UPR, do inglês, *unfolded protein response*), que é ativado em resposta ao acúmulo de proteínas mal-dobradas na luz do RE (Ron e Walter, 2007). A incapacidade prolongada em estabelecer a homeostase do RE, resulta na ativação da inflamação dependente da UPR e eventualmente apoptose (Hotamisligil, 2008).

Em 2004, foi demonstrado que a obesidade se acompanha de estresse do RE no tecido adiposo, levando à ativação da via inflamatória JNK (Ozcan *et al.*, 2004). A proteína quinase dependente de RNA (PKR) tem o papel de intermediar o efeito do estresse do RE e nutrientes na resposta inflamatória através da JNK. Em adição a ativação da via de sinalização JNK, o estresse do RE leva à ativação da via IKK/ IKB/NFκB (Zhang *et al.*, 2008), o que reforça o importante papel do estresse do RE na deflagração da inflamação metabólica.

1.4.6 Inflamação como interface entre obesidade e outras patologias

Diversos estudos sobre resistência à insulina ligada à inflamação têm ênfase no tecido adiposo e fígado. Entretanto, há evidências que fenômenos similares ocorrem em outros tecidos como músculo e hipotálamo. A Figura 3 representa o papel central da metainflamação na patogênese de doenças associadas à obesidade.

Figura 3 - Relação da metainflamação com fisiopatologia de doenças associadas à obesidade.

A ativação crônica de baixa intensidade do sistema imunológico na obesidade conhecida por metainflamação está relacionada à gênese de doenças metabólicas associadas à obesidade. A obesidade é um fator de risco independente para o desenvolvimento de alguns tipos de câncer e pior evolução de quadros infecciosos.

A resistência à insulina na inflamação associada à obesidade é desenvolvida por múltiplos mecanismos. Citocinas pró-inflamatórias, principalmente $\text{TNF-}\alpha$, IL-6 e $\text{IL-1}\beta$, reduzem a autofosforilação do receptor de insulina e diminuem a fosforilação dos substratos do receptor de insulina (IRS)-1 e IRS-2 em tirosina. A via JNK pode ser ativada pelo $\text{TNF-}\alpha$, estresse do retículo e AGL. Esta via, além de produzir citocinas, fosforila o IRS-1 em serina. A via IKK/I κ B/NF κ B pode ser ativada pelo $\text{TNF-}\alpha$. A IKK pode interferir na sinalização da insulina através da fosforilação do IRS-1 em serina ou indiretamente pelo NF κ B, que produz mediadores inflamatórios. Algumas isoformas da proteína quinase C e MAPK também podem fosforilar o IRS-1 em serina. A mTOR (do inglês, *Mammalian Target of Rapamycin*), na presença de $\text{TNF-}\alpha$, fosforila IRS-1 em serina (Saad, 2007).

Em 2011, estudo de Lee e colaboradores investigou a sequência temporal de eventos que estabelecem a inflamação associada à obesidade e à resistência a insulina em camundongos submetidos à dieta rica em gordura. Foram utilizados três modelos experimentais de comprometimento do sistema imunológico, a fim de verificar individualmente a participação de linfócitos, macrófagos e da via JNK em mononucleares de sangue periférico na origem da resistência a insulina associada a obesidade. Apesar da inibição funcional dos macrófagos não afetar inicialmente a resistência a insulina, após 14 semanas de estudo foi observado redução na resistência à insulina nos camundongos com

deficiência de macrófagos. O estudo conclui que a sobrecarga lipídica e lipotoxicidade são os fatores mais importantes no desencadeamento da inflamação e resistência à insulina em fases precoces da obesidade induzida por dieta hiperlipídica. Entretanto, a inflamação crônica se estabelece e progride juntamente com o aumento da adiposidade e emerge como mecanismo dominante da resistência à insulina quando a obesidade já está bem estabelecida. Apesar de se observar alterações da população de leucócitos na gordura visceral desde fases precoces da obesidade, apenas o comprometimento dos macrófagos alterou a resistência insulina (Lee *et al.*, 2011)

De maneira similar ao observado no tecido adiposo expandido por dieta, o fígado com acúmulo de lipídeos é caracterizado por um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias. Além das células de *Kupffer* (macrófagos residentes), novos leucócitos são recrutados para o fígado com o aumento da adiposidade, predominando macrófagos M1 e linfócitos Th1 com ativação de vias de sinalização intracelular, como a JNK, ativação TLR-4 e estresse do RE (Kang *et al.*, 2008). A progressão de esteatose hepática para esteato-hepatite não alcoólica envolve resposta inflamatória ao dano aos hepatócitos e fibrose mediada por citocinas como TNF- α e IL-6 (Feldstein, 2010) e a redução no número de células iNK (Shoelson *et al.*, 2006). Recentemente, um estudo demonstrou que IL-17 acelera a evolução de esteatose hepática para esteato-hepatite não alcoólica em ratos submetidos à dieta hiperlipídica (Harley *et al.*, 2014).

A leptina e a insulina têm um papel fundamental no controle hipotalâmico do balanço energético. Por isso, a deterioração da ação destes hormônios no hipotálamo pode estabelecer um novo *set point* para a homeostase energética num processo adaptativo, o que favoreceria a retenção calórica e o ganho de peso. A ativação do TLR-4 por dieta rica em lipídeos com subsequente estímulo da via IKK/I κ B/NF κ B leva ao bloqueio da tradução dos sinais da insulina e da leptina no hipotálamo. Adicionalmente, a dieta rica em lipídeo desencadeia apoptose e alterações maiores na plasticidade sináptica dos neurônios hipotalâmicos (De Lima-Júnior *et al.*, 2015).

Há também evidências do aumento da inflamação em músculo esquelético na obesidade, o que está relacionado a aumento da resistência à insulina e redução na oxidação de ácidos graxos. Os miócitos têm a capacidade de responder a sinais inflamatórios e metabólicos através dos receptores como o TLR-4. A inflamação do músculo pode ser ligada à infiltração de macrófagos com ativação M1 induzida pela obesidade (Frisard *et al.*, 2010). Exercícios físicos, classicamente associados ao aumento da ação da insulina no músculo esquelético, elevam dramaticamente os níveis de IL-6 locais e circulantes, sugerindo um

possível papel anti-inflamatório para IL-6 no músculo. Uma hipótese para conciliar esses efeitos divergentes seria que uma elevação crônica de IL-6, mas não aguda como no exercício físico, tem um efeito fraco ou ausente no músculo *in vivo* enquanto isso poderia contribuir para resistência insulínica sistêmica, particularmente no fígado e tecido adiposo (Bastard *et al.*, 2007).

A inflamação é intimamente ligada à patogênese da aterosclerose. Sinais de inflamação acompanham precocemente o acúmulo de lipídeos dentro da parede arterial, incluindo o aumento da expressão de moléculas de adesão nos leucócitos circulantes como a P-seletina, E-seletina, ICAM-1 (do inglês, *intercellular adhesion molecule-1*) e VCAM-1 (do inglês, *vascular cell adhesion molecule-1*). Com o remodelamento vascular, o acúmulo de células espumosas leva à formação de coleções lipídicas, ricas em fatores pró-trombóticos. Foi demonstrado que macrófagos ativados secretam collagenases, que fragilizam as paredes da lesão aterosclerótica e favorecem eventos isquêmicos agudos (Vázquez *et al.*, 2005). A relevância da IL-17 na aterosclerose humana está pouco definida. Tarantino e colaboradores demonstraram que IL-17 produzida por TAV induz a secreção de eotaxina pelo músculo liso das artérias e esta quimiocina se relaciona diretamente com o desenvolvimento da aterosclerose (Tarantino *et al.*, 2014). Adicionalmente, é conhecido que o fator de transcrição NFκB regula a produção de proteínas que medeiam o processo aterogênico, sugerindo que discretas exacerbações da inflamação induzida por obesidade promovem este processo (Shoelson *et al.*, 2006).

A inflamação sistêmica pode afetar as ilhotas pancreáticas através de mecanismos distintos, contribuindo para a falência das células *beta*. Os primeiros estudos demonstraram o tecido adiposo como fonte de fatores inflamatórios na obesidade que desencadeavam a disfunção das ilhotas (Ehses *et al.*, 2007). Entretanto, a inflamação associada ao excesso de adiposidade pode afetar a secreção de insulina por outros mecanismos. A inflamação hipotalâmica associada a obesidade é acompanhada da perda da primeira fase da secreção da insulina. A conexão entre hipotálamo e pâncreas é dependente da inervação simpática. Usando um modelo experimental em primatas com exposição fetal à dieta rica em gordura, foi observado um aumento precoce da expressão de IL-6 e IL-1β nas ilhotas pancreáticas, que também foi associada a falha na primeira fase de secreção de insulina pelo pâncreas. Por fim, o estresse do RE tem sido descrito como um importante mecanismo da inflamação das ilhotas pancreáticas e disfunção das células *beta* (Coope *et al.*, 2016).

Os mecanismos que predispoem pacientes obesos à infecção não estão bem estabelecidos. As evidências disponíveis sugerem que a resistência central e periférica à

leptina observada com aumento da adiposidade contribui para suscetibilidade à infecção. A adiponectina, cujos níveis circulantes encontram-se reduzidos na obesidade, altera a citotoxicidade das células NK e a produção de citocinas por células mieloides humanas. Apesar de estar claro que a insulina pode exercer vários efeitos imunomoduladores, pouco se sabe sobre as consequências do excesso de insulina e da resistência à insulina no sistema imune no contexto da obesidade. Da mesma maneira, os excessos de produção de TNF- α , IL-6 e IL-1 β pelo tecido adiposo podem ter efeitos a distância ainda não elucidados. É possível que a exposição crônica a citocinas pró-inflamatórias dessensibilize as células do sistema imunológico perante a resposta inflamatória durante uma infecção atual (Milner e Beck, 2012).

O desenvolvimento de muitos cânceres (incluindo esofágico, pancreático, colorretal, mamário, uterino, renal, tireoideano e da vesícula biliar) está associado à obesidade. O microambiente tecidual inflamado, semelhante ao descrito em indivíduos obesos, oferece um arranjo ideal para o desenvolvimento e progressão tumoral (Johnson *et al.*, 2012). A secreção contínua de citocinas pró-inflamatórias por células do sistema imunológico ativadas não somente mantém a produção de ROS, mas também pode estimular mudanças epigenéticas em células precursoras pré-malignas por ácido desoxirribonucleico (DNA) aberrante devido metilação e silenciamento genético mediado por microRNA, particularmente em genes supressores de tumor (Cooper e Foster, 2009). Em adição, as citocinas produzidas por células do sistema imunológico ativadas podem promover a reversão de células pré-malignas para um fenótipo progenitor *cell-like*, desta forma servindo para expandir o *pool* de células *totipotentes* dentro de tecidos que podem ser mais suscetíveis ao dano inflamatório (Grivennikov *et al.*, 2010). A IL-17 pode aumentar a carcinogênese através da ativação de múltiplas vias de sinalização intracelular. Assim, a elevação de IL-17 circulante observada em estados de aumento da adiposidade também pode contribuir para a incidência maior de câncer em pacientes com obesidade (Gislette e Chen, 2010).

1.5 Efeito da perda de peso na inflamação

Intervenções para redução de peso em humanos com obesidade têm efeito na metainflamação.

Em revisão sistemática de 2008, Forsythe e colaboradores avaliaram 60 estudos sobre o efeito da perda de peso nos níveis séricos de IL-6, TNF- α , PCR e adiponectina. Os resultados descreveram redução nos níveis IL-6, TNF- α , PCR e aumento da adiponectina

significativos após uso de dieta para perda de peso ou cirurgia bariátrica, sendo os melhores resultados vistos quando a perda foi maior que 10% do peso. Exercício físico isolado não teve efeito nestes marcadores de inflamação sistêmica. Apenas quatro dos sessenta estudos utilizados na revisão tiveram avaliação das citocinas após a perda de peso inicial, durante a manutenção do peso. Nos estudos que tiveram duração de até 1 ano, houve recuperação parcial dos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias na fase de manutenção do peso (Forsythe *et al.*, 2008).

Em metanálise de 2012, Rao e colaboradores utilizaram estudos com dosagem sérica de IL-6, TNF- α e PCR exclusivamente antes e após cirurgia bariátrica e concluíram que PCR e IL-6 reduzem seus níveis sérico após cirurgia bariátrica, mas TNF- α não tem modificação significativa (Rao *et al.*, 2012).

Em outro estudo foram avaliados níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias, adiponectina e PCR em sessenta mulheres com obesidade grau III antes e após 3, 6 e 12 meses de DGYR. Após 12 meses da cirurgia, houve alterações significativas na concentração de adiponectina (aumentou), IL-6 e PCR (reduziram). Apesar da perda de peso maciça, 45 pacientes permaneceram com IMC maior que 30 kg/m². Mais uma vez não houve alteração nos níveis séricos do TNF- α (Illán-Gómez *et al.*, 2012). Finalmente, um experimento que avaliou marcadores de inflamação séricos após 36 meses de derivação biliopancreática demonstrou queda de PCR, mas não alteração dos níveis de IL-6 e TNF- α (Manco *et al.*, 2007).

A manutenção da concentração sérica de TNF- α após perda de peso por cirurgia bariátrica pode ser justificada por: 1) o TNF- α produzido pelo tecido adiposo tem o principal efeito parácrino; 2) apesar da perda de peso maciça, a maior parte dos pacientes no pós-operatório de cirurgia bariátrica permanece com obesidade; 3) a esteato-hepatite não alcoólica está associada a um aumento do TNF- α e pode manter os níveis desta citocina elevados no pós-operatório; 4) a deficiência de vitamina D comumente vista em pacientes com obesidade pode estimular a produção de TNF- α (Illán-Gómez *et al.*, 2012).

A expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias da família IL-1 em fígado e tecido adiposo subcutâneo foi avaliada após 6 meses de cirurgia bariátrica e mostrou redução significativa com a perda de peso (Moschen *et al.*, 2011).

Em um experimento de Aron-Wisniewsky e colaboradores, a população de macrófagos e o estado de ativação destas células em diferentes topografias de tecido adiposo foram analisados, bem como o efeito da obesidade e da perda de peso sobre elas. Além de reforçar dados da literatura que demonstraram em pacientes com obesidade maior infiltração e maior

ativação pró-inflamatória de macrófagos em tecido adiposo visceral comparado ao tecido adiposo subcutâneo, após 3 meses da realização de cirurgia bariátrica, a avaliação do tecido adiposo subcutâneo evidenciou redução importante da infiltração de macrófagos, com diminuição de macrófagos M1 e aumento da quantidade de macrófagos M2 (Aron-Wisnewsky *et al.*, 2009).

Em estudo semelhante, Canello e colaboradores analisaram o efeito da cirurgia bariátrica na quantidade de macrófagos infiltrados no tecido adiposo subcutâneo, além de mudanças na expressão gênica destas células. A conclusão do estudo foi que a perda de peso drástica após a cirurgia bariátrica resulta em diminuição significativa do número de macrófagos que infiltram este tecido e que genes envolvidos na quimiotaxia de macrófagos e hipóxia tecidual têm expressão aumentada na obesidade e reduzem pós-cirurgia (Canello *et al.*, 2005).

A inflamação e disfunção do hipotálamo observadas em quadros de obesidade foram avaliadas em experimento que utilizou protocolos de ressonâncias magnéticas seriadas do sistema nervoso central de humanos com obesidade antes e após cirurgia bariátrica. A perda de peso maciça levou a mudanças nas imagens do hipotálamo destes pacientes, assim como um aumento nos níveis de IL-6 e IL-10 no líquido cefalorraquidiano (LCR). A conclusão do trabalho foi de que a perda de peso induzida por cirurgia bariátrica promove uma reversão parcial da disfunção hipotalâmica associada à obesidade e ao aumento da atividade anti-inflamatória no LCR (Van De Sande-Lee *et al.*, 2011).

Lasselin e colaboradores avaliaram marcadores inflamatórios séricos e a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias no tecido adiposo visceral antes e após cirurgia bariátrica e demonstraram que a combinação de alguns marcadores de inflamação elevados foram relacionados a menor perda de peso nos primeiros 3 meses de pós-operatório (Lasselin *et al.*, 2014).

1.6 Mononucleares de sangue periférico

Os mononucleares de sangue periférico (MNSP), que incluem linfócitos e monócitos, constituem um material biológico interessante para pesquisa visto sua capacidade de refletir alterações de expressão gênica de diferentes tecidos e o fácil acesso para sua análise. Os MNSP possuem receptores para glucagon e insulina, o que possibilita a relação destas células com a homeostase energética (Caimari *et al.*, 2010).

Caimari e colaboradores demonstraram que MNSP são modelos experimentais para caracterização das adaptações metabólicas à ingestão alimentar e manutenção do peso corporal. Este grupo de pesquisadores analisou a resposta de MNSP de ratos a diferentes dietas através do estudo da expressão de genes ligados à homeostase energética e observaram que ratos obesos submetidos à “dieta de cafeteria” expressavam 23 genes após jejum e realimentação, enquanto ratos controles expressavam 75 genes. A maioria dos genes estudados tinha papel no metabolismo de lipídeos e regulação da ingestão alimentar. Resultados semelhantes foram observados em tecido adiposo branco mesentérico (Caimari *et al.*, 2010). Posteriormente, o mesmo grupo de pesquisadores analisou o efeito da dieta na expressão gênica dos MNSP em diferentes etapas do desenvolvimento da obesidade e demonstrou que em fases precoces do aumento da adiposidade há falhas na expressão de genes ligados a homeostase energética (Oliver *et al.*, 2013). Anteriormente, Crujeiras e colaboradores demonstram que diferentes dietas, assim como a restrição calórica, afetam a expressão gênica em MNSP de humanos (Crujeiras *et al.*, 2008).

Recentemente, estudo demonstrou que mudanças no estresse oxidativo observadas nos MNSP refletem eventos que ocorrem no tecido adiposo de pacientes com síndrome metabólica (Camargo *et al.*, 2014).

