LETÍCIA SANTANA WOLF

Marcadores epigenéticos relacionados à via do apetite/saciedade em mulheres com obesidade antes e após a derivação gástrica em Y de Roux

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Nutrição e Metabolismo

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carla Barbosa Nonino
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Carolina Nicoletti Ferreira

Ribeirão Preto

2020

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.

Wolf, Letícia Santana

Marcadores epigenéticos relacionados à via do apetite/saciedade em mulheres com obesidade antes e após a derivação gástrica em Y de Roux. Ribeirão Preto, 2020.

99 f. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Nutrição e Metabolismo.

Orientadora: Nonino, Carla Barbosa.

Co-orientadora: Nicoletti, Carolina Ferreira.

1. Obesidade. 2. Cirurgia bariátrica. 3. Apetite. 4. Saciedade. 5. Epigenética. 6. Metilação DNA.

Letícia Santana Wolf

Marcadores epigenéticos relacionados à via do apetite/saciedade em mulheres com obesidade antes e após a derivação gástrica em Y de Roux

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Nutrição e Metabolismo

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico esse trabalho a Deus, por me dar sabedoria todos os dias para que eu pudesse suportar momentos e situações difíceis. Aos meus pais Rubens Pedro Wolf Júnior e Silvana Pereira de Santana Wolf por todo amor, suporte e incentivo necessário, que não mediram esforços para que eu chegasse até aqui.

AGRADECIMENTOS

Ao finalizar esta etapa da minha formação acadêmica, venho expressar total gratidão, sincero reconhecimento e agradecimento à todas as pessoas que tornaram possível a realização deste trabalho:

Primeiramente à Deus, por me conceder sabedoria e coragem de correr atrás dos meus sonhos todos os dias.

À toda minha família (Santana e Wolf), por serem o meu porto seguro na conquista dos meus objetivos, sem eles, nenhum dos meus propósitos teriam se tornado realidade. Em especial meus pais, Silvana e Rubens, por acreditarem em mim desde o primeiro instante, sempre me apoiando e confortando. Aos meus irmãos de coração, Gabriel Santana, Giovanna Wolf, Isadora Santana e em especial, António Víctor Wolf e Juliana Apparício que acompanharam todos os momentos bons e ruins de muito perto, sempre me ajudando e aconselhando.

Ao meu namorado e grande companheiro, Fernando Pacheco Tofanello, que esteve ao meu lado em todos os momentos, os de insegurança, aguentando muitas vezes lágrimas e também sorrisos. Sempre me escutando, o que me aliviava. Obrigada por entender os momentos de ausência e estar comigo desde o início com todo amor e carinho.

À minha amada vó Elzi Cléa, por sempre me enxergar melhor do que realmente sou e por sempre me incentivar, gratidão por Deus permitir a senhora celebrar essa vitória ao meu lado. Aos meus avós Dorival Santana e Thaís Santana (in memoriam), que

sempre serão grandes exemplos de dignidade, caráter e humildade para mim.

À minha querida professora e orientadora Carla Barbosa Nonino, por ter me recebido de braços abertos desde o início, e ter confiado em mim diante das minhas franquezas e inexperiências, quando até eu mesma não acreditava. Meu muito obrigada por ter me dado a oportunidade de desenvolver esse trabalho e por cada orientação.

À minha co-orientadora e grande amiga, Carolina Nicoletti Ferreira, que não apenas sorriu comigo, mas que me mostrou a seriedade e dedicação necessária no desenvolvimento de todo o trabalho. Obrigada por ter me acolhido e por toda experiência compartilhada desde o início.

Às amigas Marcela Pinhel e Natália Yumi pelos ensinamentos e experiências compartilhadas, por sempre estarem dispostas a me ajudar em diferentes situações. Contribuíram muito com a minha bagagem, ensinamentos que levarei por toda a minha vida.

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Estudos em Nutrígenômica (LEN) que foram mais que simples colegas de laboratório, amigos que levarei para o resto da vida, sempre presentes, que me mostraram a importância de um trabalho em equipe. Em especial, agradeço aos meus amigos da “salinha” que passaram a maior parte do tempo comigo, Bruna Moraes, Caroline Welendorf, Cristiana Cortes, Flávia Ferreira, Heitor Bernardes e Rayana Foglietti por todo companheirismo no dia a dia, amo vocês.

Ao Bruno Parenti, Camila Brandão, Gabriel Franco, Luzânia Martins e Márcia Vilela pela amizade, cada debate feito em reuniões e momentos prazerosos vividos com toda equipe.

As minhas grandes amigas Bárbara Rossi, Leticia Amorim, Marina Gimenes e Nayara Sant'anna por todo apoio de sempre, Sou quem sou porque vocês estiveram e estão sempre ao meu lado.

Às minhas grades amigas da graduação, Jaqueline Borges, Maria Carolina de Lima e Natalia Grazzini, por toda amizade e carinho, mesmo com a distância. A amizade de vocês é um presente que a faculdade me deu.

Às minhas amigas Fernanda Turcato e Viny Lemos por todos momentos de alegria e leveza nessa etapa, sempre as nossas viagens de final de semana recarregavam as minhas energias.

Às enfermeiras por toda assistência fornecida nas coletas com as participantes do estudo.

Ao secretário Samuel Ribeiro Filipini do Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Metabolismo da FMRP-USP pela atenção e apoio ao decorrer dessa etapa.

A todas a voluntárias do projeto, que sem a participação e presença de todas não seria possível a conclusão deste trabalho.

Agradeço ao apoio financeiro da FAPESP pela bolsa durante todo o período do mestrado e a CAPES pelo apoio ao programa.

A gratidão é o único tesouro dos humildes. (William Shakespeare).

O aprendizado é constante.

O meu sincero muito obrigada a todos!

“Se o dinheiro for a sua esperança de independência, você jamais a terá. A única segurança verdadeira consiste em uma reserva de sabedoria e experiência”.

(Henry Ford)

Resumo

RESUMO

WOLF, L.S. **Marcadores epigenéticos relacionados à via do apetite/saciedade em mulheres com obesidade antes e após a derivação gástrica em Y de Roux. 2020.** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2020.