A influência da obesidade e da inflamação sistêmica na ativação de MNSP foi estudada por Boris e colaboradores. Neste estudo, foram desenvolvidas culturas primárias de MNSP e após estímulo avaliadas as expressões gênicas de INF- γ , TNF- α e IL-1 β nestas células. Os participantes do estudo foram divididos em um grupo com obesidade e euglicemia e outro grupo de obesidade e disglucemia (DM2 ou pré-diabetes). Houve maior expressão de INF- γ , TNF- α e IL-1 β – compatível com ativação clássica de macrófagos ou M1 – no grupo de pacientes com obesidade independentemente da presença de disglucemia. Após 7 dias de incubação com IL-4, os MNSP diferenciados na cultura apresentavam marcadores de ativação alternativa ou M2 reduzidos. Com isso, concluiu-se que os mononucleares circulantes têm programação nos quadros de obesidade para ativação pró-inflamatória, possivelmente por efeito epigenético de fatores metabólicos e que o aumento da adiposidade é o principal responsável por esse comportamento, visto que não houve influência da disglucemia (Bories *et al.*, 2012).

Ghaim e colaboradores compararam MNSP de pacientes com obesidade grau II e III e pacientes de peso normal. Com aumento da adiposidade, houve aumento na atividade da NF κ B, redução da expressão proteica de I κ B e aumento da expressão gênica IL-6, TNF- α , MIF (do inglês, *migration inhibitor factor*), MMP-9 (do inglês, *matrix metalloproteinase-9*)

(Ghanim *et al.*, 2004). Em estudo de O'Rourke e colaboradores, não houve diferença entre os níveis séricos de IL-6, IL-1 β , TNF α de pacientes magros e com obesidade. Entretanto, houve diferença na expressão de RNA de MNSP destas citocinas, que se encontravam reduzidas na obesidade (O'rourke *et al.*, 2006).

O efeito da distribuição de gordura na atividade pró-inflamatória de MNSP em indivíduos saudáveis foi avaliada por Hermsdorff e colaboradores. Em estudo com indivíduos de peso normal e aumento da gordura troncular ou não e obesos, houve maior expressão de RNA de IL-6 e PCR nos MNSP originados em indivíduos magros com aumento do perímetro abdominal e nos pacientes com obesidade em comparação aos pacientes magros sem aumento da adiposidade central (Hermsdorff *et al.*, 2010).

Krinninger e colaboradores compararam a expressão de receptores de quimiocinas em MNSP de pacientes com obesidade e peso normal. Os resultados sugeriram que a maior capacidade intrínseca de migração MNSP de mulheres com obesidade em comparação com mulheres de peso normal pode ser justificada pelo aumento na expressão dos receptores de quimiocinas (Krinninger *et al.*, 2014).

A avaliação da expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias IL-6, TNF- α , MIF e MMP-9 e da atividade do fator de transcrição NF-kB em MNSP antes e após 3 meses de dieta e exercício físico evidenciou redução na atividade inflamatória destas células após perda média de 4 kg (Sheu *et al.*, 2008).

Moulin e colaboradores avaliaram parâmetros imunológicos de pacientes com obesidade grau III submetidos à DGYR. Após 6 meses de cirurgia, observaram sinais de aumento da proliferação de linfócitos T, aumento da atividade citotóxica de células NK, além de maior produção em cultura primária de MNSP de IL-12, IL-18 e IFN- γ (Moulin *et al.*, 2011).

Fontana e colaboradores, em estudo com cultura de MNSP, observaram uma menor produção de INF- γ e MCP-1 estimulada por LPS por MNSP de pacientes com obesidade em relação a pacientes magros e aumento das mesmas citocinas em sobrenadante de cultura após perda de peso induzida por cirurgia bariátrica (Fontana *et al.*, 2007).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar os efeitos da perda de peso induzida por cirurgia bariátrica sobre a resposta imunológica de pacientes com obesidade grau III.

2.2 Objetivos específicos

- 1) Analisar os efeitos da obesidade grau III sobre a resposta imunológica através de detecções séricas e em sobrenadantes de culturas primárias de mononucleares de sangue periférico das citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-17, IFN- γ e IL-10.
- 2) Analisar os efeitos da perda de peso induzida pela cirurgia bariátrica sobre a resposta imunológica através de detecções séricas e em sobrenadantes de culturas primária de mononucleares de sangue periférico das citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-17, IFN- γ e IL-10.
- 3) Analisar a correlação entre níveis séricos e níveis obtidos em sobrenadantes de culturas primárias de mononucleares de sangue periférico das citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-17, IFN- γ e IL-10.
- 4) Analisar a correlação entre níveis séricos e níveis obtidos em sobrenadantes de culturas primárias de mononucleares de sangue periférico das citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-17, IFN- γ e IL-10 e características clínicas e laboratoriais dos pacientes com obesidade antes e após a realização de cirurgia bariátrica.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Casuística e critérios de inclusão

No estudo foram incluídos 20 pacientes portadores de obesidade grau III ($\text{IMC} \geq 40 \text{ kg/m}^2$) submetidos à cirurgia bariátrica realizada no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HC – FMRP) ou no Hospital São Lucas de Ribeirão Preto (HSL-RP). Também foram selecionados 10 voluntários não obesos para o grupo controle.

Os pacientes com obesidade foram submetidos à derivação gastrojejunal e reconstrução em Y de Roux (DGYR), sendo nove por técnica aberta, realizadas no HC-FMRP e onze por técnica videolaparoscópica, realizada no HSL-RP.

As cirurgias realizadas no HC-FMRP seguiram os mesmos passos técnicos, com algumas variações na ordem das etapas que serão descritas a seguir: biópsia hepática, secção jejunal com *stappler* seguido de reforço com sutura, anastomose jejunojejunal em Y de Roux laterolateral em plano único com sutura contínua, confecção do reservatório gástrico com *stappler* linear seguido de reforço com sutura, fixação da boca distal da alça seccionada na face lateral do *pouch* gástrico com sutura contínua em dois planos, teste do azul de metileno, síntese da brecha criada pela cirurgia com fio inabsorvível. Em todos os pacientes, a anastomose jejunojejunal foi confeccionada a 100 centímetros do local de secção. Entretanto, a secção jejunal de 5 pacientes foi a 100 cm do ângulo de Treitz e em 4 pacientes esta distância variou de 50 a 80 centímetros. Apenas 2 pacientes tiveram a colocação de anel gástrico. O tempo cirúrgico variou de 3 a 5 horas e não houve complicações cirúrgicas nos pacientes selecionados para o estudo.

As cirurgias realizadas no HSL-RP seguiram os seguintes passos técnicos: criação de pneumoperitônio, posicionamento de 5 trocateres nos quadrantes superiores do abdômen superior, secções do estômago com grampeadores lineares cortantes utilizando a sonda *fouchet* para guiar a confecção do *pouch* gástrico, sutura seromuscular do estômago remanescente, exposição do ângulo de Treitz para medida da alça biliopancreática a 100 cm deste, deslocamento do segmento definido para secção jejunal para o andar superior do mesocólico e fixação, secção jejunal com grampeador linear cortante, uso da alça alimentar já fixada na *pouch* gástrico (aguardando anastomose) como ponto de referência para medir 100 cm em sentido da válvula íleocecal para anastomose jejunojejunal, confecção da anastomose jejunojejunal de forma lateral com grampeador linear cortante em Y de Roux, sutura em 2 planos da abertura da alça para passagem do grampeador, síntese da brecha criada pela cirurgia com fio inabsorvível, confecção da anastomose gastrojejunal com grampeador linear cortante laterolateral por abertura da extremidade distal do *pouch* gástrico e borda anti-

mesentérica da alça alimentar, síntese da abertura das vísceras com sutura em 2 planos, teste do azul de metileno. O tempo cirúrgico médio foi de 3 horas e não houve complicações cirúrgicas nos pacientes selecionados para o estudo.

Os indivíduos que concordaram em participar da pesquisa assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, redigido de acordo com as normas estabelecidas pela Resolução número 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde (Anexo 1). Todos os procedimentos realizados nesta pesquisa foram aprovados pelo Comitê de Ética Para Pesquisas em Seres Humanos do HC-FMRP (Anexo 2).

3.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos pacientes portadores de diabetes *mellitus*, portadores de doenças autoimunes, imunossupressão adquirida ou induzida, histórico de tabagismo no prazo de cinco anos, gravidez e lactação, alcoolismo ou ingestão de drogas ilícitas, antibioticoterapia no último mês, terapia crônica com anti-inflamatórios não esteroides e corticosteroides nos últimos três meses. Os pacientes que apresentaram complicações cirúrgicas da DGYR foram excluídos do estudo.

3.3 Métodos

Os pacientes foram submetidos à mensuração do peso, altura e perímetro abdominal antes da cirurgia bariátrica, 6 e 12 meses após o procedimento. Esta avaliação foi realizada nos pacientes do grupo controle em uma única ocasião. O peso corporal (kg) foi aferido com a utilização de uma balança digital com graduação de 100 em 100 gramas, estando os pacientes da pesquisa descalços e com roupas leves. A altura (m) foi determinada por estadiômetro, graduado em centímetro, estando os participantes descalços, com os pés unidos, em posição ereta, olhando para frente. Para calcular o IMC foi dividido o valor do peso (kg) pelo quadrado da altura (m^2). O perímetro abdominal (cm) foi determinado utilizando uma fita métrica flexível, graduada em centímetros, posicionando a fita no ponto médio entre o último arco costal.

Avaliação da composição corpórea de oito pacientes do grupo estudado através de Bioimpedância Elétrica (BIA) foi realizada antes da cirurgia e 6 meses após cirurgia. Os

participantes estavam com jejum de pelo menos 4 horas (sem ter consumido bebidas alcoólicas ou cafeína há pelo menos 12 horas), sem adornos metálicos em contato com a pele, em decúbito dorsal, em superfície reta e confortável. Previamente ao exame, a pele foi limpa com álcool, a fim de eliminar resíduos de gordura ou poluição que eventualmente estão presentes. Os eletrodos distais (eletrodos de corrente) foram fixados na superfície anterior do pé, na parte distal final do segundo metatarso e na área posterior da mão, na parte distal final do terceiro metacarpo. Os eletrodos proximais (eletrodos de leitura) foram posicionados na proeminência do rádio e ulna em superfície posterior do pulso, e o outro eletrodo entre o maléolo da tíbia e fíbula na superfície anterior, na junção entre o pé e perna. Posteriormente, utilizando o aparelho Biodynamics BIA 450®, aplicou-se uma corrente elétrica com frequência de 50 kHz e intensidade de 800 μ A, para serem determinados os valores de resistência e reactância em Ohm e de ângulo de fase (referente à relação entre a resistência e reactância), em graus. Tais valores foram aplicados em fórmula de Jakicic (Jakicic *et al.*, 1998), a fim de se obter dados de massa corporal magra e massa corporal de gordura, corrigidas para indivíduos obesos.

Foram coletadas amostras de sangue periférico antes e após 6 e 12 meses da cirurgia. Os pacientes do grupo controle tiveram apenas uma coleta de sangue. As amostras foram obtidas por punção da veia braquial após antissepsia da fossa anticubital com algodão embebido em álcool, através do sistema *BD Vacutainer*. Estes procedimentos de coleta de sangue periférico foram realizados no período da manhã, após pelo menos oito horas de jejum, sempre utilizando luvas para que não houvesse contaminação da amostra. De cada coleta de sangue, dois tubos contendo gel com ativador de coágulo foram imediatamente centrifugados a 1500 rpm para separação do soro, que foi congelado em freezer a - 80°C. Posteriormente parte deste soro foi encaminhada ao Laboratório Central do HC-FMRP para realização de exames descritos a seguir e parte foi utilizada para dosagem de adiponectina e leptina no Laboratório de Cultura de Células da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP). O restante do sangue foi coletado em tubos heparinizados e transportado em recipiente refrigerado para o Laboratório de Cultura de Células da FMRP-USP, onde se iniciou imediatamente experimentos para avaliação imunológica.

3.4 Exames laboratoriais

Além da dosagem de leptina e adiponectina, foram também analisados proteína C reativa, glicemia de jejum, insulina, colesterol total (CT), colesterol HDL, triglicerídeos (TG).

Leptina: foi determinada pelo método de ensaio de imunoabsorção ligado à enzima (ELISA), utilizando o *Human Leptin Elisa Kit* (Cat. EZHL-80SK, Millipore). O menor nível de leptina que pode ser detectado por este método é de 0,78 ng/mL. As análises foram realizadas em duplicatas, nas amostras de dez pacientes com obesidade antes da cirurgia, seis meses e um ano após e oito pacientes controles.

Adiponectina: foi determinada pelo método ELISA, utilizando o *Human Adiponectin Elisa Kit* (Cat. EZHADP-61K, Millipore). O menor nível de adiponectina que pode ser detectado por este método é de 1,5 ng/mL. As análises foram realizadas em duplicatas, nas amostras de dez pacientes com obesidade antes da cirurgia, seis meses e um ano após e oito pacientes controles (selecionadas as mesmas amostras utilizadas para dosagem de leptina).

Proteína C reativa: foi determinada pelo método turbidimétrico, no equipamento CT600I (Thermo Scientific). Valor de referência: menor 0,5 mg/dL.

Glicemia: foi determinada pelo método da glicose oxidase, no equipamento CT600I (Thermo Scientific). Valor de referência: 70 a 99 mg/dL.

Insulina: foi determinada pelo método de quimioluminescência, no equipamento Liaison (Diasorin). Valor de referência: 1,9 – 23 µUI/mL.

As concentrações de insulina e glicemia foram utilizadas para o cálculo do *homeostasis model assessment* (HOMA), para estimar a resistência à insulina (HOMA-IR), utilizando a equação:

$$\text{HOMA IR} = \frac{\text{Insulina } (\mu\text{UI/mL}) \times \text{Glicemia } (\text{mMol/L})}{22,5}$$

Lípidios: as dosagens de CT e TG foram determinadas pelo método enzimático colorimétrico e a dosagem de HDL por método direto, no equipamento CT600I (Thermo Scientific). Valor de referência: CT menor que 200 mg/dL, TG menor que 150 mg/dL e HDL maior que 35 mg/dL.

Para dosagens de proteína C reativa, glicemia de jejum, insulina, colesterol total, colesterol HDL e triglicerídeos, utilizamos amostras de todos os participantes do grupo com obesidade e do grupo controle.

3.5 Avaliação imunológica

A avaliação imunológica foi constituída pela análise das citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-17, IFN- γ e IL-10 em sobrenadante de culturas primárias de mononucleares de sangue periférico e pela detecção dos níveis séricos destas citocinas.

As concentrações das citocinas foram avaliadas utilizando dosagens em sobrenadante de poços de cultura que continham mononucleares não estimulados (apenas com meio de cultura) e em poços que continham mononucleares estimulados com LPS ou conconavalina-A.

Para avaliar o efeito da obesidade na atividade imunológica, comparamos o grupo de pacientes obesos antes da cirurgia com o grupo controle; e para avaliar os efeitos da perda de peso induzida pela cirurgia bariátrica sobre a atividade imunológica, comparamos o grupo de pacientes obesos antes e após a cirurgia. Adicionalmente, comparamos os resultados dos dois tempos pós-operatórios com o grupo controle, a fim de avaliar se após a cirurgia os níveis de citocinas dos pacientes com obesidade atingiriam valores semelhantes ao grupo com peso normal.

Para fazer as comparações entre os grupos mencionadas utilizamos:

- 1) os sobrenadantes dos poços de cultura que continham mononucleares estimulados.
- 2) a diferença entre a produção de cada citocina nos poços de cultura de mononucleares não estimulados e estimulados.
- 3) a dosagem das citocinas séricas.

Por fim, analisamos as correlações entre os parâmetros imunológicos com dados clínicos e laboratoriais.

3.5.1 Método para separação de células

As culturas foram desenvolvidas seguindo protocolo já estabelecido no Laboratório de Cultura de Células da FMRP-USP para células mononucleares de sangue periférico, descrito a seguir. Diluiu-se o sangue total coletado em tubos heparinizados de 10 mL com igual volume de salina estéril a 37°C e homogeneizou-se suavemente com pipeta de Pasteur. Em seguida, foi utilizado o gradiente de Ficoll-Hypaque® para a separação das células mononucleares, procedimento no qual o sangue diluído foi aplicado delicadamente às paredes dos tubos de polipropileno contendo Ficoll-Hypaque®. Após centrifugação a 1400 rotações por minuto durante 30 minutos, à temperatura ambiente, verificou-se a formação de camadas distintas, sendo que a superior formada por plasma e plaquetas; a interface, por células mononucleares; a média, por gradiente Ficoll-Hypaque® e a inferior, por granulócitos e hemácias. As células

da camada de mononucleares foram cuidadosamente aspiradas e colocadas em tubo cônico estéril. As células foram resuspensas com salina hipertônica e lavadas duas vezes.

A viabilidade das células mononucleares foi avaliada utilizando-se Azul de Trypan a 2%, cujo princípio do método baseia-se na capacidade de células vivas repelirem o corante, sendo detectado, geralmente, 95 a 98% de células viáveis. Em seguida, foi realizada a contagem desta suspensão em câmara de Neubauer em microscópio óptico, diluindo 5 μ L da suspensão em 100 μ L de corante Turk, que tem a propriedade de lisar hemácias, facilitando a contagem dos glóbulos brancos. As células encontradas nos quatro quadrantes da câmara de Neubauer foram somadas e multiplicadas por 50 (mm^3), acrescentando-se três zeros para se estimar o número de células por mL. A suspensão de células foi diluída com mesmo meio de cultura, enriquecido com soro AB humano 15%, inativado pelo calor, para obter concentrações de células de $2,5 \times 10^6$ células/mL, necessárias para cultura de macrófagos e linfócitos.