A indicação de cirurgia bariátrica vem crescendo nos dias atuais devido ao seu sucesso na perda de peso e melhora nas desordens metabólicas, como diabetes e dislipidemia. Além disso, existem evidências de que a epigenética pode contribuir substancialmente para a regulação do peso corporal, bem como modular a expressão de hormônios e neuropeptídeos. Causando assim alterações nas vias de apetite e saciedade que são controladas pelos núcleos hipotalâmicos. Sendo assim, o objetivo do trabalho foi avaliar modificações no padrão de metilação de genes relacionados com a via do apetite/saciedade em mulheres com obesidade grau III antes e após a derivação gástrica em Y de Roux (DGYR). Foram incluídas no estudo 24 mulheres ($36,9 \pm 10,3$ anos) com obesidade grau III (Índice de massa corporal – IMC $>40 \text{ kg/m}^2$) submetidos a DGYR e 24 ($39,1 \pm 13,4$ anos) mulheres eutróficas. Tratou-se de um estudo longitudinal, no qual foram coletadas medidas antropométricas, composição corporal, recordatórios alimentar de 24 horas e amostras de sangue periférico para exames bioquímicos, extração de DNA e RNA. O padrão de metilação foi avaliado com a tecnologia Infinium HumanMethylation 450K BeadChip. Para a análise de expressão gênica, empregou-se a técnica de reação quantitativa da amplificação em cadeia de transcritos reversos de RNA (RT-qPCR). Após a intervenção, houve uma diminuição significativa de peso, IMC, circunferência abdominal, ingestão alimentar em todos os indicadores bioquímicos, com exceção do HDL-colesterol. Estabeleceu-se como genes de interesse: FTO, POMC e AGRP. Observou-se também no pós, aumento da metilação da cg00625110 no gene FTO (7%, $p=0,0032$), bem como efeito na expressão gênica. A DGYR foi capaz de melhorar indicadores de saúde e alterar epigeneticamente genes relacionados a via do apetite e saciedade.

Palavras-chave: Obesidade. Cirurgia bariátrica. Apetite. Saciedade. Epigenética. Expressão gênica. Metilação DNA. FTO. AGRP. GHRL. POMC.

ABSTRACT

WOLF, L. S. **Epigenetic markers related to the appetite/satiety pathway in obese women before and after Roux en Y gastric bypass**. 2020. Dissertation (Master's degree) – Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo. Ribeirão Preto, 2020.

The indication of bariatric surgery is growing nowadays. It's notable that the effective weight loss can improve metabolic disorders, as diabetes and dyslipidemia. There are evidences that epigenetic can contribute to body weight regulation leading to changes in hormones and neuropeptides expression. This can promote alterations in the appetite/satiety pathway, which are primarily regulated by hypothalamic nucleus. The aim of the present study was to evaluate modifications in the DNA methylation patterns of genes related to appetite/satiety pathway in women with obesity grade III before and after Roux-en-Y gastric bypass (RYGB). Were included in the study 24 women (36.9 ± 10.3 years old) with obesity grade III (Body Mass Index – BMI > 40 kg/m²) submitted to RYGB and 24 (39.1 ± 13.4 years old) eutrophic women. It was a longitudinal study, sampling included anthropometric and body composition measurements, 24 – hour recalls and blood samples collect: for biochemical exams, DNA and RNA extraction. The DNA methylation patterns were evaluated using Infinium HumanMethylation 450K BeadChip. Gene expression analysis, were evaluated using quantitative real time chain reaction (RT-qPCR). After intervention, were significantly reduced: BMI, abdominal circumference, food intake and all biochemical indicators, except HDL-cholesterol. FTO, POMC and AGRP were pointed as the main genes for deep DNA methylation analysis. After 6 months DNA methylation of cg00625110 of gene FTO, increased 7%, $p=0,0032$. The gene expression pattern were associated with DNA methylation differences. DGYR were able to improve health parameters and epigenetically modulated genes related to the appetite/satiety pathway.

Keywords: Obesity. Bariatric surgery. Appetite. Satiety. Epigenetics. Gene expression. DNA methylation. FTO. AGRP. GHRL. POMC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Técnica cirúrgica - Derivação gástrica em Y de Roux (DGYR)	23
Figura 2.	Relações de vias complexas dos fatores etiológicos da obesidade	24
Figura 3.	Redes hipotalâmicas implicadas no controle de apetite/saciedade	28
Figura 4.	Mecanismos de controle da ingestão alimentar	30
Figura 5.	Formação de 5-metilcitosina	33
Figura 6.	Delineamento experimental do estudo	43
Figura 7.	Foto ilustrativa do BeadChip e do equipamento Iscan (Illumina®)	47
Figura 8.	Fluxograma das CpGs selecionadas para o estudo	56
Figura 9.	Gráficos dos sítios CpGs do gene <i>AGRP</i>	59
Figura 10.	Gráficos dos sítios CpGs do gene <i>GHRL</i>	60
Figura 11.	Gráficos dos sítios CpGs do gene <i>FTO</i>	61
Figura 12.	Gráficos dos sítios CpGs do gene <i>POMC</i>	62
Figura 13.	Correlação da metilação da cg02936043 do gene <i>AGRP</i> com variáveis antropométricas e consumo alimentar em mulheres com obesidade (pré-operatório)	63
Figura 14.	Correlação da metilação da cg02936043 do gene <i>AGRP</i> com peso em mulheres pós cirurgia bariátrica	64
Figura 15.	Correlação da metilação da cg05382012 do gene <i>AGRP</i> com variáveis antropométricas e consumo alimentar em mulheres com obesidade (pré-operatório)	65
Figura 16.	Correlação da metilação da cg04924511 do gene <i>GHRL</i> com variáveis de consumo alimentar em mulheres com obesidade (pré-operatório)	66
Figura 17.	Correlação da metilação da cg03560973 do gene <i>POMC</i> com variáveis antropométricas e consumo alimentar em mulheres com obesidade (pré-operatório)	67
Figura 18.	Expressão relativa do gene <i>FTO</i> em mulheres eutróficas (controle) e pacientes antes e após seis meses do procedimento cirúrgico	68

Figura 19. Expressão gênica relativa de genes associada ao apetite e saciedade em pacientes antes e após seis meses do procedimento cirúrgico	69

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.	Genes orexigênicos	34
Quadro 2.	Genes anorexigênicos	34
Quadro 3.	Equação para correção da massa corporal magra (MCM) de mulheres com obesidade	44
Quadro 4.	Valores de referência de indicadores bioquímicos utilizados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo	45
Quadro 5.	Sonda de hidrólise para o gene avaliado no presente estudo	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Varáveis antropométricas e de composição corporal de indivíduos eutróficos (controle) e pacientes com obesidade (pré-operatório) e após 6 meses de cirurgia bariátrica (pós-operatório)	52
Tabela 2.	Indicadores bioquímicos de indivíduos eutróficos (controle) e pacientes com obesidade (pré-operatório) e após 6 meses de cirurgia bariátrica (pós-operatório)	53
Tabela 3.	Análise de consumo alimentar energético e de macronutrientes de indivíduos eutróficos (controle) e pacientes com obesidade (pré-operatório) e após 6 meses de cirurgia bariátrica (pós-operatório)	54
Tabela 4.	Análise da metilação de genes relacionados a apetite e saciedade de indivíduos eutróficos (controle) e pacientes com obesidade antes (pré-operatório) e após 6 meses de cirurgia bariátrica (pós-operatório)	57
Tabela 5.	Análise de regressão linear mostrando a contribuição dos níveis basais de metilação da cg02936043 do gene <i>AGRP</i> no peso e na ingestão energética em mulheres com obesidade (pré-operatório)	64
Tabela 6.	Contribuição dos níveis basais de metilação da cg02936043 do gene <i>AGRP</i> no peso em mulheres com obesidade (pós-operatório)	65
Tabela 7.	Contribuição dos níveis basais de metilação da cg05382012 do gene <i>AGRP</i> não influenciam o peso e na ingestão energética em mulheres com obesidade (pré-operatório)	66
Tabela 8.	Contribuição dos níveis de metilação da cg03560973 do gene <i>POMC</i> no peso e na ingestão energética em mulheres com obesidade (pré-operatório)	68
Tabela 9.	Influência dos níveis de metilação do gene <i>FTO</i> na expressão gênica em mulheres com obesidade (pós-operatório)	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGRP	Do inglês: <i>Agouti related neuropeptide</i>
CA	Circunferência abdominal
Ca	Cálcio
cDNA	DNA complementar
CHR	Cromossomo
Cm	Centímetro
DNA	Do inglês: <i>Deoxyribonucleic acid</i>
DP	Desvio Padrão
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
Fe	Ferro
FTO	Do inglês: <i>Fat mass and obesity associated</i>
G	Gramas
GHRL	Do inglês: <i>Ghrelin and obestatin prepropeptide</i>
GVL	Gastrectomia Vertical Laparoscópica
HCFMRP-USP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo
HDL	Do inglês: <i>High density lipoproteins</i>
IC	Intervalo de confiança
IMC	Índice de massa corporal
Kcal	Quilocaloria
Kg	Quilograma
LDL	Do inglês: <i>Low density lipoproteins</i>
m ²	Metros ao quadrado
MCM	Massa corporal magra
MG	Massa gorda
OMS	Organização mundial da saúde
POMC	Do inglês: <i>Proopiomelanocortin</i>
qPCR	PCR em tempo real
r ²	Coeficiente de determinação
RNA	Do inglês: <i>Ribonucleic acid</i>
RT – Qpcr	Transcrição reversa por reação em cadeia da polimerase

SPSS	<i>Statistical Package for Social Science</i>
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TG	Triglicérides
TMR	Taxa metabólica de repouso
TSS	Do inglês: <i>Transcription start site</i>
UTR	Do inglês: <i>Untranslated region</i>
Vit. B12	Vitamina B12
%PP	Percentual de perda de peso

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1 Epidemiologia da obesidade	21
1.2 Tratamento cirúrgico: derivação gástrica em Y de Roux (DGYR) ..	22
1.3 Fatores etiológicos da obesidade	24
1.4 Mecanismos reguladores do apetite e saciedade	25
1.4.1 Vias anorexígenas	27
1.4.2 Vias orexígenas	29
1.5 Controle da ingestão alimentar e DGYR	31
1.6 Epigenética e obesidade	32
2. JUSTIFICATIVA	37
3. OBJETIVOS	39
3.1 Objetivo geral	39
3.2 Objetivos específicos	39
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS	41
4.1 Casuística	41
4.2 Critérios de não inclusão	41
4.3 Critérios de exclusão	41
4.4 Aspectos éticos	41
4.5 Cirurgia bariátrica	42
4.6 Delineamento do estudo	42
4.7 Avaliação nutricional	43
4.7.1 Antropometria	43
4.7.2 Avaliação do consumo alimentar	44
4.7.3 Avaliação bioquímica	45
4.8 Análise de metilação	46
4.8.1 Extração e quantificação de DNA	46
4.8.2 Conversão do DNA por bissulfito de sódio	46
4.8.3 Array de metilação de DNA	46
4.8.4 Análise de bioinformática	47
4.9 Análise da expressão gênica	48
4.9.1 Extração e quantificação de RNA	48

4.9.2 Síntese de cDNA	48
4.9.3 Análise de expressão gênica – PCR em tempo real (qPCR) .	49
4.9.4 Análise de expressão gênica com a metilação do DNA	49
4.10 Análise estatística	50
5. RESULTADOS	52
6. DISCUSSÃO	72
7. CONCLUSÃO	80
REFERÊNCIAS	82
APÊNDICE A	94
ANEXO A	98
ANEXO B	99

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Muito se discute sobre a importância de estudos incessantes na área da obesidade, decorrentes da necessidade de tratamentos cada vez mais personalizados. No presente tópico realiza-se uma análise crítica, fundamentada na literatura recente sobre os temas diretamente relacionados ao desenvolvimento da dissertação. Desse modo, são abordados a obesidade, sua etiologia e consequências, tratamento cirúrgico, mecanismos reguladores do apetite e saciedade no período pré e pós-operatório, além da interferência da metilação (evento epigenético) de determinados genes relacionados à via de apetite/saciedade.

1.1 Epidemiologia da obesidade

A obesidade é caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal, causada pelo desequilíbrio entre a ingestão de alimentos e o gasto energético (ABESO, 2016; DAMIANI; DAMIANI, 2011). Trata-se de uma doença crônica metabólica e está fortemente associada a diversas comorbidades, tais como diabetes mellitus, hipertensão arterial, dislipidemia, doenças cardiovasculares, afecções pulmonares, osteoartrites, colelitíase, cálculos biliares, entre outras, e até mesmo a deficiências nutricionais (ABESO, 2016; BANERJEE; HEIDEN, 2018; FINGERET; MARQUES-VIDAL; VOLLENWEIDER, 2018; KULKARNI *et al.*, 2016; NIBLETT, 2015; RAVEENDRAN *et al.*, 2017; SÁNCHEZ *et al.*, 2016). Além das implicações clínicas, o paciente com obesidade, seja de qualquer sexo ou idade, enfrenta problemas sociais, psicológicos e econômicos (JAMES, 2003 apud DEITEL, 2003; WHO, 2014).

A obesidade é classificada universalmente pelo Índice de Massa Corporal (IMC), índice este proposto por Quetelet em 1835, definido pela razão entre a massa corporal do indivíduo expressa em quilogramas e o quadrado da sua altura expresso em metros. Nesse sentido, a Organização Mundial de Saúde (OMS) classifica a obesidade em três níveis: grau I, com IMC de 30 a 34,9 kg/m²; grau II, de 35 a 39,9 kg/m²; e grau III, acima de 40 kg/m² (WHO, 1998). Os níveis de obesidade grave (grau II e grau III) são uma crítica condição crônica de saúde e, de difíceis reversões (RANGEL *et al.*, 2007).