3.5.2 Cultura de Macrófagos

As placas de cultura de 24 poços foram preparadas em duplicatas, colocando-se 1,0 mL da suspensão de células mononucleares de sangue periférico, com concentração final de $2,5 \times 10^6$ células/mL em cada poço. A suspensão na placa de cultura foi incubada durante 2 horas a 37°C com 5% de CO₂ para a aderência de mononucleares. Após este período de 2 horas, o sobrenadante foi desprezado, as placas foram lavadas por três vezes com meio de cultura a fim de remover as células não aderidas. A seguir, as células foram resuspensas em meio de cultura contendo 10% de Soro Bovino Fetal puro ou associado à LPS, segundo o protocolo:

- $2,5 \times 10^6$ células para controle sem estímulo
- $2,5 \times 10^6$ células + LPS 1 mL (5 μ g/mL) em duplicatas

As células foram incubadas a 37°C em ambiente úmido e com CO₂ a 5% por 24 horas, quando então, o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C em tubos Eppendorf para posterior quantificação de citocinas.

3.5.3 Cultura de linfócitos

Utilizando placas de 96 poços, foram preparadas culturas em triplicatas com volumes de 0,2 mL cada e concentrações finais de $2,5 \times 10^6$ linfócitos/mL. As células foram

resuspensas em meio de cultura contendo 10% de Soro Bovino Fetal puro ou associado à concanavalina-A (Con-A), um estimulante de proliferação de linfócitos T, segundo o protocolo:

- $2,5 \times 10^6$ células em culturas controles sem estímulo
- $2,5 \times 10^6$ células + Con-A 1 mL (20 $\mu\text{g/mL}$)

As placas foram fechadas e incubadas a 37°C, em ambiente úmido e com CO₂ à concentração aproximada de 5% durante 3 dias.

Completado o período de incubação, os sobrenadantes de cultura foram coletados com uso de pipetas e mantidos a - 80°C em tubos Eppendorf para posterior dosagem de citocinas.

3.5.4 Detecção de citocinas em sobrenadante de cultura primária de mononucleares de sangue periférico

A detecção das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-17, TNF- α , IFN- γ e IL-10 produzidas pelas células mononucleares foi realizada através do ensaio imunoenzimático específico para cada uma delas (ELISA) de acordo com a metodologia descrita pelo fabricante. Foram utilizadas placas previamente sensibilizadas com o anticorpo específico. Os reagentes foram preparados e 100 μL de um tampão à base de proteína colocado em cada poço da placa. O passo seguinte foi colocar 150 μL da amostra nos poços e aguardar o período de incubação. Esse período varia de acordo com as instruções do fabricante para cada citocina. Após a lavagem da placa, cada poço recebeu 200 μL de anticorpo específico conjugado com uma enzima. Após outro período de incubação, realizada novamente a lavagem das placas. A cada poço da placa foi então adicionado o substrato para a enzima. Desenvolveu-se uma reação colorimétrica proporcional à quantidade de proteína ligada ao anticorpo específico.

A detecção das citocinas foi realizada utilizando-se os seguintes kits: BD OptEIA Human IL-1 β ELISA SET (código 558848), BD OptEIA Human IL-6 ELISA SET (código 555220), Human IL17 ELISA SET Ebioscience (código 88-7176-88), BD OptEIA Human TNF - α ELISA SET (código 555212), BD OptEIA Human IFN- γ ELISA SET (código 555142) e BD OptEIA Human IL-10 ELISA SET (código 555157). A reação amplificada foi lida em 490 nm. A concentração de cada citocina foi expressa em pg/mL.

3.5.5 Detecção de citocinas séricas

Amostras de soro de 10 pacientes antes e após 6 e 12 meses da cirurgia e de 6 pacientes do grupo controle foram analisados para detecção das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-17, TNF- α , IFN- γ e IL-10. Para este procedimento foi utilizado kit *Milliplex MAP Kit Human Cytokine* (código HCYTMAG-60K-PX29, Millipore) e o equipamento *Luminex 200*. As determinações das citocinas seguiram protocolo de acordo com as sugestões do fornecedor do kit. O uso deste método automatizado permitiu a detecção quantitativa simultânea das citocinas séricas estudadas.

3.6 Análise estatística

A condição de normalidade das variáveis foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilks. Para verificar as diferenças dos dados antropométricos, exames bioquímicos e leptina foi utilizado o teste t de Student, entre grupo pré-operatório e o grupo controle e entre o grupo de pacientes com obesidade no pré e pós-operatório. Os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Utilizamos testes não paramétricos para verificar a existência de diferenças nos parâmetros imunológicos avaliados e adiponectina, pois as variáveis não apresentavam distribuição Gaussiana. A comparação do grupo controle com grupos pré-operatório, 6 meses pós-operatório e 1 ano pós-operatório foi realizada com teste Mann-Whitney. O teste de Friedman foi utilizado para verificar a existência de diferença entre os três tempos de análise no grupo submetido à cirurgia bariátrica, sendo a seguir usado o teste de Wilcoxon com ajuste de Bonferroni para definir qual era a diferença. Para análise da existência de correlação entre as citocinas e destes resultados com dados clínicos e laboratoriais, utilizamos o coeficiente de Spearman. Adotamos como nível de significância $p < 0,05$. O programa de computador *Statistical Package Social Science* versão 17.0 foi utilizado para análise estatística.

4. RESULTADOS

4.1 Antropometria exames laboratoriais

Foram avaliados dezessete mulheres e três homens, dezoito brancos e dois não brancos, com idade média de $37,65 \pm 8,29$ anos (28 a 56 anos) e IMC pré-operatório médio de $45,24 \pm 4,85$ kg/m² (40,1 a 57,3 kg/m²). Em relação a doenças associadas, onze pacientes eram hipertensos, cinco apresentavam hipotireoidismo, apenas um com anticorpos antitireoide positivo, todos compensados com reposição de levotiroxina, sete apresentavam dislipidemia e sete tinham diagnóstico de pré-diabetes, três deles com tolerância reduzida à glicose e quatro com glicemia de jejum alterada, estando dois em uso de metformina antes da cirurgia. Dez pacientes foram sedentários durante todo o estudo.

Também foram selecionados dez voluntários não obesos para o grupo controle, sete mulheres e três homens, oito brancos e dois não brancos, com idade média $38,8 \pm 8,29$ anos (19 a 56 anos), IMC médio $22,74 \pm 1,46$ kg/m², sem doenças associadas.

A Tabela 1 mostra a casuística e sua caracterização. A Tabela 2 descreve as características antropométricas e os resultados de exames laboratoriais dos grupos controle e com obesidade antes da cirurgia bariátrica.

Tabela 1 - Caracterização da casuística

	Grupo com obesidade	Grupo Controle
<i>n</i>	20	10
Idade (anos)	$37,65 \pm 8,49$	$38,8 \pm 8,30$
Sexo feminino	17 (85%)	7 (70%)
Etnia branca	18 (90%)	8 (80%)
Hipertensão arterial	11 (55%)	0 ***
Dislipidemia	7 (35%)	0 *
Pré-diabetes	7 (35%)	1 (10%)
Hipotireoidismo primário	5 (25%)	0

Variável contínua descrita por média ($\pm$ desvio padrão) e variáveis discretas descritas em número (porcentagem). Utilizado teste t de Student para comparação da variável contínua. Utilizado teste Chi-Quadrado para comparação das variáveis discretas, diferença com $p < 0,05$ (*) e $p < 0,005$ (***)

Não houve diferença significativa na idade, participação de brancos e não brancos e na distribuição por sexo entre grupo com obesidade e o grupo controle. Entretanto, no grupo de pacientes com obesidade houve maior prevalência de hipertensão arterial sistêmica e dislipidemia. Os parâmetros IMC, perímetro abdominal, glicemia de jejum, HOMA-IR, triglicerídeos, PCR e leptina foram maiores no grupo com obesidade em relação ao grupo controle, enquanto o nível de adiponectina e colesterol HDL foram maiores no grupo controle.

Tabela 2 - Características antropométricas e laboratoriais do grupo controle e do grupo com obesidade antes da cirurgia bariátrica

	Grupo com obesidade	Grupo controle	Valor <i>p</i>
<i>n</i>	20	10	-
IMC (kg/m²)	45,14 (± 4,79)	22,74 (± 1,47)	< 0,0001
Perímetro abdominal (cm)	125,25 (± 14,03)	80,1 (± 6,98)	< 0,0001
Massa gorda (%)	50,39 (± 1,73)	-	-
Glicemia (mg/dL)	99,00 (± 11,99)	88,30 (± 6,06)	0,0133
HOMA-IR	1,40 (± 0,69)	0,47 (± 0,14)	0,0003
Triglicerídeos (mg/dL)	149,20 (± 64,09)	93,00 (± 37,71)	0,0166
HDL (mg/dL)	38,30 (± 7,75)	51,30 (± 12,10)	0,0013
PCR (mg/L)	0,96 (± 0,81)	0,10 (± 0,08)	0,0027
Leptina (ng/mL)	35,29 (± 12,00)	7,12 (± 4,48)	< 0,0001
Adiponectina (µg/mL)	10,53 (± 8,35)	16,70 (± 5,40)	0,01

Variáveis contínuas descritas por média (± desvio padrão). Utilizado teste t de Student para comparação das variáveis entre os grupos, exceto adiponectina que foi comparada através do teste Mann Whitney. A porcentagem de massa gorda foi medida por bioimpedância elétrica. Índice de massa corpórea (IMC), *Homeostatic model assessment insulin resistance* (HOMA IR), colesterol HDL (HDL), proteína C reativa (PCR).

A perda de peso média dos pacientes submetidos ao tratamento foi $23,62 \pm 5,88\%$ do peso inicial após 6 meses e $29,25 \pm 6,46\%$ após 1 ano. A perda de peso mínima após 1 ano de cirurgia foi 15% do peso inicial, enquanto a máxima foi 42,2%. Após 6 meses de cirurgia, 17 pacientes (85%) permaneciam com IMC maior que 30 kg/m² e após 1 ano de cirurgia, 12 pacientes (60%) apresentavam IMC maior que 30 kg/m².

As características antropométricas e laboratoriais do grupo com obesidade antes e após cirurgia bariátrica estão representadas na Tabela 3. Em comparação com o pré-operatório, os parâmetros IMC, perímetro abdominal, massa gorda, glicemia de jejum, HOMA-IR, colesterol HDL, triglicerídeos, PCR e leptina foram significativamente menores 6 meses e 12 meses após a cirurgia. No entanto, estas variáveis não tiveram diferenças quando comparadas nos tempos 6 meses e 12 meses pós-operatório. A concentração de adiponectina teve diferença tanto entre o pré-operatório e 6 e 12 meses pós-operatório como entre os dois tempos pós-operatórios.

Tabela 3 - Características antropométricas e laboratoriais do grupo com obesidade antes e após cirurgia bariátrica

	Pré-operatório	6 meses PO	12 meses PO
IMC (kg/m²)	45,14 (± 4,79)	34,36 (± 5,10)****	31,93 (± 4,76)**** ††††
Perímetro abdominal (cm)	125,25 (± 14,03)	110,56 (± 9,22)***	104,17 (± 9,88)****
Massa gorda (%)	50,39 (± 1,73)	42,75 (± 2,81)****	-
Perda de peso (%)	-	23,62 (± 5,89)	29,25 (± 6,47)††††
Glicemia (mg/dL)	99,00 (± 11,99)	89,05 (± 9,44)***	88,00 (± 7,29)***
HOMA – IR	1,40 (± 0,69)	0,57 (± 0,16)****	0,50 (± 0,11)****
Triglicerídeos (mg/dL)	149,20 (± 64,09)	93,37 (± 39,52)***	81,83 (± 29,57)****
HDL	38,30 (± 7,75)	42,63 (± 12,27)	50,44 (± 14,00)***
PCR (mg/L)	0,96 (± 0,81)	0,30 (± 0,34)****	0,26 (± 0,33)***
Leptina (ng/mL)	35,29 (± 12,00)	15,78 (± 8,67)****	13,98 (± 8,44)***
Adiponectina (µg/mL)	10,53 (± 8,35)	14,37 (± 7,67)*	20,10 (± 10,95)*** †††

Variáveis descritas por média (± desvio padrão). Utilizado teste t de Student para comparação dos grupos. Diferença entre pré-operatório e pós-operatório com p<0,05 (*), p<0,01 (**), p<0,005 (***), p< 0,0001 (****). Diferença entre 6 meses e 12 meses pós-operatório com p<0,05 (†), p<0,01 (††), p<0,005(†††), p< 0,0001 (††††). A porcentagem de massa gorda foi medida por bioimpedância elétrica. Índice de massa corpórea (IMC), *Homeostatic model assessment insulin resistance* (HOMA IR), colesterol HDL (HDL), proteína C reativa (PCR), pós-operatório (PO).

4.2 Parâmetros imunológicos

As produções de IL-1 β , IL-6, IL-17, TNF- α , IFN- γ e IL-10 por mononucleares estimulados e não estimulados foram comparadas individualmente. Tanto no grupo controle como no grupo com obesidade antes e após a cirurgia, a produção das citocinas por mononucleares estimulados foi maior que a produção por mononucleares não estimulados ($p < 0,05$).

4.2.1 Comparação da produção de citocinas por células mononucleares estimuladas

A produção de IL-6, TNF- α , IL-1 β e IL-10 por mononucleares estimulados em cultura primária foi maior no grupo com obesidade no pré-operatório em relação ao grupo controle, enquanto não houve diferença na produção de IL-17 e INF- γ na mesma comparação (Figura 4)

Após a cirurgia bariátrica, as produções de TNF- α , IL-1 β e IL-10 tiveram redução significativa no sexto mês pós-operatório em relação ao pré-operatório, entretanto essa diferença não foi observada na avaliação 1 ano após o procedimento. A concentração de IL-17 não foi diferente entre o pré-operatório e 6 meses pós-operatório, mas sua produção foi maior após 1 ano de cirurgia em relação ao pré-operatório. A produção de IL-6 e IFN- γ nos tempos pré e pós-operatórios não teve diferença significativa, apesar da IL-6 ter uma tendência à redução no sexto mês pós-operatório ($p=0,09$) (Figura 5).

As concentrações de IL-6 e IL-1 β no sobrenadante das culturas de mononucleares dos pacientes com obesidade após 6 ou 12 meses da cirurgia permaneceram elevadas quando comparadas ao grupo controle. A concentração de TNF- α também permaneceu elevada após 6 meses de cirurgia quando comparada ao grupo controle e teve uma tendência a manter essa diferença após 1 ano da cirurgia ($p=0,06$). A concentração de IL-10 no sexto mês pós-operatório não teve diferença em sua concentração em relação ao grupo controle, entretanto, na avaliação 1 ano após a cirurgia esta citocina manteve a diferença observada no pré-operatório, tendo concentração maior em relação ao controle. Apesar das dosagens de IL-17 e IFN- γ no sobrenadante das culturas de mononucleares do grupo com obesidade antes da cirurgia não ter diferença em relação ao controle, a concentração de IL-17 foi elevada após 1 ano de cirurgia e de IFN- γ reduzida 6 meses após a cirurgia quando comparadas ao grupo controle (Figura 6).

Figura 4 - Produção de citocinas por células mononucleares, de pacientes no pré-operatório de cirurgia bariátrica e controles, estimuladas em cultura. As concentrações de IL-6 (A), TNF- α (B), IL1- β (C), IL-10 (D), IL-17 (E) e IFN- γ (F) foram determinadas por ensaios imunoenzimáticos (ELISA) em sobrenadante de cultura de mononucleares de sangue periférico. Os resultados estão apresentados como o respectivo valor da citocina para cada uma das amostras nos respectivos grupos. As barras centrais representam a mediana para cada grupo e as barras periféricas o erro padrão. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparação dos dois grupos, com $p < 0,05$ (*), $p < 0,005$ (***).

Figura 5 - Produção de citocinas por células mononucleares, de pacientes no pré e pós-operatórios de cirurgia bariátrica, estimuladas em cultura. As concentrações de IL-6 (A), TNF- α (B), IL-1 β (C), IL-10 (D), IL-17 (E) e INF- γ (F) foram determinadas por ensaios imunoenzimáticos (ELISA) em sobrenadante de cultura de mononucleares de sangue periférico. Os resultados estão apresentados como o respectivo valor da citocina para cada uma das amostras nos respectivos grupos. As barras centrais representam a mediana para cada grupo e as barras periféricas o erro padrão. Utilizado o teste de Friedman para verificar a existência de diferença entre os 3 tempos do grupo com obesidade, sendo a seguir usado o teste de Wilcoxon com ajuste de Bonferroni para definir qual era a diferença, com $p < 0,05$ (*), $p < 0,005$ (***). Pós-operatório (PO).

Figura 6 - Produção de citocinas por células mononucleares, de pacientes no pré e pós-operatório de cirurgia bariátrica e controles, estimuladas em cultura. As concentrações de IL-6 (A), TNF- α (B), IL1- β (C), IL-10 (D), IL-17 (E) e INF- γ (F) foram determinadas por ensaios imunoenzimáticos (ELISA) em sobrenadante de cultura de mononucleares de sangue periférico. Os resultados estão apresentados como o respectivo valor da citocina para cada uma das amostras nos respectivos grupos. As barras centrais representam a mediana para cada grupo e as barras periféricas o erro padrão. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparação do grupo controle com os 3 tempos de análise do grupo com obesidade, $p < 0,05$ (*), $p < 0,005$ (***). Pós-operatório (PO).

4.2.2 Comparação da diferença entre a produção de citocinas sem e com estímulo nas culturas de mononucleares

Na Figura 7, a qual representa graficamente a diferença entre a produção de citocinas por mononucleares sem ou com estímulo por LPS ou ConA, observamos que a resposta ao estímulo foi maior na produção de IL-6, TNF- α e IL-1 β pelas células do grupo de pacientes no pré-operatório em relação ao grupo controle. Entretanto, não observamos diferença na resposta ao estímulo da produção de IL-10, IL-17 e INF- γ . Quando comparada a diferença entre a produção de citocinas sem ou com estímulo por mononucleares dos pacientes com obesidade antes e após a cirurgia, observamos que a resposta ao estímulo vista na produção de TNF- α , e IL-1 β foi significativamente menor apenas no sexto mês pós-operatório. A resposta ao estímulo na produção de IL-17 foi maior 6 meses após quando comparado ao pré-operatório e teve tendência a ser maior 12 meses pós-operatório ($p=0,05$). A resposta ao estímulo na produção de IL-6 e INF- γ nos tempos pré e pós-operatório não mostrou diferença significativa (Figura 8).