Atualmente, a prevalência de indivíduos com obesidade constitui um dos principais desafios da saúde pública mundial, apresentando crescimento acentuado

nos últimos anos. Os estudos mais recentes da Organização Mundial da Saúde apontam que, em 2016, mais de 1,9 bilhão de adultos estavam com sobrepeso ou obesidade no mundo, sendo que, destes, mais de 650 milhões eram obesos, situação esta que pode ser vista como uma epidemia (WHO, 2018). De acordo com os dados fornecidos pela *NCD Risk Factor Collaboration* (NCD-RisC), a projeção mundial é que, em 2025, cerca de 30% da população adulta esteja com obesidade; além disso, estima-se que 15% seja de obesidade considerada grave (NCD-RISC, 2016). De acordo com Finkelstein *et al.* (2012), no ano de 2030, 51% da população adulta sofrerá com essa doença, o que implicará em gastos ainda maiores com a assistência de saúde.

No Brasil, os números também são preocupantes. Segundo a pesquisa Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL) do Ministério da Saúde apresentada nesse ano de 2019, estima-se que mais da metade dos brasileiros esteja acima do peso, sendo que aqueles com obesidade representam 19,8% da população adulta brasileira, sendo maior entre as mulheres, 20,7%, do que entre os homens, 18,7% (BRASIL, 2019).

1.2 Tratamento cirúrgico: derivação gástrica em Y de Roux (DGYR)

Em se tratando de obesidade grave, tratamentos conservadores da obesidade como acompanhamento nutricional, prática de atividade física e uso de medicamentos específicos – têm mostrado resultados insatisfatórios em longo prazo (BASTIEN *et al.*, 2014; WHO, 2016). Há tempo a Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica (ABESO) mostrou que nos casos graves da doença, o tratamento convencional não produz resultados satisfatórios, na qual, 95% dos pacientes recuperaram o peso inicial em até dois anos após tratamento (ABESO, 2009). Dessa forma, a indicação da cirurgia bariátrica como forma de tratamento dessa doença vem crescendo, sendo considerada a intervenção mais eficaz na promoção da perda significativa e sustentada de peso (BRAY *et al.*, 2016).

Dentre as técnicas cirúrgicas, a derivação gástrica em Y de Roux (DGYR) é considerada padrão ouro, devido à sua segurança e eficácia. Essa técnica cirúrgica combina a redução do reservatório gástrico e a disabsorção secundária a derivação do duodeno e jejuno proximal. Há a criação de uma pequena bolsa estomacal que leva à saciedade precoce combinada com o *bypass* do estômago, duodeno e até 200

cm de jejuno, levando à má absorção (WELEDJI, 2016). Assim, ressalta-se que o procedimento cirúrgico promove modificações na anatomia e fisiologia do trato gastrointestinal, levando a alterações no processo de absorção e na quantidade e qualidade da dieta ingerida, propiciando significativa perda de peso (GOLZARAND; TOOLABI; DJAFARIAN, 2019) e melhora nas desordens metabólicas (FRIED *et al.*, 2013; GODOY, 2013).

A cirurgia bariátrica é indicada para indivíduos com IMC ≥ 40 kg/m², independente da presença de comorbidades; com IMC entre 35 e 40 kg/m² na presença de comorbidades; ou com IMC ≥ 30 kg/m² associado a comorbidades consideradas “graves” por um médico especialista na respectiva área da doença. Tais indivíduos devem apresentar IMC estável há pelo menos dois anos e comorbidades em faixa de risco, além de apresentar insucesso na realização de tratamentos convencionais prévios e avaliação favorável da capacidade psíquica de suportar transformações radicais de comportamento impostas pelo procedimento (SBCBM, 2018).

Figura 1. Técnica cirúrgica - Derivação gástrica em Y de Roux (DGYR)

Fonte: Adaptado de Mulla, Middelbeek e Patti (2018).

O Brasil ocupa atualmente o segundo lugar no ranking mundial do maior número de procedimentos cirúrgicos bariátricos realizados por ano (CAZZO; RAMOS; CHAIM, 2019). De acordo com a mais recente pesquisa da Sociedade Brasileira de

Cirurgia Bariátrica e Metabólica (SBCBM), foram realizadas 105.642 cirurgias no ano de 2017 no setor privado do país; o que representa 5,6% a mais do que as realizadas em 2016 (100 mil). Pelo Sistema Único de Saúde (SUS), entre os anos de 2008 e 2017, o número de cirurgias bariátricas cresceu 215% (SBCBM, 2018).

1.3 Fatores etiológicos da obesidade

A obesidade é uma desordem complexa, de forte base genética e de etiologia multifatorial, resultante de uma inter-relação entre genética, epigenética, meio ambiente e estilo de vida (PÉRUSSE *et al.*, 2005; SINGH, 2014). A Figura 2 representa as relações de vias complexas dos fatores etiológicos da obesidade.

Figura 2. Relações de vias complexas dos fatores etiológicos da obesidade

Fonte: Adaptado de Singh (2014).

Cerca de 25% a 70% das variações do peso corporal são controladas por genes que afetam a homeostase energética por meio da modulação de fatores de transcrição, receptores e moléculas de sinalização, envolvidos em redes hipotalâmicas e outras funções celulares relacionadas com a eficiência energética (BOUCHARD; PÉRUSSE, 1993; PÉRUSSE *et al.*, 2005). Embora já esteja bem

descrito na literatura, a obesidade monogênica (causada por alteração em um único gene) é relativamente incomum (BELL; WALLEY; FROGUEL, 2005; MALANI, 2012). Assim, sobre obesidade poligênica sustentam a ideia de que seja a obesidade mais comum, em mais 95% dos casos, resultado das alterações de estilo de vida desfavoráveis com mais de uma variante genética (HINNEY; VOLCKMAR; ANTEL, 2014; LEE, 2009; RAZQUIN; MARTI; MARTINEZ, 2011).

De acordo com Lee (2009), a interação entre os genes suscetíveis e o ambiente obesogênico pode variar entre os indivíduos, desencadeando desde sobrepeso até obesidade grau III. Porém, a expressão fenotípica poderá se manifestar somente quando o indivíduo for exposto a um ambiente obesogênico. Para a grande maioria da população, a variação da adiposidade resulta de complexas interações entre um grande número de variantes genéticas e fatores ambientais (WANDERLEY; FERREIRA, 2010). De acordo com o mapa genético publicado em 2006, foram identificados cerca de 127 genes associados a obesidade, que foram classificados em categorias, das quais se destaca a de genes hiperfágicos relacionados ao maior apetite (RANKINEN *et al.*, 2006).

Seguindo nesse contexto, o peso corporal é regulado por uma interação entre hormônios e neuropeptídeos, sobre controle principal de núcleos hipotalâmicos, sendo responsáveis pela regulação de apetite/saciedade e do metabolismo lipídico (ANDERBERG *et al.*, 2017; MORTON *et al.*, 2006; RODRIGUES; SUPLICY; RADOMINSKI, 2003). Estudo recente mostra que a obesidade induzida por uma dieta rica em gordura é caracterizada por uma indução de inflamação no hipotálamo, entretanto marcadores pró-inflamatórios da via do apetite permanecem indefinidos (DALVI *et al.*, 2016).

1.4 Mecanismos reguladores do apetite e saciedade

Sabe-se que a obesidade é consequência do desequilíbrio entre a ingestão de alimentos e o gasto de energia, que estão relacionados com fatores biológicos, como conexões neuronais periféricas que informam o sistema nervoso central sobre o estado nutricional imediato ou sobre a quantidade de alimentos consumidos. Essa comunicação ocorre por meio de peptídeos secretados pelo trato gastrointestinal e fatores circulantes (hormônios), os quais carregam informações sobre a quantidade

de estoque energético disponível na forma de tecido adiposo (ANDERBERG *et al.*, 2017; RODRIGUES; SUPLICY; RADOMINSKI, 2003).

Já no ano de 1953 afirmava-se que a homeostase energética é alcançada por um sistema enigmático, responsável por propagar sinais circulantes ao cérebro sobre os estoques de energia disponíveis, chamado de “*feedback* negativo da adiposidade” (KENNEDY, 1953). Além dos sinais de *feedback* negativo, numerosos sinais neuronais e hormonais podem influenciar potencialmente a alimentação, dentre eles neurônios hipotalâmicos, os quais fazem parte de um neurocircuito responsável pela regulação da ingestão de alimentos em resposta à entrada de sinais humorais que circulam em concentrações proporcionais à gordura corporal (MORTON; MEEK; SCHWARTZ, 2014). Evidências mostram que a ineficiência do sistema de homeostase energética se correlaciona com a alta prevalência de obesidade (NGUYEN; EL-SERAG, 2010). Assim, muitas pesquisas se voltam para o estudo de mecanismos reguladores da ingestão alimentar e homeostase energética (PUCCI; BATTERHAM, 2018; STEINERT *et al.*, 2017; YANG *et al.*, 2018). De forma sucinta, os sinais a curto prazo, são modulados pela quantidade e composição da refeição, bem como pela ingestão calórica diária, enquanto os sinais a longo prazo, oscilam principalmente em resposta ao armazenamento de energia (BELLAR; JAROSZ; BELLAR, 2008; SUMITHRAN; PROIETTO, 2013).

Dentre os principais mecanismos, destaca-se o trato gastrointestinal (TGI), devido à sua constante comunicação com núcleos centrais reguladores do apetite e saciedade (YOUNG, 2012). Essa comunicação é controlada por sinais aferentes desde o sistema digestório, passando pelo tecido adiposo e chegando às estruturas centrais, comedido pelo tronco encefálico e hipotálamo nos vários mecanismos neuroendócrinos, via neurotransmissores orexígenos (apetite) e anorexígenos (saciedade) (ALVAREZ-LEITE; SOARES; TEIXEIRA, 2016; DAMIANI; DAMIANI, 2011).

O núcleo arqueado, localizado no hipotálamo, parece ser a região do cérebro onde há maior concentração de receptores para leptina e insulina, hormônios essenciais no controle de apetite e manutenção de peso. Nessa mesma região, existem duas subpopulações de neurônios que expressam neurotransmissores orexigênicos – neuropeptídeo Y (**NPY**) e peptídeo relacionado ao Agouti (**AGRP**), que são indutores de apetite; e outra que expressa os anorexigênicos – proopiomelanocortina (**POMC**) e transcrição regulada por cocaína e anfetamina

(**CART**), indutores de saciedade (FLIER, 2004). Esses neurotransmissores são regulados tanto por mecanismos endócrinos, quanto por mecanismos neurais.

1.4.1 Vias anorexígenas

Imediatamente após a refeição, com a distensão do estômago ou com a chegada de nutrientes no intestino delgado e início da ingestão dos alimentos, há um estímulo do nervo vago e dos nervos espinais para a liberação dos hormônios colecistoquinina (CCK) e peptídeo YY (PYY). Esses peptídeos, ao serem recebidos no SNC, exercem a ação de inibir os neurônios produtores de NPY/AGRP e, assim, indicar o fim da refeição (HINNEY; VOLCKMAR; ANTEL, 2014).

O hormônio anorexigênico leptina aparece na literatura como sendo o principal indicador da adiposidade e do sinal do estado de nutrição. Consiste em uma proteína secretada pelos adipócitos e, assim, suas concentrações plasmáticas estão diretamente relacionadas com a massa de tecido adiposo branco. As concentrações de leptina estão aumentadas na obesidade e diminuem com a perda de peso (AHIMA; ANTWI, 2008; RODRIGUES; SUPLICY; RADOMINSKI, 2003). Por outro lado, a insulina, hormônio peptídico secretado pelas células β pancreáticas em resposta as refeições, é responsável por estimular a glicogênese, lipogênese e síntese proteica. Há tempo já se sabe do transporte de insulina, via sangue, para o sistema nervoso central (SNC) e ligação da mesma a várias regiões do cérebro, demonstrado a atuação da insulina na inibição profunda da ingestão alimentar (AHIMA; ANTWI, 2008; RODRIGUES; SUPLICY; RADOMINSKI, 2003). Assim, leptina e insulina atuam em paralelo para estimular neurônios anorexígenos (POMC/CART).

Ainda, em situações de balanço energético positivo ou de aumento da gordura corporal, ocorre a elevação dos níveis de insulina e de leptina, com consequente estímulo de liberação de neuropeptídeos POMC e CART, e inibição direta dos neurônios NPY/AGRP no hipotálamo, resultando em estímulos anorexigêncios e aumento da saciedade (RODRIGUES; SUPLICY; RADOMINSKI, 2003).

Dessa forma, os neurônios anorexigênicos e orexigênicos hipotalâmicos são regulados por muitos sinais neuronais e hormonais (Figura 3). Os neurônios de primeira ordem são projetados para neurônios de segunda ordem, localizados em outras regiões hipotalâmicas, como o núcleo paraventricular hipotalâmico (PVN) e o hipotálamo lateral (AHL) e a área periférica (APF), onde se situam algumas das vias

eferentes importantes que regulam o apetite e a saciedade (GRIBBLE, 2012; HINNEY; VOLCKMAR; ANTEL, 2014; SCHWARTZ; MORTON, 2002).