As diferenças entre a produção de IL-1 β no sobrenadante de cultura, sem ou com estímulo, dos pacientes com obesidade 6 e 12 meses após a cirurgia foram maiores quando comparadas ao grupo controle, entretanto, a resposta ao estímulo na produção de IL-6 e TNF- α foi maior apenas 6 meses após cirurgia quando comparada ao grupo controle e não houve diferença na diferença de produção de IL-10 e IL-17 no pós-operatório quando comparado ao grupo controle. A diferença entre a produção de INF- γ no sobrenadante de cultura, sem ou com estímulo, foi menor após 6 meses de cirurgia quando comparada ao grupo controle (Figura 9).

Figura 7 - Diferença entre produção de citocinas por células mononucleares, de pacientes no pré-operatório de cirurgia bariátrica e controles, estimuladas ou não estimuladas em cultura. Diferença entre concentrações de IL-6 (A), TNF- α (B), IL1- β (C), IL-10 (D), IL-17 (E) e INF- γ (F) determinadas por ensaios imunoenzimáticos (ELISA) em sobrenadante de cultura, estimuladas ou não estimuladas, de mononucleares de sangue periférico. Os resultados estão apresentados como o respectivo valor da diferença para cada paciente nos respectivos grupos. As barras centrais representam a mediana para cada grupo e as barras periféricas o erro padrão. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparação dos dois grupos, com $p < 0,05$ (*), $p < 0,005$ (***).

Figura 8 - Diferença entre produção de citocinas por células mononucleares, de pacientes no pré e pós-operatórios de cirurgia bariátrica, estimuladas ou não estimuladas em cultura. Diferenças entre concentrações de IL-6 (A), TNF- α (B), IL1- β (C), IL-10 (D), IL-17 (E) e INF- γ (F) determinadas por ensaios imunoenzimáticos (ELISA) em sobrenadante de cultura, estimuladas ou não estimulada, de mononucleares de sangue periférico. Os resultados estão apresentados como o respectivo valor da diferença para cada paciente nos respectivos grupos. As barras centrais representam a mediana para cada grupo e as barras periféricas o erro padrão. Utilizado o teste de Friedman para verificar a existência de diferença entre os 3 tempos do grupo com obesidade, sendo a seguir usado o teste de Wilcoxon com ajuste de Bonferroni para definir qual era a diferença, com $p < 0,05$ (*). Pós-operatório (PO).

Figura 9 - Diferença entre produção de citocinas por células mononucleares, de pacientes no pré e pós-operatório de cirurgia bariátrica e controles, estimuladas ou não estimuladas em cultura. Diferenças entre concentrações de IL-6 (A), TNF- α (B), IL1- β (C), IL-10 (D), IL-17 (E) e INF- γ (F) determinadas por ensaios imunoenzimáticos (ELISA) em sobrenadante de cultura, estimuladas ou não estimuladas, de mononucleares de sangue periférico. Os resultados estão apresentados como o respectivo valor da diferença para cada paciente nos respectivos grupos. As barras centrais representam a mediana para cada grupo e as barras periféricas o erro padrão. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparação do grupo controle com os 3 tempos de análise do grupo com obesidade, com $p < 0,05$ (*).

4.2.3 Comparação dos níveis séricos de citocinas

A comparação das concentrações de citocinas séricas entre o grupo com obesidade no pré-operatório e o grupo controle não mostrou diferença. A mesma comparação entre o grupo com obesidade antes e após cirurgia mostrou diferença na concentração de INF- γ , que foi maior no pré-operatório em relação a 1 ano após cirurgia (Tabela 4).

Tabela 4 - Dosagem de citocinas séricas dos grupos controle e com obesidade antes e após cirurgia bariátrica.

	Pré-operatório	6 meses PO	12 meses PO	Controle
<i>n</i>	10	10	10	6
IL-6 (pg/mL)	6,90 (5,38 – 54,86)	5,56 (4,40 – 8,27)	5,20 (3,34 – 8,19)	6,43 (6,43 – 8,32)
TNFα (pg/mL)	10,20 (7,90 – 12,47)	11,34 (8,99- 13,25)	9,63 (6 – 89 – 12,07)	10,55 (10,56 – 11,08)
IL-1β (pg/mL)	4,04 (3,29 – 4,48)	3,44 (2,85 – 3,89)	3,50 (2,85 – 4,83)	3,94 (3,94 – 4,63)
IL-10 (pg/mL)	9,37 (7,99- 11,47)	8,93 (7,52 – 9,69)	7,52 (8,27 – 10,00)	9,37 (9,37 – 9,44)
IL-17 (pg/mL)	8,91 (7,00 – 26,61)	8,70 (7,66 – 9,85)	8,70 (7,78 – 9,74)	9,20 (9,20 – 10,01)
INF-γ (pg/mL)	24,43 (14,33 – 37,91)	13,21 (10,84 – 15,70)	14,01 (10,89 – 23,34) *	13,21 (19,61 – 21,64)

Concentrações séricas medidas por ELISA de IL-6, TNF- α , IL-1 β , IL-10, IL-17 e INF- γ do grupo controle e do grupo com obesidade antes e após cirurgia bariátrica. Variáveis descritas por mediana e variação (*range*). Comparação dos grupos com teste de Man-Whitney, $p = 0,02$ (*). Grupo com obesidade antes da cirurgia bariátrica (Pré-operatório), grupo com obesidade 6 meses após cirurgia bariátrica (6 meses PO), grupo com obesidade 12 meses após cirurgia bariátrica (12 meses PO) e grupo controle (Controle).

4.2.4 Correlações dos parâmetros imunológicos

Analisando os resultados obtidos em sobrenadante de cultura, houve correlação positiva entre as concentrações de IL-6, TNF- α e IL-1 β no pré-operatório, assim como 6 meses e 1 ano após a cirurgia. Já a concentração de IL-10 teve correlação positiva com IL-6, TNF- α e IL-1 β no pré-operatório, com INF- γ após 6 meses da cirurgia e com IL-1 β 1 ano após a cirurgia. A concentração de INF- γ teve correlação negativa com IL-1 β no pré-

operatório e 1 ano após cirurgia. A IL-17 dosada em sobrenadante de cultura não apresentou correlação com as outras citocinas analisadas (Tabela 5).

Tabela 5 - Correlação entre produção de citocinas em cultura de mononucleares estimulados do grupo com obesidade antes e após cirurgia bariátrica.

		IL-6	TNF α	IL-1 β	IL-10	IL-17
Pré-operatório	TNF α	r = 0,944 p < 0,0001	-	-	-	-
	IL-1 β	r = 0,884 p < 0,0001	r = 0,902 p < 0,0001	-	-	-
	IL-10	r = 0,729 p < 0,0001	r = 0,642 p = 0,002	r = 0,674 p < 0,0001	-	-
	IL-17	r = 0,09 p = 0,970	r = - 0,032 p = 0,895	r = - 0,009 p = 0,970	r = - 0,284 p = 0,225	-
	IFN γ	r = -0,382 p = 0,097	r = - 0,41 p = 0,072	r = - 0,480 p = 0,032	r = - 0,083 p = 0,729	r = - 0,215 p = 0,363
6 meses PO	TNF α	r = 0,633 p = 0,003	-	-	-	-
	IL-1 β	r = 0,724 p < 0,0001	r = 0,682 p = 0,01	-	-	-
	IL-10	r = - 0,155 p = 0,514	r = 0,065 p = 0,787	r = 0,77 p = 0,745	-	-
	IL-17	r = 0,092 p = 0,701	r = 0,171 p = 0,470	r = - 0,022 p = 0,927	r = 0,080 p = 0,738	-
	IFN γ	r = - 0,298 p = 0,202	r = - 0,123 p = 0,607	r = - 0,148 p = 0,533	r = 0,803 p < 0,0001	r = 0,184 p = 0,437
12 meses PO	TNF α	r = 0,802 p < 0,0001	-	-	-	-
	IL-1 β	r = 0,680 p = 0,01	r = 0,662 p = 0,01	-	-	-
	IL-10	r = 0,026 p = 0,915	r = 0,171 p = 0,470	r = 0,570 p = 0,009	-	-
	IL-17	r = 0,020 p = 0,935	r = - 0,44 p = 0,855	r = 0,050 p = 0,835	r = 0,367 p = 0,112	-
	IFN γ	r = - 0,383 p = 0,095	r = - 0,385 p = 0,094	r = - 0,589 p = 0,006	r = - 0,371 p = 0,107	r = - 0,272 p = 0,246

Correlação entre concentrações de citocinas em sobrenadante de cultura de mononucleares de sangue periférico estimulados do grupo com obesidade antes e após 6 meses e 12 meses de cirurgia bariátrica. O coeficiente de Spearman foi utilizado. Grupo com obesidade antes da cirurgia bariátrica (Pré-operatório), grupo com obesidade 6 meses após cirurgia bariátrica (6 meses PO), grupo com obesidade 12 meses após cirurgia bariátrica (12 meses PO). Correlações com $p < 0,05$ em *negrito*.

Observamos correlação negativa entre a concentração de IL-6 no sobrenadante de cultura e a dosagem sérica desta citocina no grupo com obesidade antes da cirurgia bariátrica ($r = - 0,66$ e $p = 0,04$), assim como a concentração de IFN- γ em sobrenadante de cultura teve correlação positiva com a sua dosagem sérica no grupo com obesidade no pré-operatório ($r =$

0,85 e $p = 0,02$). As concentrações de TNF- α , IL-1 β , IL-10 e IL-17 no sobrenadante de cultura não tiveram correlação com seus níveis séricos.

As Tabelas 6 e 7 mostram as correlações entre concentrações das citocinas nos sobrenadantes de cultura e dados clínicos e laboratoriais. Na avaliação antes da cirurgia, a concentração de TNF- α teve correlação positiva com a glicemia de jejum, IL-6 teve correlação positiva com HOMA-IR, mas IFN- γ teve correlação negativa com HOMA-IR. Após 6 meses da cirurgia, houve correlação positiva tanto de IFN- γ como de IL-10 com IMC e porcentagem de massa gorda. Após 1 ano da cirurgia, houve correlação negativa entre a concentração de TNF- α e colesterol HDL e positiva entre IFN- γ e glicemia de jejum.

Tabela 6 - Correlação entre produção estimulada de citocinas em cultura de mononucleares estimulados e características clínicas e laboratoriais do grupo com obesidade antes da cirurgia bariátrica.

	IL-6	TNF- α	IL-1 β	IL-17	IL-10	IFN- γ
IMC (kg/m²)	$r = 0,084$ $p = 0,724$	$r = 0,214$ $p = 0,366$	$r = 0,027$ $p = 0,910$	$r = -0,116$ $p = 0,627$	$r = -0,045$ $p = 0,850$	$r = 0,275$ $p = 0,240$
Massa gorda (%)	$r = 0,310$ $p = 0,456$	$r = 0,262$ $p = 0,531$	$r = -0,19$ $p = 0,651$	$r = 0,119$ $p = 0,779$	$r = -0,0095$ $p = 0,823$	$r = 0,167$ $p = 0,693$
Glicemia (mg/dL)	$r = 0,340$ $p = 0,142$	$r = 0,464$ $p = 0,039$	$r = 0,390$ $p = 0,089$	$r = -0,123$ $p = 0,604$	$r = 0,146$ $p = 0,539$	$r = -0,002$ $p = 0,992$
HOMA-IR	$r = 0,463$ $p = 0,04$	$r = 0,382$ $p = 0,097$	$r = 0,370$ $p = 0,108$	$r = 0,002$ $p = 0,995$	$r = 0,304$ $p = 0,193$	$r = -0,558$ $p = 0,011$
HDL (mg/dL)	$r = -0,214$ $p = 0,366$	$r = -0,129$ $p = 0,588$	$r = -0,006$ $p = 0,980$	$r = -0,110$ $p = 0,644$	$r = -0,096$ $p = 0,688$	$r = 0,229$ $p = 0,331$
Triglicerídeos (mg/dL)	$r = 0,229$ $p = 0,332$	$r = 0,128$ $p = 0,591$	$r = 0,033$ $p = 0,890$	$r = 0,180$ $p = 0,446$	$r = 0,081$ $p = 0,734$	$r = -0,313$ $p = 0,179$
PCR (mg/L)	$r = -0,183$ $p = 0,439$	$r = -0,275$ $p = 0,240$	$r = -0,128$ $p = 0,591$	$r = 0,251$ $p = 0,286$	$r = -0,062$ $p = 0,796$	$r = -0,198$ $p = 0,402$
Leptina (ng/mL)	$r = 0,055$ $p = 0,881$	$r = 0,55$ $p = 0,881$	$r = -0,067$ $p = 0,855$	$r = -0,176$ $p = 0,627$	$r = -0,055$ $p = 0,881$	$r = 0,055$ $p = 0,881$
Adiponectina (μg/mL)	$r = -0,212$ $p = 0,556$	$r = -0,212$ $p = 0,556$	$r = -0,321$ $p = 0,365$	$r = -0,394$ $p = 0,260$	$r = 0,067$ $p = 0,855$	$r = 0,261$ $p = 0,467$

Correlação entre concentrações de citocinas em sobrenadante de cultura de mononucleares de sangue periférico estimulados e características clínicas e laboratoriais do grupo de pacientes com obesidade antes da cirurgia bariátrica. O coeficiente de Spearman foi utilizado. A porcentagem de massa gorda foi medida por bioimpedância elétrica. Índice de massa corpórea (IMC), *Homeostatic model assessment insulin resistance* (HOMA-IR), colesterol HDL (HDL), proteína C reativa (PCR). Correlações com $p < 0,05$ em *negrito*.

Tabela 7 - Correlação entre produção estimulada de citocinas em cultura de mononucleares estimulados e características clínicas e laboratoriais do grupo com obesidade após cirurgia bariátrica.

		IL-6	TNF- α	IL-1 β	IL-17	IL-10	INF- γ
6 meses PO	IMC (kg/m ²)	r = - 0,256 p = 0,277	r = - 0,293 p = 0,210	r = - 0,126 p = 0,598	r = 0,021 p = 0,598	r = 0,492 p = 0,028	r = 0,556 p = 0,011
	Massa gorda (%)	r = - 0,095 p = 0,823	r = 0,167 p = 0,693	r = 0,071 p = 0,598	r = 0,760 p = 0,233	r = 0,810 p = 0,015	r = 0,929 p = 0,001
	Perda de peso (%)	r = 0,281 p = 0,230	r = 0,269 p = 0,251	r = 0,194 p = 0,412	r = - 0,263 p = 0,262	r = - 0,301 p = 0,198	r = - 0,405 p = 0,077
	Glicemia (mg/dL)	r = - 0,135 p = 0,569	r = 0,013 p = 0,957	r = 0,040 p = 0,869	r = - 0,439 p = 0,053	r = 0,041 p = 0,862	r = 0,095 p = 0,691
	HOMA – IR	r = - 0,180 p = 0,447	r = 0,161 p = 0,499	r = 0,100 p = 0,674	r = - 0,309 p = 0,185	r = 0,396 p = 0,084	r = 0,235 p = 0,318
	HDL (mg/dL)	r = 0,188 p = 0,441	r = - 0,120 p = 0,624	r = - 0,101 p = 0,681	r = 0,097 p = 0,694	r = - 0,076 p = 0,756	r = 0,064 p = 0,796
	Triglicerídeos (mg/dL)	r = 0,039 p = 0,875	r = 0,295 p = 0,220	r = 0,09 p = 0,972	r = 0,300 p = 0,212	r = 0,240 p = 0,323	r = 0,066 p = 0,789
	PCR (mg/L)	r = 0,053 p = 0,825	r = 0,059 p = 0,806	r = - 0,187 p = 0,429	r = 0,316 p = 0,175	r = 0,432 p = 0,057	r = 0,224 p = 0,342
	Leptina (ng/mL)	r = - 0,188 p = 0,603	r = - 0,273 p = 0,446	r = - 0,139 p = 0,701	r = - 0,006 p = 0,987	r = 0,212 p = 0,556	r = 0,042 p = 0,907
	Adiponectina (µg/mL)	r = - 0,067 p = 0,855	r = - 0,091 p = 0,801	r = 0,406 p = 0,244	r = - 0,370 p = 0,293	r = - 0,370 p = 0,293	r = - 0,079 p = 0,829
12 meses PO	IMC (kg/m ²)	r = - 0,287 p = 0,220	r = - 0,155 p = 0,514	r = - 0,308 p = 0,186	r = - 0,06 p = 0,801	r = - 0,003 p = 0,990	r = 0,170 p = 0,474
	Perda peso (%)	r = 0,366 p = 0,113	r = 0,209 p = 0,376	r = 0,241 p = 0,306	r = - 0,166 p = 0,486	r = - 0,081 p = 0,773	r = 0,034 p = 0,887
	Glicemia (mg/dL)	r = - 0,370 p = 0,108	r = - 0,355 p = 0,124	r = - 0,282 p = 0,229	r = - 0,292 p = 0,212	r = - 0,189 p = 0,425	r = 0,534 p = 0,015
	HOMA – IR	r = 0,331 p = 0,153	r = 0,282 p = 0,228	r = 0,402 p = 0,079	r = - 0,334 p = 0,149	r = 0,031 p = 0,897	r = - 0,180 p = 0,446
	HDL (mg/dL)	r = - 0,138 p = 0,584	r = - 0,493 p = 0,038	r = 0,073 p = 0,774	r = 0,133 p = 0,598	r = 0,152 p = 0,548	r = 0,116 p = 0,645
	Triglicerídeos (mg/dL)	r = 0,236 p = 0,345	r = 0,198 p = 0,430	r = 0,186 p = 0,460	r = - 0,124 p = 0,624	r = 0,015 p = 0,951	r = 0,126 p = 0,618
	PCR (mg/L)	r = - 0,004 p = 0,987	r = 0,229 p = 0,331	r = 0,01 p = 0,967	r = - 0,005 p = 0,982	r = 0,109 p = 0,648	r = - 0,348 p = 0,133
	Leptina (ng/mL)	r = - 0,200 p = 0,580	r = - 0,479 p = 0,162	r = 0,127 p = 0,726	r = 0,527 p = 0,117	r = 0,430 p = 0,214	r = - 0,345 p = 0,328
	Adiponectina (µg/mL)	r = - 0,067 p = 0,855	r = - 0,15 p = 0,128	r = 0,406 p = 0,244	r = - 0,261 p = 0,467	r = 0,188 p = 0,603	r = 0,455 p = 0,187

Correlação entre concentrações de citocinas em sobrenadante de cultura de mononucleares de sangue periférico estimulados e características clínicas e laboratoriais do grupo de pacientes com obesidade após cirurgia. O coeficiente de Spearman foi utilizado. Grupo com obesidade 6 meses após cirurgia bariátrica (6 meses PO), grupo com obesidade 12 meses após cirurgia bariátrica (12 meses PO). A porcentagem de massa gorda foi medida por bioimpedância elétrica. Índice de massa corpórea (IMC), *Homeostatic model assessment insulin resistance* (HOMA IR), colesterol HDL (HDL), proteína C reativa (PCR). Correlações com $p < 0,05$ em *negrito*.

As correlações dos níveis séricos das citocinas com dados clínicos e laboratoriais estão representados nas Tabelas 8 e 9. No pré-operatório, HOMA-IR teve correlação negativa com IL-6 e com IFN- γ , enquanto colesterol HDL teve correlação positiva com IL-17 e IFN- γ . No pós-operatório, a concentração sérica de IL-17 teve correlação negativa após 6 meses com adiponectina e após 1 ano com a porcentagem de perda de peso e HDL. O nível sérico de IL-6 teve correlação após 1 ano de cirurgia positiva com triglicerídeos e negativa com HDL e adiponectina. A concentração de IFN- γ no soro teve correlação negativa com a porcentagem de perda de peso após 1 ano da cirurgia enquanto IL-10 teve correlação positiva com a glicemia após 1 ano de cirurgia.

Tabela 8 - Correlação entre dosagens séricas de citocinas e características clínicas e laboratoriais do grupo com obesidade antes da cirurgia bariátrica.

	IL-6	TNF- α	IL-1 β	IL-17	IL-10	IFN- γ
IMC (kg/m²)	r = 0,309 p = 0,385	r = 0,365 p = 0,300	r = - 0,061 p = 0,867	r = 0,406 p = 0,244	r = 0,139 p = 0,701	r = 0,444 p = 0,199
Glicemia (mg/dL)	r = - 0,476 p = 0,165	r = - 0,306 p = 0,390	r = - 0,396 p = 0,258	r = - 0,384 p = 0,273	r = - 0,085 p = 0,815	r = - 0,443 p = 0,199
HOMA-IR	r = - 0,673 p = 0,033	r = - 0,590 p = 0,073	r = - 0,360 p = 0,307	r = - 0,564 p = 0,090	r = - 0,176 p = 0,627	r = - 0,663 p = 0,037
HDL (mg/dL)	r = 0,450 p = 0,192	r = 0,021 p = 0,953	r = 0,498 p = 0,143	r = 0,705 p = 0,023	r = - 0,158 p = 0,663	r = 0,646 p = 0,043
Triglicerídeos (mg/dL)	r = - 0,079 p = 0,829	r = 0,116 p = 0,751	r = - 0,073 p = 0,841	r = - 0,273 p = 0,446	r = 0,333 p = 0,347	r = - 0,103 p = 0,776
PCR (mg/L)	r = 0,055 p = 0,881	r = 0,134 p = 0,713	r = 0,360 p = 0,307	r = 0,273 p = 0,446	r = 0,091 p = 0,803	r = 0,158 p = 0,663
Leptina (ng/mL)	r = 0,214 p = 0,645	r = - 0,072 p = 0,878	r = - 0,342 p = 0,452	r = 0,464 p = 0,294	r = - 0,464 p = 0,294	r = 0,179 p = 0,702
Adiponectina (μg/mL)	r = 0,464 p = 0,294	r = - 0,072 p = 0,878	r = - 0,324 p = 0,478	r = 0,536 p = 0,215	r = - 0,429 p = 0,337	r = 0,357 p = 0,432

Correlação entre concentrações de citocinas séricas e características clínicas e laboratoriais do grupo de pacientes com obesidade antes da cirurgia. O coeficiente de Spearman foi utilizado. Índice de massa corpórea (IMC), *Homeostatic model assessment insulin resistance* (HOMA IR), colesterol HDL (HDL), proteína C reativa (PCR). Correlações com $p < 0,05$ em *negrito*.

Tabela 9 - Correlação entre dosagens séricas de citocinas e características clínicas e laboratoriais do grupo com obesidade após cirurgia bariátrica.

		IL-6	TNF- α	IL-1 β	IL-17	IL-10	INF- γ
6 meses PO	IMC (kg/m ²)	r = 0,457 p = 0,184	r = 0,564 p = 0,090	r = - 0,030 p = 0,934	r = 0,382 p = 0,276	r = 0,127 p = 0,726	r = 0,213 p = 0,555
	Perda de peso (%)	r = - 0,280 p = 0,432	r = - 0,297 p = 0,405	r = 0,030 p = 0,934	r = - 0,248 p = 0,489	r = 0,055 p = 0,881	r = 0,006 p = 0,987
	Glicemia (mg/dL)	r = 0,015 p = 0,967	r = 0,553 p = 0,097	r = 0,128 p = 0,725	r = 0,383 p = 0,275	r = 0,559 p = 0,093	r = - 0,049 p = 0,894
	HOMA – IR	r = 0,306 p = 0,390	r = 0,444 p = 0,199	r = 0,486 p = 0,154	r = 0,492 p = 0,148	r = 0,304 p = 0,393	r = 0,189 p = 0,601
	HDL (mg/dL)	r = 0,235 p = 0,542	r = 0,059 p = 0,881	r = 0,335 p = 0,379	r = 0,184 p = 0,635	r = 0,418 p = 0,262	r = 0,209 p = 0,589
	Triglicerídeos (mg/dL)	r = - 0,552 p = 0,123	r = - 0,183 p = 0,637	r = 0,017 p = 0,966	r = 0,017 p = 0,966	r = - 0,400 p = 0,286	r = 0,083 p = 0,831
	PCR (mg/L)	r = 0,367 p = 0,297	r = 0,030 p = 0,934	r = 0,438 p = 0,206	r = 0,486 p = 0,154	r = - 0,359 p = 0,309	r = 0,267 p = 0,455
	Leptina (ng/mL)	r = 0,270 p = 0,558	r = 0,714 p = 0,071	r = - 0,214 p = 0,645	r = 0,071 p = 0,879	r = 0,250 p = 0,589	r = 0,487 p = 0,268
12 meses PO	Adiponectina (μ g/mL)	r = - 0,559 p = 0,192	r = 0,071 p = 0,879	r = - 0,286 p = 0,535	r = - 0,821 p = 0,023	r = - 0,536 p = 0,215	r = - 0,523 p = 0,229
	IMC (kg/m ²)	r = 0,158 p = 0,663	r = 0,539 p = 0,108	r = - 0,055 p = 0,880	r = 0,432 p = 0,213	r = 0,067 p = 0,853	r = 0,624 p = 0,054
	Perda de peso (%)	r = - 0,256 p = 0,475	r = - 0,109 p = 0,763	r = - 0,278 p = 0,436	r = - 0,726 p = 0,018	r = - 0,215 p = 0,550	r = - 0,644 p = 0,044
	Glicemia (mg/dL)	r = 0,312 p = 0,379	r = 0,566 p = 0,088	r = 0,418 p = 0,229	r = - 0,129 p = 0,722	r = 0,682 p = 0,030	r = 0,233 p = 0,517
	HOMA – IR	r = 0,229 p = 0,524	r = 0,018 p = 0,960	r = 0,104 p = 0,774	r = - 0,275 p = 0,442	r = 0,210 p = 0,561	r = - 0,238 p = 0,508
	HDL (mg/dL)	r = - 0,702 p = 0,035	r = - 0,061 p = 0,876	r = - 0,093 p = 0,813	r = - 0,733 p = 0,025	r = - 0,036 p = 0,928	r = - 0,105 p = 0,788
	Triglicerídeos (mg/dL)	r = 0,762 p = 0,017	r = 0,400 p = 0,286	r = 0,067 p = 0,864	r = 0,109 p = 0,781	r = 0,170 p = 0,663	r = - 0,067 p = 0,865
	PCR (mg/L)	r = 0,14 p = 0,611	r = - 0,110 p = 0,762	r = - 0,375 p = 0,285	r = 0,451 p = 0,191	r = - 0,359 p = 0,308	r = - 0,086 p = 0,814
	Leptina (ng/mL)	r = - 0,018 p = 0,969	r = 0,679 p = 0,094	r = - 0,162 p = 0,728	r = - 0,018 p = 0,969	r = 0,018 p = 0,969	r = 0,321 p = 0,482
	Adiponectina (μ g/mL)	r = - 0,757 p = 0,049	r = 0,429 p = 0,337	r = - 0,378 p = 0,403	r = - 0,721 p = 0,068	r = - 0,180 p = 0,699	r = - 0,071 p = 0,879

Correlação entre concentrações de citocinas séricas e características clínicas e laboratoriais do grupo de pacientes com obesidade após da cirurgia. O coeficiente de Spearman foi utilizado. Grupo com obesidade 6 meses após cirurgia bariátrica (6 meses PO), grupo com obesidade 12 meses após cirurgia bariátrica (12 meses PO). Índice de massa corpórea (IMC), *Homeostatic model assessment insulin resistance* (HOMA IR), colesterol HDL (HDL), proteína C reativa (PCR). Correlações com $p < 0,05$ em *negrito*.

5. DISCUSSÃO

A inflamação associada à obesidade é caracterizada por uma ativação crônica e de baixa intensidade do sistema imunológico. Superpostos a condições crônicas próprias da obesidade, episódios agudos recorrentes de exposição a dietas ricas em gordura ativam o sistema imunológico (O'Rourke, 2013). O tecido adiposo é o órgão no qual se observam os primeiros sinais do processo inflamatório da obesidade. Com o aumento do peso, a população de leucócitos que infiltram o tecido adiposo branco aumenta significativamente (Sell *et al.*, 2012).

A participação dos MNSP na origem e manutenção da inflamação sistêmica associada à obesidade não está bem clara. Razolli e colaboradores utilizaram cobaias submetidas a transplante de medula óssea para avaliar o efeito da perda de função do TLR-4 exclusivamente em células derivadas da medula óssea, comparando com cobaias com perda de função deste receptor em outras células do organismo não derivadas da medula óssea. A conclusão do trabalho foi que a presença do TLR-4 nas células hematopoéticas é determinante para: ativação da inflamação, desenvolvimento de resistência a insulina e aumento de peso induzidos por dieta hiperlipídica (Razolli *et al.*, 2015).

Considerando as evidências da relação entre inflamação e disfunções metabólicas associadas à obesidade e os obstáculos para o uso de marcadores inflamatórios séricos isoladamente como ferramenta para estratificação de risco de doença ou como alvo terapêutico, decidimos estudar o comportamento dos MNSP na obesidade através de cultura de células, bem como sua relação com dados clínicos e o efeito da perda de peso nesta atividade. Estudar a inflamação na obesidade cria a perspectiva de futuramente existir um tratamento efetivo não invasivo para obesidade e com efeito amplo em diversas patologias associadas.

Para evitar interferência de inúmeros fatores nos parâmetros imunológicos, usamos como critérios de exclusão, condições que reconhecidamente modificam a resposta imune, como doenças auto-imunes, tabagismo, infecções, uso de anti-inflamatórios ou imunossupressores. Apesar de estudos prévios demonstrarem efeito da hiperglicemia na imunidade (Jafar *et al.*, 2016), não excluimos pacientes portadores de pré-diabetes, para que não houvesse restrição excessiva da população estudada. Nosso estudo incluiu pacientes submetidos à cirurgia de derivação gástrica com reconstrução em Y de Roux pelas técnicas aberta e laparoscópica. Partimos do pressuposto que não haveria interferência da via de acesso cirúrgico nos resultados, visto que a avaliação dos parâmetros imunológicos ocorreu a partir de 6 meses do procedimento.

A perda de peso após os primeiros 6 meses da cirurgia teve uma média de 23,62 ($\pm$ 5,88)% e após 12 meses 29,25 ($\pm$ 6,46)%. Esses resultados estão de acordo com a perda de peso esperada após DGYR (Buchwald *et al.*, 2004).

Após 6 meses e 12 meses da cirurgia, como esperado, observamos queda da glicemia de jejum, HOMA-IR, triglicerídeos, PCR e aumento do HDL. A leptina foi elevada no grupo com obesidade no pré-operatório em relação ao controle e teve queda após a perda de peso. A adiponectina foi reduzida no grupo com obesidade comparada ao controle e teve aumento significativo após a cirurgia bariátrica. As concentrações de leptina e adiponectina antes e após cirurgia foram compatíveis com dados da literatura (Cawthorn *et al.*, 2014).

Os resultados que obtivemos na dosagem de citocinas em sobrenadante de cultura de MNSP evidenciaram que as células obtidas em pacientes com obesidade, em relação a pacientes com peso normal, tiveram maior produção estimulada de IL-6, TNF- α , IL-1 β e IL-10. A diferença entre a produção de IL-6, TNF α e IL1 β sem estímulo e com estímulo de LPS ou ConA também foi maior nos sobrenadantes de cultura do grupo com obesidade em relação ao grupo controle. Não observamos diferença da produção das citocinas pró-inflamatórias INF- γ e IL-17 dosadas nos sobrenadantes de culturas de MNSP no grupo com obesidade em relação ao grupo com peso normal.

Estudos prévios demonstraram que nos pacientes com obesidade: a) o tecido adiposo branco subcutâneo e visceral tem maior população de leucócitos quando comparado ao mesmo tecido de indivíduos de peso normal (Revelo *et al.*, 2014); b) estas células se encontram com ativação pró-inflamatória, principalmente no TAV (O'rourke *et al.*, 2009); c) os níveis séricos de citocinas estão aumentados nos quadros de obesidade e doença metabólica, sendo o maior número de estudos realizados com avaliação de IL-6 e PCR (O'rourke, 2013); d) os MNSP têm maior expressão de RNA avaliada por reação em cadeia da polimerase de citocinas pró-inflamatórias e atividade do NFkB avaliada por EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) (Ghanim *et al.*, 2004; Sheu *et al.*, 2008; Bories *et al.*, 2012), além de maior expressão de receptores de quimocinas na superfície (Krinninger *et al.*, 2014). Desta maneira, as maiores produções por MNSP em cultura de IL-6, TNF- α e IL-1 β que observamos nos pacientes com obesidade estão de acordo com as evidências de aumento da inflamação sistêmica e ativação pró-inflamatória dos MNSP nos quadros de obesidade. No entanto, um estudo prévio mostrou resultado oposto, com menor produção de IL-6, TNF- α por MNSP em cultura de sangue total de pacientes com obesidade (Tussing-Humphreys *et al.*, 2011).

A IL-10, citocina com ação anti-inflamatória, teve sua concentração elevada em sobrenadante de cultura no grupo com obesidade em relação ao grupo controle. Anteriormente foi demonstrado por Esposito e colaboradores que os níveis séricos de IL-10 encontram-se elevados em humanos com obesidade e que a presença de síndrome metabólica, tanto em pacientes com obesidade quanto nos de peso normal, está associada a níveis reduzidos da IL-10 (Esposito *et al.*, 2003). Estes achados sugerem que o aumento da IL-10 na obesidade tem a função de equilibrar e limitar o processo inflamatório e que quando a resposta anti-inflamatória através da ação de IL-10 é inadequada, possivelmente por fatores genéticos, há maior risco de síndrome metabólica. Esta teoria foi reforçada por estudo no qual linfócitos B colhidos em sangue periférico de pacientes com diabetes apresentaram maior expressão de receptores TLR e citocina IL-8 e menor expressão de IL-10 (Jagannathan *et al.*, 2010).

O IFN- γ e a IL-17 têm ações pró-inflamatórias, mas apresentaram comportamentos distintos das demais citocinas pró-inflamatórias analisadas. Esse achado corrobora a hipótese que a ligação entre obesidade e produção de citocina por MNSP é específica para cada mediador (O'Rourke *et al.*, 2006).

Em relação ao IFN- γ , estudos prévios demonstraram aumento da expressão gênica desta citocina na obesidade tanto em MNSP quanto em mononucleares do tecido adiposo branco (O'Rourke *et al.*, 2009; Bories *et al.*, 2012). Estudos que utilizaram cultura primária para avaliar a produção de IFN- γ por linfócitos de sangue periférico de pacientes obesos demonstraram menor produção comparada a de pacientes com peso normal, sendo aventada a possibilidade de existir uma hiporresponsividade primária das células T nesta população e isso estaria relacionado a maior suscetibilidade dos pacientes com obesidade a infecção (Fontana *et al.*, 2007; Tussing-Humphreys *et al.*, 2011). A discordância entre expressão gênica e a produção em cultura de IFN- γ por MNSP pode ser explicada pela existência de uma regulação pós-transcricional na produção de citocinas (Asirvatham *et al.*, 2009). Nossos resultados da análise do IFN- γ em sobrenadante de cultura não corroboram dados da literatura, uma vez que não observamos diferença entre a produção de IFN- γ por MNSP de pacientes com obesidade e controles. Há possibilidade de nossa casuística relativamente reduzida associada a vieses que não pudemos detectar (presença de infecções virais subclínicas, por exemplo) terem influenciado esse resultado.

A dosagem de IL-17 no sobrenadante de cultura não teve diferença entre o grupo com obesidade e o grupo controle. Em estudo recente foi utilizada a cocultura de MNSP e células precursoras derivadas do tecido adiposo (ATDSC, do inglês *adipose tissue-derived stem cell*)

de pacientes com obesidade e peso normal. O estudo demonstrou que as ATDSC originadas em pacientes com obesidade, mas não as coletadas em pacientes de peso normal, induziam a polarização de linfócitos em Th17 com aumento da produção de IL-17 e provocavam ativação de monócitos (Eljaafari *et al.*, 2015). Outra publicação evidenciou que a IL-17 tem sua produção por linfócitos Th 17 estimulada por linfócitos B na obesidade e DM2, por mecanismos dependentes de contato entre as células (Defuria *et al.*, 2013). Portanto, a produção de IL-17 em cultura primária de MNSP de pacientes com obesidade pode não refletir o comportamento destas células *in vivo*, já que pode existir um efeito parácrino importante de outras células na obesidade não reproduzido *in vitro*.