Figura 3. Redes hipotalâmicas implicadas no controle de apetite/saciedade

Fonte: Adaptado de Valassi, Scacchi e Cavagnini (2008).

Os neurônios produtores de NPY, AGRP, POMC e CART, localizados no núcleo arqueado do hipotálamo (ARC), têm função chave na regulação do balanço energético. A leptina e insulina, exercem seus efeitos inibindo aos neurônios NPY/AGRP e estimulando os neurônios POMC/CART, juntamente com os hormônios gastrointestinais (colecistocinina (CCK), peptídeo do tipo glucagon 1 (GLP-1) e peptídeo Y (PYY)). Os sinais orexigênicos e anorexigênicos produzidos pelos neurônios NPY/AGRP e POMC/CART são então enviados até neurônios efetores de segunda ordem (hormônio liberador de corticotropina (CRH), hormônio liberador de tireotrofina (TRH), oxitocina (OXY), hormônio concentrador de melanina (MCH)), localizados nas regiões núcleo paraventricular (PVN), que expressam sinais anorexigênicos, e regiões área hipotalâmica lateral (AHL) e área perifornical (APF),

que expressam sinais orexigênicos. Esses diversos sinais atuam juntos para proporcionar o total equilíbrio entre a aquisição de alimento e gasto energético.

1.4.2 Vias orexígenas

A grelina é um hormônio peptídico, secretado predominantemente por células estomacais, e foi o primeiro hormônio a ser identificado como estimulador da ingestão alimentar. Atua como um sinal orexigênico, o qual envia informações sobre a ingestão calórica periférica para o centro do SNC e sua concentração plasmática aumenta durante o jejum. Logo, o início da ingestão alimentar é estimulado pela liberação do mesmo, codificado pelo gene *GHRL* (pré-pró-peptídeo de grelina e obestatina), indutor de apetite (KAIRUPAN *et al.*, 2016).

O hormônio grelina é responsável por estimular a região orexígena e ativar os peptídeos NPY e AGRP. Assim, o aumento na secreção da grelina parece estar relacionado com a obesidade, mas, em geral, os pacientes com obesidade apresentam baixas concentrações de grelina quando comparados aos indivíduos normais (HORVATH *et al.*, 2001). Haqq *et al.* (2003) relacionaram dieta hipocalórica para perda de peso ao aumento na secreção desse hormônio, aumento do apetite e limitação do emagrecimento.

O α -melanocortina (α -MSH) é um neuropeptídeo anorexígeno derivado da clivagem de proopiomelanocortina (POMC), e tem seus efeitos mediados pelo receptor de melanocortina 4 (MC4R). O MC4R é encontrado no hipotálamo e sua ativação ocorre por meio da ligação com o α -MSH. Quando ativado, o MC4R tem um papel central no controle da ingestão alimentar por estimular a saciedade (VALASSI; SCACCHI; CAVAGNINI, 2008). Assim, após ativado, o neuropeptídeo AGRP bloqueia o receptor de melanocortina 4 (MCR4), por meio do sistema da melanocortina (MARX, 2003; VALASSI; SCACCHI; CAVAGNINI, 2008).

A Figura 4 mostra a regulação dos neurônios hipotalâmicos na ingestão alimentar. A queda de leptina e insulina durante o jejum induz a hiperfagia e diminui o gasto de energia, aumentando NPY/AGRP e inibindo POMC/CART e α -MSH (KAIRUPAN *et al.*, 2016).

Figura 4. Mecanismos de controle da ingestão alimentar

Fonte: Schwartz e Morton (2002).

A ativação dos neurônios NPY/AGRP tem efeito orexigênico, promovendo a ingestão de alimentos, enquanto que a ativação dos neurônios POMC/CART tem o efeito oposto anorexigênico. A POMC é ativada por meio de modificação pós-traducional dando origem ao hormônio α -melanocortina (α -MSH). Essas duas classes de neurônios recebem sinais de vários hormônios. A leptina secretada pelo tecido adiposo e a insulina secretada pelo pâncreas possuem influência anorexigênica sobre

o núcleo arqueado. A grelina é produzida pelo estômago e duodeno, e estimula os neurônios NPY/AGRP por meio dos seus receptores (secretagogos e hormônio de crescimento (GHSRs) – não mostrado na imagem). Os neurônios NPY/AGRP têm um efeito inibitório sobre os neurônios POMC/CART.

1.5 Controle da ingestão alimentar e DGYR

Já está bem estabelecido na literatura que a DGYR altera o comportamento alimentar, com o aumento da saciedade e redução do apetite (LAURENIUS *et al.*, 2012; MIRAS *et al.*, 2012; MÜNZBERG *et al.*, 2015). O processo cirúrgico resulta na diminuição da capacidade gástrica, redução sustentada na ingestão de alimentos associada com a redução do apetite e, conseqüentemente, perda de peso.

No entanto, os estudos apontam que a redução do apetite ocorre em decorrência não somente da redução do volume do estômago remanescente, mas também da alteração de hormônios plasmáticos gastrintestinais da saciedade, tendo como exemplo a grelina, PYY e o peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1) (FALKÉN *et al.*, 2011; MEEK *et al.*, 2016; RUBINO *et al.*, 2006).

Na vagotomia, os sinais dos hormônios intestinais, incluindo a grelina, são prejudicados, demonstrando o papel da sinalização vagal nos mecanismos de apetite e saciedade hipotalâmico (LE ROUX *et al.*, 2005). Por outro lado, após a DGYR os nervos vagos da bolsa gástrica permanecem em grande parte intactos e podem atuar nesses mecanismos no hipotálamo (BERTHOUD; SHIN; ZHENG, 2011).

Acredita-se que, devido às alterações anatômicas após a DGYR, ocorra transferência direta de nutrientes para o jejuno e secreção peptídica intestinal, modificando assim as respostas comportamentais e de recompensa cerebral aos alimentos (DAILEY; MOGHADAM; MORAN, 2011; FALKÉN *et al.*, 2011; GOLDSTONE *et al.*, 2016; PUCCI; BATTERHAM, 2018; STEINERT *et al.*, 2017).

Em revisão bibliográfica relacionou-se a perda de peso com o controle do apetite, autores mostraram alterações que podem promover o aumento de apetite após intervenção para a perda de peso, sustenta-se a ideia que uma brusca restrição calórica se associa a um desequilíbrio homeostático, relacionados a hormônios como, leptina, grelina e peptídeo YY (HINTZE *et al.*, 2017). Estudo recente mostra que os níveis de grelina total em jejum diminuíram a curto prazo (período inferior a 3 meses)

e aumentaram a longo prazo (período maior que 3 meses) após a DGYR (XU *et al.*, 2019).