Na avaliação de sobrenadante da cultura de MNSP que realizamos após 6 meses de cirurgia bariátrica, observamos redução significativa nas concentrações de TNF- α , IL-1 β e IL-10. Entretanto, não observamos esta diferença após 1 ano do procedimento cirúrgico. Também houve diferenças significativas nas respostas ao estímulo das produções de TNF- α e IL-1 β , que foram menores 6 meses após a cirurgia, mas não na resposta ao estímulo de IL-10. O resultado da resposta ao estímulo na produção de IL-10 distinto pode estar relacionado a produção basal de IL-10 elevada.

As dosagens de IL-6 e IL-1 β nos dois tempos pós-operatórios permaneceram mais altas que as dosagens do grupo controle. A concentração de TNF- α manteve-se elevada em relação ao controle 6 meses após a cirurgia, mas teve apenas tendência a manter essa diferença, com $p=0,06$, após 1 ano. Ou seja, mesmo existindo uma queda na produção destas citocinas após 6 meses da cirurgia, houve a manutenção da diferença em relação ao grupo controle. Já a redução da concentração no sobrenadante de IL-10 após 6 meses da cirurgia eliminou neste tempo de avaliação a diferença de produção do grupo com obesidade e o grupo controle.

Os resultados que obtivemos na comparação entre pré-operatório e 6 meses pós-operatório da produção de TNF- α , IL-1 β e IL-10 são compatíveis com os dados da literatura que indicam a redução da inflamação associada a obesidade após tratamento para perda de peso, observada na redução dos níveis séricos de citocinas (Illán-Gómez *et al.*, 2012; Rao, 2012), regressão da infiltração do tecido adiposo por leucócitos (Cancello *et al.*, 2005; Aron-Wisnewsky *et al.*, 2009), menor expressão de RNA de citocinas da família IL-1 em fígado e tecido adiposo subcutâneo (Moschen *et al.*, 2011) e redução da expressão de RNA de citocinas pró-inflamatórias em MNSP (Sheu *et al.*, 2008).

Desta maneira, as concentrações de TNF- α , IL-1 β e IL-10 em sobrenadante de cultura após 1 ano de cirurgia bariátrica não tiveram diferença em relação ao pré-operatório ou a 6

meses pós-operatório, sugerindo um comportamento comum destas citocinas de redução nos primeiros meses pós-operatório e recuperação parcial de suas produções após 1 ano de cirurgia.

Dalmas e colaboradores testaram a hipótese de que alterações na concentração sérica de citocinas no pós-operatório de DGYR estariam intimamente relacionados a mudanças na ingestão alimentar após a cirurgia. Neste estudo, observou-se que a restrição de calorias e de carboidratos da dieta reduziu os níveis de IL-10, interleucina (IL)-9 e quimiocinas após três meses de cirurgia, mas não nas avaliações subsequentes do pós-operatório. A conclusão do estudo foi que a influência da cirurgia bariátrica na imunidade nos primeiros meses está relacionada à restrição calórica e mudança na composição da dieta, enquanto o peso entre outros fatores possivelmente influenciam a inflamação a longo prazo (Dalmas *et al.*, 2011). Em nosso estudo, a atividade dos MNSP pode ter sido influenciada pela restrição alimentar própria dos primeiros meses de cirurgia bariátrica, colaborando para redução na produção de TNF- α , IL-1 β e IL-10 observada 6 meses após a cirurgia. Desta maneira, os MNSP após 6 meses da cirurgia possivelmente sofreram influência da perda de peso e da restrição calórica. Após 1 ano de cirurgia, a modificação drástica da dieta não persistiu, mas o processo da perda de peso se manteve. Novos estudos serão necessários para avaliar o efeito de restrição alimentar nos níveis séricos de citocinas e a participação dos MNSP neste parâmetro.

A concentração de IL-6 em sobrenadante de cultura teve uma tendência a queda após 6 meses da cirurgia, mas não houve diferença significativa entre as dosagens do pré e pós-operatório, além de permanecer elevada em comparação com grupo controle em todos os tempos de avaliação do grupo com obesidade. A ausência de correlação entre a expressão de RNA em MNSP de IL-6 e TNF- α e a concentração destas citocinas no soro (Ghanim *et al.*, 2004) associado a existência de correlação entre a expressão de marcadores de macrófagos e linfócitos T em tecido adiposo visceral e níveis sistêmicos de IL-6 e TNF- α (Lasselin *et al.*, 2014) pressupõe que a produção destas citocinas por MNSP não é determinante de seus níveis séricos, que podem estar mais relacionadas a adiposidade e distribuição da gordura corporal (Hermsdorff *et al.*, 2010). Portanto, nossos resultados obtidos em cultura de MNSP não contrariam diversos estudos que demonstraram redução da IL-6 sérica e manutenção de TNF- α sérico após cirurgia bariátrica (Rao *et al.*, 2012).

A produção da IL-17 em cultura, que não teve diferença nas comparações entre o grupo controle e grupo com obesidade antes da cirurgia ou entre pré e pós 6 meses de cirurgia, teve elevação significativa na avaliação após 1 ano de cirurgia em comparação ao pré-operatório e ao grupo controle. Esse resultado é coerente com o achado de maior resposta ao

estímulo na produção de IL-17 após 6 meses da cirurgia em comparação com o pré-operatório e tendência de ser maior 12 meses da cirurgia ($p=0,05$) em relação ao pré-operatório. Como mencionado anteriormente, a produção de IL-17 por linfócitos de pacientes com obesidade em cultura pode ser comprometida pela ausência do efeito parácrino de outras células. Entretanto, após a perda de peso, a avaliação *in vitro* da atividade dos linfócitos produtores de IL-17 pode representar seu comportamento *in vivo*, de acordo com o observado em células obtidas em indivíduos de peso normal (Eljaafari *et al.*, 2015). Considerando esta hipótese, há possibilidade da concentração de IL-17 em sobrenadante elevado após 1 ano de cirurgia apenas refletir a maior produção por MNSP do grupo com obesidade não modificada após a cirurgia.

Recentemente foi descrito uma subpopulação de linfócitos T produtores de IL-17, entre outras citocinas, denominados células T invariantes de mucosa (MAIT, do inglês *mucosal associated invariant T cell*). Magalhães e colaboradores analisaram a frequência das células MAIT na circulação de pacientes com obesidade e diabetes mellitus tipo 2 ou apenas obesidade em comparação com pacientes de peso normal euglicêmicos e a produção de citocinas por estas células em cultura. Os pacientes com obesidade foram submetidos a cirurgia bariátrica e a mesma avaliação realizada no pós-operatório. O grupo de pacientes com obesidade sem diabetes teve um número reduzido de células MAIT na circulação antes da cirurgia e maior produção de IL-17 em comparação ao grupo de peso normal. Após 3, 6 e 12 meses da cirurgia bariátrica, houve aumento do número de células MAIT circulantes, mas a produção de IL-17 manteve-se alta no primeiro ano pós-operatório (Magalhaes *et al.*, 2015). Por isso, o aumento na concentração de IL-17 em cultura de MNSP que detectamos pode ser devido ao aumento no número de células MAIT no sangue periférico dos pacientes obesos após 1 ano da cirurgia bariátrica, com manutenção da produção de IL-17 elevada por essas células.

A concentração de INF- γ em sobrenadante no pré-operatório não teve diferença em relação aos dois tempos de avaliação no pós-operatório, mas sua produção estimulada e a diferença entre a produção sem e com estímulo foram significativamente menores após 6 meses de cirurgia em relação ao grupo controle. Em estudo com cultura primária de MNSP, Fontana e colaboradores demonstraram que as produções de MCP-1 e INF- γ estavam reduzidas nos pacientes com obesidade em relação a indivíduos de peso normal e sofreram aumento após 1 ano da realização de cirurgia bariátrica (Fontana *et al.*, 2007). Moulin e colaboradores demonstraram aumento na produção de INF- γ em cultura de MNSP após 6 meses de realização da cirurgia bariátrica em comparação com o pré-operatório (Moulin *et al.*,

2011). Apesar de nossos resultados não terem demonstrado diferença entre o grupo controle e com obesidade no pré-operatório ou terem corroborado dados da literatura nos quais há diferença entre o pré e pós-operatório, há possibilidade da produção INF- γ reduzida 6 meses pós-operatório em relação ao controle refletir o déficit de produção desta citocina associado a obesidade descrito por outros autores.

Os níveis séricos das citocinas analisadas não tiveram diferenças significativas entre os pacientes com obesidade e com peso normal, assim como entre o pré e pós-operatório dos pacientes com obesidade, com exceção da concentração de INF- γ que foi maior no pré-operatório em relação a 1 ano pós-operatório. Todas as dosagens foram realizadas com um único kit de ELISA Multiplex, o que confere confiabilidade a comparação dos valores absolutos desta citocinas (Khan *et al.*, 2004). Estudos prévios validaram o uso deste método laboratorial, comparando ensaios de ELISA específicos para cada citocina com a dosagem concomitante de diversas citocinas através do Multiplex (Elshal e McCoy, 2006).

A discordância dos nossos resultados com dados da literatura que apontam alterações nas concentrações séricas de citocinas associadas à obesidade (Fain *et al.*, 2004) pode ter relação com a heterogenicidade do grupo de pacientes obesos do presente estudo, que incluiu homens e mulheres antes e após a menopausa (Pfeiffer *et al.*, 1997), com e sem dislipidemia e disglícemia (Ciftci *et al.*, 2004), associado ao tamanho amostral reduzido. É importante frisar que a concentração de citocinas séricas representa um *pool* de mediadores inflamatórios que são produzidos em diversos locais, como tecido adiposo e fígado, além de leucócitos, e que por isso sofre diversas influências.

Dentre as correlações entre concentrações de citocinas no soro e no sobrenadante, apenas as dosagens no pré-operatório IL-6 e IFN- γ tiveram correlação, negativa na IL-6 e positiva no IFN- γ . Estudo prévio demonstrou correlação negativa entre a concentração de IL-6 no soro e a expressão de RNA desta citocina em MNSP (Hermsdorff *et al.*, 2010). Esta observação pode ser relacionada às características da IL-6, que tem ações pleiotrópicas e importante efeito parácrino. A ausência de correlação entre as demais dosagens das citocinas em sobrenadante e suas concentrações no soro está de acordo com estudos anteriores nos quais a produção de citocinas por MNSP não se mostrou determinante dos níveis séricos (Fontana *et al.*, 2007; Tussing-Humphreys *et al.*, 2011).

As citocinas IL-6, IL-1 β , TNF- α e IL-10 dosadas em sobrenadante de cultura tiveram forte correlação entre si, o que sugere a existência de uma integração na produção destas citocinas mediada pela inflamação.

A concentração de TNF- α em sobrenadante de cultura teve correlação positiva com glicemia jejum no grupo de pacientes com obesidade antes da cirurgia e negativa com HDL após 1 ano de cirurgia. A dosagem de IL-6 em sobrenadante teve correlação positiva com HOMA-IR no pré-operatório. A existência de correlação no pré-operatório e 1 ano pós-operatório entre citocinas pró-inflamatórias e dados bioquímicos relacionados à resistência a insulina está de acordo com o conhecimento prévio da participação destas citocinas na resistência à insulina (Coope *et al.*, 2016).

A concentração de IFN- γ teve correlação com HOMA-IR, negativa no pré-operatório e positiva 12 meses pós-operatório. Este resultado sugere que no pré-operatório o IFN- γ teria ação “protetora” contra a resistência à insulina ou que MNSP de indivíduos com menor resistência à insulina teriam maior produção de IFN- γ , sendo esta última possibilidade compatível com observações prévias da melhora concomitante da resistência à insulina e aumento na produção de IFN- γ após cirurgia bariátrica (Fontana *et al.*, 2007; Tussing-Humphreys *et al.*, 2011). Entretanto, um estudo prévio demonstrou a participação do IFN- γ no desenvolvimento da resistência à insulina associada à obesidade em cobaias (O’rourke *et al.*, 2012) corroborando a correlação observada no pós-operatório. Portanto, estudos futuros deverão esclarecer a relação do IFN- γ produzido por MNSP com a resistência à insulina antes e após a perda de peso em humanos.

Ainda nas dosagens realizadas em sobrenadante de cultura, observamos que após 6 meses de cirurgia houve correlação positiva entre IMC e porcentagem de massa gorda com IFN- γ , assim como IMC e porcentagem de massa gorda com IL-10, o que sugere que os pacientes que mantiveram maior adiposidade nos primeiros meses pós-operatório tiveram maior produção destas citocinas por MNSP.

No pré-operatório, observamos correlação negativa entre IL-6 sérico e HOMA-IR, o que podemos analisar partindo de dois resultados já discutidos no presente estudo: a correlação negativa entre IL-6 sérico e IL-6 produzido em cultura de MNSP e a correlação positiva entre IL-6 dosado em sobrenadante e HOMA-IR no pré-operatório. Assim, a correlação negativa entre IL-6 sérico e HOMA-IR reforça a hipótese de que o principal efeito da IL-6 na resistência à insulina é parácrino.

Simon e colaboradores observaram uma associação inversa entre níveis de IL-17 no soro e aumento do risco de eventos cardiovasculares maiores e elaborou a hipótese de que a IL-17 tem efeito modulador na ativação de células endoteliais (Simon *et al.*, 2013). Em outro estudo observacional, os níveis séricos de IL-17 reduzidos foram associados a maior

prevalência de síndrome metabólica (Surendar *et al.*, 2011). A correlação positiva entre IL-17 e HDL que detectamos no pré-operatório fortalece a possibilidade de existir um efeito protetor da IL-17 para doenças cardiovasculares.

As dosagens séricas das citocinas IL-6 e IL-17 tiveram correlações negativas com HDL e adiponectina no pós-operatório, assim como IL-17 sérica teve correlação negativa com porcentagem de perda de peso. Ainda no pós-operatório, IL-6 sérico teve correlação positiva com triglicerídeos.

Em relação a IL-6 sérica, os resultados são compatíveis com o conhecimento prévio de que a perda de peso leva a diminuição de IL-6 sérica, aumento da adiponectina e melhora do lipidograma, com aumento do HDL e redução dos triglicerídeos (Illán-Gómez *et al.*, 2012). A correlação negativa da IL-17 sérica com adiponectina após 6 meses da cirurgia não é compatível com estudos observacionais que sugerem efeito protetor desta citocina para síndrome metabólica (Surendar *et al.*, 2011), mas está de acordo com estudo que utilizou camundongos *Knockout* para IL-17, no qual foi observado um aumento da adiponectina durante o desenvolvimento da obesidade, sugerindo que IL-17 inibe a expressão do gene da adiponectina (Zúñiga *et al.*, 2010). Já a correlação negativa de IL-17 sérica com HDL e porcentagem de perda de peso no pós-operatório sugere que os participantes que mantiveram maior adiposidade após a cirurgia apresentaram menores níveis de HDL e IL-17 no soro. Portanto, estudos em humanos com obesidade serão necessários para esclarecer a relação do nível sérico de IL-17 com adiponectina e colesterol HDL.

A concentração de IFN- γ em soro teve correlações negativa com HOMA-IR e positiva com HDL no pré-operatório, o que corrobora resultado já discutido da correlação negativa de IFN- γ em sobrenadante com HOMA-IR no pré-operatório e também a correlação negativa da dosagem sérica de IFN- γ com porcentagem de perda de peso após 12 meses de cirurgia. A concentração de IFN- γ em soro foi anteriormente relacionada ao IMC em indivíduos com peso normal, tendo uma correlação negativa no estudo de Zheng e colaboradores (Zheng *et al.*, 2013). Entretanto, na população com obesidade são necessários mais estudo para esclarecer os níveis séricos desta citocina na obesidade, sua relação com a resistência à insulina em humanos e o efeito da perda de peso em sua produção.

A IL-10 sérica teve correlação positiva com glicemia de jejum no pós-operatório, o que não está de acordo com estudo prévio (Esposito *et al.*, 2003) que estabelece a IL-10 como fator protetor da síndrome metabólica.

Como limitações do nosso estudo, podemos citar o tamanho amostral e a duração de 1 ano, tempo possivelmente insuficiente para avaliar por completo o efeito da perda de peso por cirurgia bariátrica na inflamação. As quantidades de gordura, carboidrato e calorias ingeridas pelos pacientes com obesidade antes e após a cirurgia bariátrica não foram avaliadas e podem ter sido heterogêneas, com diferentes efeitos nos marcadores inflamatórios. Também não avaliamos o perfil das populações de linfócitos da cultura. Por fim, a composição corpórea não foi avaliada em todos os participantes do estudo e não temos avaliação deste parâmetro após 1 ano da cirurgia bariátrica.

A observação de que a cirurgia bariátrica está associada a reduções na produção TNF- α , IL-1 β e IL-10 por MNSP após 6 meses de tratamento, não observada após 1 ano, e suas correlações com marcadores séricos da homeostase glicêmica, sugerem que a melhora significativa de doenças metabólicas observada durante o primeiro ano após cirurgia bariátrica pode ter efeito de mudanças na produção de citocinas por MNSP. Entretanto, diversos fatores como redução da infiltração de leucócitos no tecido adiposo, redução da gordura ectópica e o efeito incretínico do procedimento cirúrgico podem ser os principais responsáveis pela melhora das doenças metabólicas observada no primeiro ano após cirurgia bariátrica (Taylor, 2013).

6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados do presente trabalho, podemos concluir que:

- 1) a obesidade grau III está associada ao aumento na produção de IL-6, TNF- α , IL-1 β e IL-10 por MNSP em cultura primária, mas não está associada a alterações dos níveis séricos destas citocinas.
- 2) a perda de peso induzida por cirurgia bariátrica está associada à redução na produção de TNF- α , IL-1 β e IL-10 por MNSP em cultura primária após 6 meses de tratamento e ao aumento na produção de IL-17 por estas células após 1 ano de tratamento. A perda de peso por cirurgia bariátrica não está associada a alterações dos níveis séricos destas citocinas.
- 3) IL-6 e IFN- γ têm correlações entre seus níveis séricos e obtidos em sobrenadante de cultura primária de MNSP de pacientes com obesidade antes da cirurgia bariátrica.
- 4) existe correlação entre citocinas obtidas em sobrenadante de cultura primária de MNSP e resultados laboratoriais relacionados a homeostase glicêmica em pacientes com obesidade antes e após a cirurgia bariátrica. Há correlação entre citocinas obtidas em sobrenadante de cultura primária de MNSP e o estado de adiposidade em pacientes com obesidade após cirurgia bariátrica.
- 5) existe correlação entre citocinas séricas e resultados laboratoriais relacionados a homeostase glicêmica em pacientes com obesidade antes e após a cirurgia bariátrica.

Portanto, no primeiro ano após cirurgia bariátrica, há influência da perda de peso na resposta imune de pacientes com obesidade grau III, havendo diferença na produção de TNF- α , IL-1 β e IL-10 por MNSP após 6 meses da cirurgia e na produção de IL-17 após 1 ano da cirurgia. A representação esquemática resumida das conclusões do trabalho encontra-se na Figura 10.

Figura 10- Representação esquemática das conclusões.

7. REFERÊNCIAS

AHMED, M.; GAFFEN, S. L. IL-17 in obesity and adipogenesis. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 21, n. 6, p. 449-53, Dec 2010. ISSN 1879-0305. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21084215> >.

ALBERTI, K. G.; ZIMMET, P. Z. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. **Diabet Med**, v. 15, n. 7, p. 539-53, Jul 1998. ISSN 0742-3071. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9686693> >.

ARON-WISNEWSKY, J. et al. Human adipose tissue macrophages: m1 and m2 cell surface markers in subcutaneous and omental depots and after weight loss. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 94, n. 11, p. 4619-23, Nov 2009. ISSN 1945-7197. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19837929> >.

ASIRVATHAM, A. J.; MAGNER, W. J.; TOMASI, T. B. miRNA regulation of cytokine genes. **Cytokine**, v. 45, n. 2, p. 58-69, Feb 2009. ISSN 1096-0023. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19121586> >.

BASTARD, J. P. et al. Point-counterpoint: Interleukin-6 does/does not have a beneficial role in insulin sensitivity and glucose homeostasis. **J Appl Physiol** (1985), v. 102, n. 2, p. 821-2; author reply 825, Feb 2007. ISSN 8750-7587. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17323465> >.

BEARDEN, D. T.; RODVOLD, K. A. Dosage adjustments for antibacterials in obese patients: applying clinical pharmacokinetics. **Clin Pharmacokinet**, v. 38, n. 5, p. 415-26, May 2000. ISSN 0312-5963. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10843460> >.

BLOM, B.; SPITS, H. Development of human lymphoid cells. **Annu Rev Immunol**, v. 24, p. 287-320, 2006. ISSN 0732-0582. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16551251> >.

BODEN, G. Obesity, insulin resistance and free fatty acids. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes**, v. 18, n. 2, p. 139-43, Apr 2011. ISSN 1752-2978. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21297467> >.

BORIES, G. et al. Impaired alternative macrophage differentiation of peripheral blood mononuclear cells from obese subjects. **Diab Vasc Dis Res**, v. 9, n. 3, p. 189-95, Jul 2012. ISSN 1752-8984. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22192929> >.

BUCHWALD, H. et al. Bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. **JAMA**, v. 292, n. 14, p. 1724-37, Oct 2004. ISSN 1538-3598. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15479938> >.

BUCHWALD, H.; BUCHWALD, J. N. Evolution of operative procedures for the management of morbid obesity 1950-2000. **Obes Surg**, v. 12, n. 5, p. 705-17, Oct 2002. ISSN 0960-8923. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12448398> >.

BUCHWALD, H.; WILLIAMS, S. E. Bariatric surgery worldwide 2003. **Obes Surg**, v. 14, n. 9, p. 1157-64, Oct 2004. ISSN 0960-8923. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15527627> >.

CAIMARI, A. et al. Peripheral blood mononuclear cells as a model to study the response of energy homeostasis-related genes to acute changes in feeding conditions. **OMICS**, v. 14, n. 2, p. 129-41, Apr 2010. ISSN 1557-8100. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20235874> >.

CALLE, E. E. et al. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. **N Engl J Med**, v. 348, n. 17, p. 1625-38, Apr 2003. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12711737> >.

CAMARGO, A. et al. Peripheral blood mononuclear cells as in vivo model for dietary intervention induced systemic oxidative stress. **Food Chem Toxicol**, v. 72, p. 178-86, Oct 2014. ISSN 1873-6351. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25057809> >.

CANCELLO, R. et al. Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. **Diabetes**, v. 54, n. 8, p. 2277-86, Aug 2005. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16046292> >.

CANI, P. D. et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. **Diabetes**, v. 56, n. 7, p. 1761-72, Jul 2007. ISSN 1939-327X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17456850> >.

CAPELLA, R. F. et al. Vertical Banded Gastroplasty-Gastric Bypass: preliminary report. **Obes Surg**, v. 1, n. 4, p. 389-395, Dec 1991. ISSN 1708-0428. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10775940> >.

CAWTHORN, W. P. et al. Bone marrow adipose tissue is an endocrine organ that contributes to increased circulating adiponectin during caloric restriction. **Cell Metab**, v. 20, n. 2, p. 368-75, Aug 2014. ISSN 1932-7420. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24998914> >.

CAWTHORN, W. P.; SETHI, J. K. TNF-alpha and adipocyte biology. **FEBS Lett**, v. 582, n. 1, p. 117-31, Jan 2008. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18037376> >.

CIFTCI, T. U. et al. The relationship between serum cytokine levels with obesity and obstructive sleep apnea syndrome. **Cytokine**, v. 28, n. 2, p. 87-91, Oct 2004. ISSN 1043-4666. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15381186> >.

CONE, R. D.; ELMQUIST, J. K. In: (Ed.). **Williams Textbook of Endocrinology**. 11th Philadelphia: Saunderson Elsevier, 2008. cap. IX, p.1537.

COOPE, A.; TORSONI, A. S.; VELLOSO, L. A. MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Metabolic and inflammatory pathways on the pathogenesis of type 2 diabetes. **Eur J Endocrinol**, v. 174, n. 5, p. R175-87, May 2016. ISSN 1479-683X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26646937> >.

COOPER, C. S.; FOSTER, C. S. Concepts of epigenetics in prostate cancer development. **Br J Cancer**, v. 100, n. 2, p. 240-5, Jan 2009. ISSN 1532-1827. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19002169> >.

CRUJEIRAS, A. B. et al. Differential expression of oxidative stress and inflammation related genes in peripheral blood mononuclear cells in response to a low-calorie diet: a nutrigenomics study. **OMICS**, v. 12, n. 4, p. 251-61, Dec 2008. ISSN 1557-8100. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18687040> >.

CUMANO, A.; GODIN, I. Ontogeny of the hematopoietic system. **Annu Rev Immunol**, v. 25, p. 745-85, 2007. ISSN 0732-0582. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17201678> >.

DALMAS, E. et al. Variations in circulating inflammatory factors are related to changes in calorie and carbohydrate intakes early in the course of surgery-induced weight reduction. **Am J Clin Nutr**, v. 94, n. 2, p. 450-8, Aug 2011. ISSN 1938-3207. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21677057> >.

DE LIMA-JÚNIOR, J. C.; VELLOSO, L. A.; GELONEZE, B. The Obese Brain--Effects of Bariatric Surgery on Energy Balance Neurocircuitry. **Curr Atheroscler Rep**, v. 17, n. 10, p. 57, Oct 2015. ISSN 1534-6242. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26300554> >.

DE OLIVEIRA, I. V. **Cirurgia bariátrica no âmbito do Sistema Único de Saúde: tendências, custos, complicações**. 2007. (Mestrado). Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília

DE ROSA, V. et al. A key role of leptin in the control of regulatory T cell proliferation. **Immunity**, v. 26, n. 2, p. 241-55, Feb 2007. ISSN 1074-7613. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17307705> >.

DE SOUSA, A. G. et al. Obesity and obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome. **Obes Rev**, v. 9, n. 4, p. 340-54, Jul 2008. ISSN 1467-789X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18363635> >.

DEFRONZO, R. A.; FERRANNINI, E. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. **Diabetes Care**, v. 14, n. 3, p. 173-94, Mar 1991. ISSN 0149-5992. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2044434> >.

DEFURIA, J. et al. B cells promote inflammation in obesity and type 2 diabetes through regulation of T-cell function and an inflammatory cytokine profile. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 13, p. 5133-8, Mar 2013. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23479618> >.

DUFFAUT, C. et al. Unexpected trafficking of immune cells within the adipose tissue during the onset of obesity. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 384, n. 4, p. 482-5, Jul 2009. ISSN 1090-2104. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19422792> >.

EHSES, J. A. et al. Increased number of islet-associated macrophages in type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 56, n. 9, p. 2356-70, Sep 2007. ISSN 1939-327X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17579207> >.

ELFHAG, K.; RÖSSNER, S. Who succeeds in maintaining weight loss? A conceptual review of factors associated with weight loss maintenance and weight regain. **Obes Rev**, v. 6, n. 1, p. 67-85, Feb 2005. ISSN 1467-7881. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15655039> >.

ELGAZAR-CARMON, V. et al. Neutrophils transiently infiltrate intra-abdominal fat early in the course of high-fat feeding. **J Lipid Res**, v. 49, n. 9, p. 1894-903, Sep 2008. ISSN 0022-2275. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18503031> >.

ELJAAFARI, A. et al. Adipose Tissue-Derived Stem Cells From Obese Subjects Contribute to Inflammation and Reduced Insulin Response in Adipocytes Through Differential Regulation of the Th1/Th17 Balance and Monocyte Activation. **Diabetes**, v. 64, n. 7, p. 2477-88, Jul 2015. ISSN 1939-327X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25765019> >.

ELSHAL, M. F.; MCCOY, J. P. Multiplex bead array assays: performance evaluation and comparison of sensitivity to ELISA. **Methods**, v. 38, n. 4, p. 317-23, Apr 2006. ISSN 1046-2023. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16481199> >.

ESPOSITO, K. et al. Association of low interleukin-10 levels with the metabolic syndrome in obese women. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 88, n. 3, p. 1055-8, Mar 2003. ISSN 0021-972X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12629085> >.

ESTATÍSTICA, I. B. G. Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009. Brasil, p. <http://ibge.gov.br>, 2010. Acesso em: 25 de agosto de 2016.

FAIN, J. N. Release of inflammatory mediators by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily by the nonfat cells: a review. **Mediators Inflamm**, v. 2010, p. 513948, 2010. ISSN 1466-1861. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20508843> >.

FAIN, J. N. et al. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. **Endocrinology**, v. 145, n. 5, p. 2273-82, May 2004. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14726444> >.

FELDSTEIN, A. E. Novel insights into the pathophysiology of nonalcoholic fatty liver disease. **Semin Liver Dis**, v. 30, n. 4, p. 391-401, Nov 2010. ISSN 1098-8971. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20960378> >.

FERRANTE, A. W. The immune cells in adipose tissue. **Diabetes Obes Metab**, v. 15 Suppl 3, p. 34-8, Sep 2013. ISSN 1463-1326. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24003919> >.

FIELD, A. E. et al. Impact of overweight on the risk of developing common chronic diseases during a 10-year period. **Arch Intern Med**, v. 161, n. 13, p. 1581-6, Jul 2001. ISSN 0003-9926. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11434789> >.

FOBI, M. Why the Operation I Prefer is Silastic Ring Vertical Gastric Bypass. **Obes Surg**, v. 1, n. 4, p. 423-426, Dec 1991. ISSN 1708-0428. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10775946> >.

FONTANA, L. et al. Impaired mononuclear cell immune function in extreme obesity is corrected by weight loss. **Rejuvenation Res**, v. 10, n. 1, p. 41-6, Mar 2007. ISSN 1549-1684. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17378751> >.

FORSYTHE, L. K.; WALLACE, J. M.; LIVINGSTONE, M. B. Obesity and inflammation: the effects of weight loss. **Nutr Res Rev**, v. 21, n. 2, p. 117-33, Dec 2008. ISSN 1475-2700. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19087366> >.

FOX, C. S. et al. Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study. **Circulation**, v. 116, n. 1, p. 39-48, Jul 2007. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17576866> >.

FRISARD, M. I. et al. Toll-like receptor 4 modulates skeletal muscle substrate metabolism. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 298, n. 5, p. E988-98, May 2010. ISSN 1522-1555. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20179247> >.

GALLAGHER, D. et al. Healthy percentage body fat ranges: an approach for developing guidelines based on body mass index. **Am J Clin Nutr**, v. 72, n. 3, p. 694-701, Sep 2000. ISSN 0002-9165. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10966886> >.

GENONI, G. et al. Obesity and infection: two sides of one coin. **Eur J Pediatr**, v. 173, n. 1, p. 25-32, Jan 2014. ISSN 1432-1076. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24146165> >.

GHANIM, H. et al. Circulating mononuclear cells in the obese are in a proinflammatory state. **Circulation**, v. 110, n. 12, p. 1564-71, Sep 2004. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15364812> >.

GISLETTE, T.; CHEN, J. The possible role of IL-17 in obesity-associated cancer. **ScientificWorldJournal**, v. 10, p. 2265-71, 2010. ISSN 1537-744X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21103795> >.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883-99, Mar 2010. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20303878> >.

HARLEY, I. T. et al. IL-17 signaling accelerates the progression of nonalcoholic fatty liver disease in mice. **Hepatology**, v. 59, n. 5, p. 1830-9, May 2014. ISSN 1527-3350. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24115079> >.

HERMSDORFF, H. H. et al. Association of body fat distribution with proinflammatory gene expression in peripheral blood mononuclear cells from young adult subjects. **OMICS**, v. 14, n. 3, p. 297-307, Jun 2010. ISSN 1557-8100. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20450441> >.

HOLLAND, W. L. et al. Receptor-mediated activation of ceramidase activity initiates the pleiotropic actions of adiponectin. **Nat Med**, v. 17, n. 1, p. 55-63, Jan 2011. ISSN 1546-170X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21186369> >.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and endoplasmic reticulum stress in obesity and diabetes. **Int J Obes (Lond)**, v. 32 Suppl 7, p. S52-4, Dec 2008. ISSN 1476-5497. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19136991> >.

HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, v. 259, n. 5091, p. 87-91, Jan 1993. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7678183> >.

HUNDAL, R. S. et al. Mechanism by which high-dose aspirin improves glucose metabolism in type 2 diabetes. **J Clin Invest**, v. 109, n. 10, p. 1321-6, May 2002. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12021247> >.

ILLÁN-GÓMEZ, F. et al. Obesity and inflammation: change in adiponectin, C-reactive protein, tumour necrosis factor-alpha and interleukin-6 after bariatric surgery. **Obes Surg**, v. 22, n. 6, p. 950-5, Jun 2012. ISSN 1708-0428. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22527592> >.

INABNET, W. B. et al. Laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass in patients with BMI <50: a prospective randomized trial comparing short and long limb lengths. **Obes Surg**, v. 15, n. 1, p. 51-7, Jan 2005. ISSN 0960-8923. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15760498> >.

JAFAR, N.; EDRISS, H.; NUGENT, K. The Effect of Short-Term Hyperglycemia on the Innate Immune System. **Am J Med Sci**, v. 351, n. 2, p. 201-11, Feb 2016. ISSN 1538-2990. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26897277> >.

JAGANNATHAN, M. et al. Toll-like receptors regulate B cell cytokine production in patients with diabetes. **Diabetologia**, v. 53, n. 7, p. 1461-71, Jul 2010. ISSN 1432-0428. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20383694> >.

JAKICIC, J. M.; WING, R. R.; LANG, W. Bioelectrical impedance analysis to assess body composition in obese adult women: the effect of ethnicity. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 22, n. 3, p. 243-9, Mar 1998. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9539193> >.

JOHNSON, A. R.; MILNER, J. J.; MAKOWSKI, L. The inflammation highway: metabolism accelerates inflammatory traffic in obesity. **Immunol Rev**, v. 249, n. 1, p. 218-38, Sep 2012. ISSN 1600-065X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22889225> >.

KANG, K. et al. Adipocyte-derived Th2 cytokines and myeloid PPARdelta regulate macrophage polarization and insulin sensitivity. **Cell Metab**, v. 7, n. 6, p. 485-95, Jun 2008. ISSN 1932-7420. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18522830> >.

KHAN, S. S. et al. Multiplex bead array assays for detection of soluble cytokines: comparisons of sensitivity and quantitative values among kits from multiple manufacturers. **Cytometry B Clin Cytom**, v. 61, n. 1, p. 35-9, Sep 2004. ISSN 1552-4949. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15351980> >.

KINTSCHER, U. et al. T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: a primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 28, n. 7, p. 1304-10, Jul 2008. ISSN 1524-4636. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18420999> >.

KOSTELI, A. et al. Weight loss and lipolysis promote a dynamic immune response in murine adipose tissue. **J Clin Invest**, v. 120, n. 10, p. 3466-79, Oct 2010. ISSN 1558-8238. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20877011> >.

KOYAMA, A. et al. The role of peripheral inflammatory markers in dementia and Alzheimer's disease: a meta-analysis. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 68, n. 4, p. 433-40, Apr 2013. ISSN 1758-535X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22982688> >.

KRINNINGER, P. et al. Peripheral monocytes of obese women display increased chemokine receptor expression and migration capacity. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 99, n. 7, p. 2500-9, Jul 2014. ISSN 1945-7197. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24606068> >.

LASSELIN, J. et al. Adipose inflammation in obesity: relationship with circulating levels of inflammatory markers and association with surgery-induced weight loss. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 99, n. 1, p. E53-61, Jan 2014. ISSN 1945-7197. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24243638> >.