A perda de peso induzida pela dieta e a cirurgia bariátrica podem ter efeitos distintos nesses neuropeptídeos hipotalâmicos (MULLA; MIDDELBEEK; PATTI, 2018; STEFATER *et al.*, 2010).

1.6 Epigenética e obesidade

Paralelamente, tanto a obesidade quanto variações de peso possuem influência genética e epigenética (MILAGRO *et al.*, 2011; ROBLES; RAMÍREZ; VELÁSQUEZ, 2012), principalmente em genes relacionados à via do apetite e saciedade (GOLDSTONE *et al.*, 2016; RODRIGUES; SUPPLY; RADOMINSKI, 2003).

A epigenética é o estudo dos fenômenos e mecanismos que causam mudanças hereditárias na expressão gênica, mas que não são dependentes de alterações na sequência do DNA (DEANS; MAGGERT, 2015). O termo (do grego *epi* = além de) é usado para explicar as mudanças herdáveis na expressão gênica, mas que não alteram as sequências de bases nucleotídicas da molécula de DNA (código genético) (GRUNDBERG *et al.*, 2013; SHARMA, 2017).

Dentre as alterações existentes em epigenética, a metilação do DNA é o processo mais estudado, e está relacionado a uma influência na transcrição gênica quando presente preferencialmente na região promotora, que desempenha um papel fundamental na regulação de genes e susceptibilidade a diversas doenças, incluindo a obesidade (GRUNDBERG *et al.*, 2013; MACARTNEY-COXSON *et al.*, 2017). A metilação é uma modificação química na qual ocorre a adição de um grupamento metil (CH₃) à posição C5 do anel da citosina, catalizada por enzimas DNA metiltransferases, levando à formação de 5-metilcitosina como mostra a Figura 5. Logo o processo de metilação torna o DNA inacessível e assim reprime a expressão gênica (BIRD, 2002; FAN; ZHANG, 2009).

Figura 5. Formação de 5-metilcitosina

Fonte: Attwood, Yung e Richardson (2002).

Na imagem, a enzima DNA metiltransferase catalisa a transferência de um grupo metil (CH_3) S-adenosilmetionina (SAM) para citosina, produzindo 5-metilcitosina e S-adenosil-homocistina (SAH). A metilação do DNA ocorre quase exclusivamente em dinucleotídeos CpG.

Estudos sugerem que a metilação do DNA pode ser modificada durante o curso da vida por variáveis ambientais e comportamentais (PANAGIOTOU; NIELSEN, 2009; SHENKER *et al.*, 2013). Evidências apontam que a DGYR pode interferir na metilação do DNA e, conseqüentemente, na modulação da expressão gênica, desempenhando importante papel na homeostase após a perda de peso (BOUCHARD *et al.*, 2010; CRUJEIRAS *et al.*, 2013; KAPUT; RODRIGUEZ, 2006; SALA *et al.*, 2017). Nesse contexto, estudo recente mostra que a DGYR promove mudanças no padrão de metilação do DNA em vias específicas, desempenhando um papel na homeostase metabólica (FERREIRA *et al.*, 2019). No entanto, ainda há dúvidas se o perfil de metilação do DNA é somente um efeito da restrição calórica ou se está relacionado com alterações na própria DGYR (BOUCHARD *et al.*, 2010; FALKÉN *et al.*, 2011).

A literatura científica aponta um vasto número de genes relacionados com as vias do apetite/saciedade (THAKER, 2017). Os quadros 1 e 2 destacam alguns desses genes responsáveis pela codificação de neurotransmissores, hormônios e seus respectivos receptores.

Quadro 1. Genes orexigênicos

Genes	Nomes Genes	Localização
<i>AGRP</i>	<i>Agouti-related peptide</i>	16q22.1
<i>NPY</i>	<i>Neuropeptide Y</i>	7p15.3
<i>HCRT</i>	<i>Hypocretin neuropeptide precursor</i>	17q21.2
<i>GHRL</i>	<i>Ghrelin and obestatin prepropeptide</i>	3p25.3
<i>GHSR</i>	<i>Growth hormone secretagogue receptor</i>	3q26.31
<i>FTO</i>	<i>Alpha-ketoglutarate dependent dioxygenase</i>	16q12.2

Fonte: Adaptado de SABiosciences (2012).

Quadro 2. Genes anorexigênicos

Genes	Nomes Genes	Localização
<i>ADIPOQ</i>	<i>Adiponectin, C1Q and collagen domain containing</i>	3q27.3
<i>BDNF</i>	<i>Brain-derived neurotrophic fator</i>	11p14.1
<i>CART</i>	<i>Cocaine- and amphetamine-regulated transcript</i>	5q13.2
<i>GRP</i>	<i>Gastrin releasing peptide</i>	18q21.32
<i>MC3R</i>	<i>Melanocortin receptor 3</i>	20q13.2
<i>MC4R</i>	<i>Melanocortin receptor 4</i>	18q21.32
<i>POMC</i>	<i>Pro-opiomelanocortin</i>	2p23.3
<i>CCK</i>	<i>Cholecystokinin</i>	3p22.1
<i>GLP1R</i>	<i>Glucagon-like peptide 1 receptor</i>	6p21.2
<i>PYY</i>	<i>Peptide YY</i>	17q21.31
<i>LEP</i>	<i>Leptin</i>	7q32.1
<i>LEPR</i>	<i>Leptin receptor</i>	1p31.3
<i>NTRK2</i>	<i>Neurotrophic receptor tyrosine kinase 2</i>	9q21.33
<i>UCP1</i>	<i>Uncoupling protein 1</i>	4q31.1

Fonte: Adaptado de SABiosciences (2012).

Os mecanismos responsáveis pelo controle do apetite e saciedade, particularmente em face da grande perda de peso decorrente da cirurgia bariátrica, ainda não estão totalmente compreendidos. Assim, o presente estudo tem como hipótese que o padrão de metilação dos genes relacionados com as vias do apetite/saciedade pode influenciar no controle do peso.

Justificativa

2. JUSTIFICATIVA

Tendo em vista o aumento da prevalência da obesidade e sua relação com o desenvolvimento de outras comorbidades, faz-se necessário compreender a fundo a base dessa doença. Só assim será possível trabalhar a prevenção e o tratamento cada vez mais assertivo e personalizado.

Acredita-se que um dos fatores responsáveis pelo insucesso no tratamento convencional da obesidade seja o aumento de estímulos relacionados ao apetite, devido à severa restrição calórica. A sinalização do apetite é mediada por uma população neuronal específica no hipotálamo, por meio da expressão aumentada de neuropeptídeos orexígenos, que desencadeia respostas biológicas contrarreguladoras.