LEE, B. C. et al. Adipose Natural Killer Cells Regulate Adipose Tissue Macrophages to Promote Insulin Resistance in Obesity. **Cell Metab**, v. 23, n. 4, p. 685-98, Apr 2016. ISSN 1932-7420. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27050305> >.

LEE, Y. S. et al. Inflammation is necessary for long-term but not short-term high-fat diet-induced insulin resistance. **Diabetes**, v. 60, n. 10, p. 2474-83, Oct 2011. ISSN 1939-327X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21911747> >.

LORD, G. M. et al. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. **Nature**, v. 394, n. 6696, p. 897-901, Aug 1998. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9732873> >.

LUMENG, C. N. Innate immune activation in obesity. **Mol Aspects Med**, v. 34, n. 1, p. 12-29, Feb 2013. ISSN 1872-9452. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23068074> >.

LUMENG, C. N. et al. Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatiotemporal differences in macrophage subtypes. **Diabetes**, v. 57, n. 12, p. 3239-46, Dec 2008. ISSN 1939-327X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18829989> >.

MACDOUGALD, O. A.; BURANT, C. F. The rapidly expanding family of adipokines. **Cell Metab**, v. 6, n. 3, p. 159-61, Sep 2007. ISSN 1550-4131. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17767903> >.

MAGALHAES, I. et al. Mucosal-associated invariant T cell alterations in obese and type 2 diabetic patients. **J Clin Invest**, v. 125, n. 4, p. 1752-62, Apr 2015. ISSN 1558-8238. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25751065> >.

MANCO, M. et al. Effect of massive weight loss on inflammatory adipocytokines and the innate immune system in morbidly obese women. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 92, n. 2, p. 483-90, Feb 2007. ISSN 0021-972X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17105839> >.

MANTELL, B. S. et al. Mice lacking NKT cells but with a complete complement of CD8+ T-cells are not protected against the metabolic abnormalities of diet-induced obesity. **PLoS One**, v. 6, n. 6, p. e19831, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21674035> >.

MARTÍ, A.; MARCOS, A.; MARTÍNEZ, J. A. Obesity and immune function relationships. **Obes Rev**, v. 2, n. 2, p. 131-40, May 2001. ISSN 1467-7881. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12119664> >.

MAURY, E.; BRICHARD, S. M. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. **Mol Cell Endocrinol**, v. 314, n. 1, p. 1-16, Jan 2010. ISSN 1872-8057. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19682539> >.

MILNER, J. J.; BECK, M. A. The impact of obesity on the immune response to infection. **Proc Nutr Soc**, v. 71, n. 2, p. 298-306, May 2012. ISSN 1475-2719. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22414338> >.

MORDES, J. P.; LIU, C.; XU, S. Medications for weight loss. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes**, v. 22, n. 2, p. 91-7, Apr 2015. ISSN 1752-2978. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25692921> >.

MOSCHEN, A. R. et al. Adipose and liver expression of interleukin (IL)-1 family members in morbid obesity and effects of weight loss. **Mol Med**, v. 17, n. 7-8, p. 840-5, 2011. ISSN 1528-3658. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21394384> >.

MOULIN, C. M. et al. Bariatric surgery reverses natural killer (NK) cell activity and NK-related cytokine synthesis impairment induced by morbid obesity. **Obes Surg**, v. 21, n. 1, p. 112-8, Jan 2011. ISSN 1708-0428. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20803097> >.

MURPHY, E. F. et al. Composition and energy harvesting capacity of the gut microbiota: relationship to diet, obesity and time in mouse models. **Gut**, v. 59, n. 12, p. 1635-42, Dec 2010. ISSN 1468-3288. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20926643> >.

NISHIMURA, S. et al. Adipogenesis in obesity requires close interplay between differentiating adipocytes, stromal cells, and blood vessels. **Diabetes**, v. 56, n. 6, p. 1517-26,

Jun 2007. ISSN 1939-327X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17389330> >.

O'ROURKE, R. W. Inflammation, obesity, and the promise of immunotherapy for metabolic disease. **Surg Obes Relat Dis**, v. 9, n. 5, p. 609-16, 2013 Sep-Oct 2013. ISSN 1878-7533. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22959472> >.

O'ROURKE, R. W. et al. Alterations in peripheral blood lymphocyte cytokine expression in obesity. **Clin Exp Immunol**, v. 146, n. 1, p. 39-46, Oct 2006. ISSN 0009-9104. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16968396> >.

O'ROURKE, R. W. Depot-specific differences in inflammatory mediators and a role for NK cells and IFN-gamma in inflammation in human adipose tissue. **Int J Obes (Lond)**, v. 33, n. 9, p. 978-90, Sep 2009. ISSN 1476-5497. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19564875> >.

O'ROURKE, R. W. Systemic inflammation and insulin sensitivity in obese IFN- γ knockout mice. **Metabolism**, v. 61, n. 8, p. 1152-61, Aug 2012. ISSN 1532-8600. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22386937> >.

OH, D. Y. et al. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. **Cell**, v. 142, n. 5, p. 687-98, Sep 2010. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20813258> >.

OLIVER, P. et al. Peripheral blood mononuclear cells: a potential source of homeostatic imbalance markers associated with obesity development. **Pflugers Arch**, v. 465, n. 4, p. 459-68, Apr 2013. ISSN 1432-2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23423323> >.

ORBAN, Z. et al. The differential effect of food intake and beta-adrenergic stimulation on adipose-derived hormones and cytokines in man. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 84, n. 6, p. 2126-33, Jun 1999. ISSN 0021-972X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10372721> >.

ORGANIZATION, W. H. Global Health Observatory Data. p. <http://www.who.int>, 2015. Acesso em: 30 de agosto de 2016.

OZCAN, U. et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. **Science**, v. 306, n. 5695, p. 457-61, Oct 2004. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15486293> >.

PADILHA, A. R. S. Portaria do Ministério da Saúde nº 424 de 19 de março de 2013. Brasil, p. <http://bvsms.saude.gov.br>, 2013. Acesso em: 30 de agosto de 2016.

PAL, D. et al. Fetuin-A acts as an endogenous ligand of TLR4 to promote lipid-induced insulin resistance. **Nat Med**, v. 18, n. 8, p. 1279-85, Aug 2012. ISSN 1546-170X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22842477> >.

- PFEIFFER, A. et al. Circulating tumor necrosis factor alpha is elevated in male but not in female patients with type II diabetes mellitus. **Horm Metab Res**, v. 29, n. 3, p. 111-4, Mar 1997. ISSN 0018-5043. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9137980> >.
- PRINS, J. B.; O'RAHILLY, S. Regulation of adipose cell number in man. **Clin Sci (Lond)**, v. 92, n. 1, p. 3-11, Jan 1997. ISSN 0143-5221. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9038586> >.
- RAO, S. R. Inflammatory markers and bariatric surgery: a meta-analysis. **Inflamm Res**, v. 61, n. 8, p. 789-807, Aug 2012. ISSN 1420-908X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22588278> >.
- RAZOLLI, D. S. et al. TLR4 expression in bone marrow-derived cells is both necessary and sufficient to produce the insulin resistance phenotype in diet-induced obesity. **Endocrinology**, v. 156, n. 1, p. 103-13, Jan 2015. ISSN 1945-7170. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25375037> >.
- REVELO, X. S. et al. Morphological and inflammatory changes in visceral adipose tissue during obesity. **Endocr Pathol**, v. 25, n. 1, p. 93-101, Mar 2014. ISSN 1559-0097. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24356782> >.
- RIDER, P. et al. IL-1 α and IL-1 β recruit different myeloid cells and promote different stages of sterile inflammation. **J Immunol**, v. 187, n. 9, p. 4835-43, Nov 2011. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21930960> >.
- ROITT, I. M.; DELVES, P. J. **Roitt, fundamentos de imunologia**. 12th. Rio de Janeiro: 2013.
- ROMANATTO, T. et al. Deletion of tumor necrosis factor-alpha receptor 1 (TNFR1) protects against diet-induced obesity by means of increased thermogenesis. **J Biol Chem**, v. 284, n. 52, p. 36213-22, Dec 2009. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19858212> >.
- RON, D.; WALTER, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 8, n. 7, p. 519-29, Jul 2007. ISSN 1471-0072. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17565364> >.
- SAAD, M. J. A. **Endocrinologia**. 1^o. São Paulo: 2007.
- SELL, H.; HABICH, C.; ECKEL, J. Adaptive immunity in obesity and insulin resistance. **Nat Rev Endocrinol**, v. 8, n. 12, p. 709-16, Dec 2012. ISSN 1759-5037. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22847239> >.
- SHEU, W. H. et al. Effect of weight loss on proinflammatory state of mononuclear cells in obese women. **Obesity (Silver Spring)**, v. 16, n. 5, p. 1033-8, May 2008. ISSN 1930-7381. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18356846> >.
- SHOELSON, S. E.; LEE, J.; GOLDFINE, A. B. Inflammation and insulin resistance. **J Clin Invest**, v. 116, n. 7, p. 1793-801, Jul 2006. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16823477> >.

SIMON, T. et al. Circulating levels of interleukin-17 and cardiovascular outcomes in patients with acute myocardial infarction. **Eur Heart J**, v. 34, n. 8, p. 570-7, Feb 2013. ISSN 1522-9645. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22956509> >.

SJÖSTRÖM, C. D. et al. Differentiated long-term effects of intentional weight loss on diabetes and hypertension. **Hypertension**, v. 36, n. 1, p. 20-5, Jul 2000. ISSN 0194-911X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10904007> >.

SJÖSTRÖM, L. et al. Effects of bariatric surgery on mortality in Swedish obese subjects. **N Engl J Med**, v. 357, n. 8, p. 741-52, Aug 2007. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17715408> >.

SQUADRITO, M. L.; DE PALMA, M. Macrophage regulation of tumor angiogenesis: implications for cancer therapy. **Mol Aspects Med**, v. 32, n. 2, p. 123-45, Apr 2011. ISSN 1872-9452. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21565215> >.

STUNKARD, A. J.; FOCH, T. T.; HRUBEC, Z. A twin study of human obesity. **JAMA**, v. 256, n. 1, p. 51-4, Jul 1986. ISSN 0098-7484. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3712713> >.

SUN, J. et al. Mast cells promote atherosclerosis by releasing proinflammatory cytokines. **Nat Med**, v. 13, n. 6, p. 719-24, Jun 2007. ISSN 1078-8956. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17546038> >.

SURENDAR, J. et al. Decreased serum interleukin-17 and increased transforming growth factor- β levels in subjects with metabolic syndrome (Chennai Urban Rural Epidemiology Study-95). **Metabolism**, v. 60, n. 4, p. 586-90, Apr 2011. ISSN 1532-8600. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20667562> >.

TALUKDAR, S. et al. Neutrophils mediate insulin resistance in mice fed a high-fat diet through secreted elastase. **Nat Med**, v. 18, n. 9, p. 1407-12, Sep 2012. ISSN 1546-170X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22863787> >.

TANAKA, T.; KISHIMOTO, T. The biology and medical implications of interleukin-6. **Cancer Immunol Res**, v. 2, n. 4, p. 288-94, Apr 2014. ISSN 2326-6074. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24764575> >.

TARANTINO, G. et al. Is serum Interleukin-17 associated with early atherosclerosis in obese patients? **J Transl Med**, v. 12, p. 214, 2014. ISSN 1479-5876. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25092442> >.

TAYLOR, R. Type 2 diabetes: etiology and reversibility. **Diabetes Care**, v. 36, n. 4, p. 1047-55, Apr 2013. ISSN 1935-5548. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23520370> >.

TRAYHURN, P.; WOOD, I. S. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. **Br J Nutr**, v. 92, n. 3, p. 347-55, Sep 2004. ISSN 0007-1145. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15469638> >.

TRUJILLO, M. E.; SCHERER, P. E. Adipose tissue-derived factors: impact on health and disease. **Endocr Rev**, v. 27, n. 7, p. 762-78, Dec 2006. ISSN 0163-769X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17056740> >.

TUSSING-HUMPHREYS, L. et al. Suppressed cytokine production in whole blood cultures may be related to iron status and hepcidin and is partially corrected following weight reduction in morbidly obese pre-menopausal women. **Cytokine**, v. 53, n. 2, p. 201-6, Feb 2011. ISSN 1096-0023. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21145254> >.

VAN DE SANDE-LEE, S. et al. Partial reversibility of hypothalamic dysfunction and changes in brain activity after body mass reduction in obese subjects. **Diabetes**, v. 60, n. 6, p. 1699-704, Jun 2011. ISSN 1939-327X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21515852> >.

VAN DIELEN, F. M. et al. Increased leptin concentrations correlate with increased concentrations of inflammatory markers in morbidly obese individuals. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 25, n. 12, p. 1759-66, Dec 2001. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11781755> >.

VÁZQUEZ, L. A. et al. Effects of changes in body weight and insulin resistance on inflammation and endothelial function in morbid obesity after bariatric surgery. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 90, n. 1, p. 316-22, Jan 2005. ISSN 0021-972X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15507518> >.

WEBER, D. J. et al. Obesity as a predictor of poor antibody response to hepatitis B plasma vaccine. **JAMA**, v. 254, n. 22, p. 3187-9, Dec 1985. ISSN 0098-7484. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2933532> >.

WEISBERG, S. P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **J Clin Invest**, v. 112, n. 12, p. 1796-808, Dec 2003. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14679176> >.

WHITAKER, R. C. et al. Predicting obesity in young adulthood from childhood and parental obesity. **N Engl J Med**, v. 337, n. 13, p. 869-73, Sep 1997. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9302300> >.

WU, D. et al. Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. **Science**, v. 332, n. 6026, p. 243-7, Apr 2011. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21436399> >.

XU, A. et al. Adipocyte fatty acid-binding protein is a plasma biomarker closely associated with obesity and metabolic syndrome. **Clin Chem**, v. 52, n. 3, p. 405-13, Mar 2006. ISSN 0009-9147. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16423904> >.

YIN, J. et al. Role of hypoxia in obesity-induced disorders of glucose and lipid metabolism in adipose tissue. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 296, n. 2, p. E333-42, Feb 2009. ISSN 0193-1849. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19066318> >.

ZHANG, X. et al. Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. **Cell**, v. 135, n. 1, p. 61-73, Oct 2008. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18854155> >.

ZHENG, Y. et al. Relation of leptin, ghrelin and inflammatory cytokines with body mass index in pulmonary tuberculosis patients with and without type 2 diabetes mellitus. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e80122, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24260344> >.

ZÚÑIGA, L. A. et al. IL-17 regulates adipogenesis, glucose homeostasis, and obesity. **J Immunol**, v. 185, n. 11, p. 6947-59, Dec 2010. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21037091> >.

8. ANEXOS

ANEXO A: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

Ribeirão Preto, 09 de dezembro de 2009

Ofício nº 4139/2009
CEP/MGV

Prezadas Senhoras,

O trabalho intitulado **"INFLUÊNCIA DA PERDA DE PESO INDUZIDA POR CIRURGIA BARIÁTRICA SOBRE A RESPOSTA IMUNE EM PACIENTES OBESOS"** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 300ª Reunião Ordinária realizada em 07/12/2009 e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 7691/2009.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimas Senhoras

PROFª DRª MARIA CRISTINA FOSS DE FREITAS
ANA CAROLINA LOURENÇO VELONI (Pesquisadora)
Depto. de Clínica Médica - Endocrinologia

ANEXO B: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO
PRETO**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Título do Projeto: “Influência da perda de peso induzida por cirurgia bariátrica sobre a resposta imune em pacientes com obesidade grau III”.

Pesquisador Responsável: Dra. Maria Cristina Foss-Freitas

Pesquisadores participantes: Paula Carolina Bezzan Pisi

Convidamos você para participar, como grupo controle, de nossa pesquisa sobre avaliação do efeito da cirurgia bariátrica no sistema imunológico e tecido gorduroso. Para este estudo, será necessário coletar uma amostra de sangue para a obtenção das células imunológicas (ou seja, as células brancas do sangue). Este estudo tem como objetivo avaliar se a grande redução no peso corporal pode influenciar seu sistema imunológico e também, avaliar se o tecido gorduroso em excesso apresenta uma resposta imunológica alterada.

Você não terá nenhum gasto com essa pesquisa, e a sua participação não oferece riscos à sua saúde, salvo pequenos incômodos devido à coleta de sangue (como pequenos hematomas ou o próprio incomodo causado pela agulha). Além disso, será garantido o sigilo de seus dados pessoais utilizados. Se você aceitar participar, todas as dúvidas sobre a pesquisa serão respondidas. Caso você queira desistir durante a pesquisa, não haverá nenhum problema e o tratamento que você estava fazendo antes continuará da mesma forma. Quanto aos resultados obtidos neste estudo, meu telefone está escrito nesta folha, e você poderá me ligar a qualquer hora para tirar suas dúvidas.

No futuro, este estudo poderá ajudar a entender melhor as mudanças no corpo obtidas através da cirurgia bariátrica.

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

EU, _____, abaixo assinado, tendo sido esclarecido sobre todas as condições que constam do documento “TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO”, de que trata o Projeto de Pesquisa intitulado “Influência da perda de peso induzida por cirurgia bariátrica sobre a resposta imune em pacientes obesos”., que tem como pesquisadores responsáveis Profa. Dra. Maria Cristina Foss-Freitas (fone: 16 3602 2467) e Paula Carolina Bezzan Pisi (fone: 16 3636 0392), declaro que tenho pleno conhecimento dos direitos e das condições que me foram assegurados, a seguir relacionados:

- A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida durante a realização do estudo;
- A liberdade de retirar o meu consentimento e deixar de participar do estudo a qualquer momento;
- A segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada a minha privacidade;
- O compromisso de que me será prestada informação atualizada durante o estudo, mesmo que essa possa afetar a minha vontade de continuar dele participando;
- O compromisso de que serei devidamente acompanhado durante todo o período de minha participação no projeto e após a conclusão dos trabalhos da pesquisa.

Declaro, ainda, que concordo inteiramente com as condições que me foram apresentadas e que, livremente, manifesto a minha vontade em participar do referido projeto.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de _____

Assinatura do paciente

Assinatura do pesquisador