Assim, a cirurgia bariátrica, em especial a DGYR, vem sendo bastante estudada, por trazer surpreendentes resultados: diminuição de apetite associada à perda de peso significativa e melhora dos parâmetros metabólicos (FRIED *et al.*, 2013; CARSWELL *et al.*, 2014; MEEK *et al.*, 2016; CRISP *et al.*, 2018).

O papel do sistema nervoso central na mediação dos efeitos metabólicos na cirurgia de DGYR ainda é pouco compreendido. Até hoje nessa área os estudos mais completos foram realizados apenas de modo experimental (BARKHOLT *et al.*, 2016; PATKAR *et al.*, 2019). Nesse sentido, é notório que restam dúvidas sobre as alterações nas vias de apetite e saciedade na DGYR, de modo que é uma realidade a demanda por novos estudos que investiguem tais fenômenos.

Sabido o papel da epigenética na progressão e desenvolvimento da obesidade, fazem-se necessários estudos para entender a relação da metilação do DNA com a ingestão alimentar, parâmetro antropométricos e bioquímicos. Até onde se sabe, esse foi o primeiro estudo que avaliou os referidos genes de forma global, no contexto da cirurgia bariátrica.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar modificações no padrão de metilação de genes relacionados com a via do apetite/saciedade em mulheres com obesidade antes e após a DGYR.

3.2 Objetivos específicos

- A) Avaliar, em mulheres com obesidade antes e após a DGRY e em um grupo controle, constituído por mulheres eutróficas:
  - ✓ Variáveis antropométricas e de composição corporal;
  - ✓ Indicadores bioquímicos;
  - ✓ Consumo alimentar;
  - ✓ Padrão de metilação de genes relacionados à via do apetite/saciedade;
- B) Verificar associação das medidas antropométricas e perfis alimentar e bioquímico com o padrão de metilação e expressão dos genes relacionados à via do apetite/saciedade.
- C) Analisar contribuição do padrão de metilação no peso corporal e na ingestão alimentar.
- D) Analisar a relação da expressão gênica com a metilação do DNA.

Casuística e Métodos

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 Casuística

Este é um estudo longitudinal prospectivo, no qual foram selecionados 48 indivíduos de população com etnia miscigenada, do sexo feminino, com idade entre 18 e 60 anos. As mulheres foram distribuídas em dois grupos de acordo com o IMC: grupo controle, composto por 24 mulheres eutróficas (IMC entre 18,5 kg/m² a 24,9 kg/m²) e grupo cirurgia bariátrica, composto por 24 mulheres com obesidade grau II ou grau III (IMC $\geq$ 35 kg/m²) (BUCHWALD *et al.*, 2004).

As mulheres obesas foram selecionadas por conveniência do Ambulatório de Cirurgia Bariátrica de um hospital público, seguindo os critérios de inclusão para o procedimento cirúrgico estabelecido pela Sociedade Brasileira de Cirurgia Bariátrica e Metabólica, levando em consideração quatro critérios; IMC, idade, doenças associadas a obesidade e tempo de doença (SBCBM, 2017). O grupo controle também foi recrutado por conveniência.

4.2 Critérios de não inclusão

Em ambos os grupos, não foram incluídas mulheres tabagistas, etilistas, portadores de enfermidades incluindo câncer, diabetes mellitus, hipertensão arterial sistêmica, doenças cardiovasculares, neurológicas e hepáticas e dislipidemia.

4.3 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo os pacientes que apresentaram modificação na técnica cirúrgica padrão (DGYR), perda de seguimento com equipe e/ou gestantes e lactantes durante o seguimento do estudo.

4.4 Aspectos éticos

As participantes do estudo foram esclarecidas a respeito do protocolo da pesquisa, tendo sido incluídas somente as que estiveram de acordo com a sua

realização. A pesquisa e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP (CAAE: 18973913.0.0000.5440).

4.5 Cirurgia bariátrica

O procedimento cirúrgico consistiu na criação de uma pequena porção gástrica (30 a 50 ml) e uma anastomose do coto gástrico com o jejuno (ambas alças remanescentes medindo cerca de 100 cm), o que caracteriza a DGYR. Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados pela Equipe de Cirurgia Bariátrica do HCFMRP-USP.

4.6 Delineamento do estudo

O grupo cirurgia bariátrica foi avaliado em dois períodos: antes e após seis meses do procedimento cirúrgico. No momento da internação para a realização da cirurgia foram coletados os dados do período pré-operatório (um dia antes do procedimento cirúrgico). Após seis meses, as pacientes foram convidadas a retornarem ao hospital para a coleta dos dados do pós-operatório. Em todos os momentos foram coletados dados de antropometria, composição corporal, ingestão alimentar e coleta de material sanguíneo (sangue periférico) destinado à avaliação bioquímica e genética (metilação do DNA e expressão gênica). Os procedimentos de coleta dos dados foram realizados na Unidade Metabólica da Enfermaria de Nutrologia do HCFMRP-USP, e as amostras de sangue foram coletadas pelo Serviço de Enfermagem da própria Unidade.

A avaliação do grupo controle aconteceu em um único momento, na qual foram realizados todos os procedimentos descritos anteriormente (Figura 6).

Figura 6. Delineamento experimental do estudo

Fonte: Elaborada pela autora.

4.7 Avaliação nutricional

4.7.1 Antropometria

Para avaliação antropométrica, foram realizados aferição do peso (kg) e da estatura (m) e circunferência abdominal, cálculo do IMC e análise da composição corporal pelo método de Bioimpedância Elétrica (modelo Quantum BIA 101 Q – RJL System) (KYLE *et al.*, 2004).

Para a obtenção do peso, as pacientes foram pesadas em balança digital “Filizola” do tipo plataforma, com capacidade de 300 kg e precisão de 0,2 Kg. No momento da aferição, elas estavam com roupas leves e descalças. Para aferição da estatura, foi utilizada haste vertical com graduação de 0,5 cm. As pacientes ficaram em pé, descalças, com os calcanhares juntos, costas retas e braços estendidos ao longo do corpo. O IMC foi obtido utilizando-se a fórmula: $IMC = P/A^2$, onde P é o peso em quilogramas e A é a estatura em metros. A medida da circunferência abdominal foi obtida passando-se uma fita métrica inextensível com graduação de 0,1 mm na maior circunferência entre a última costela e a crista ilíaca.

Para análise da composição corporal, foi utilizado aparelho de Bioimpedância Elétrica modelo Quantum BIA 101 Q – RJL System. O exame foi realizado após doze horas de jejum, com a bexiga urinária vazia, paciente deitada com as pernas afastadas

e braços em paralelo afastados do corpo. De acordo com a descrição técnica, quatro eletrodos adesivos foram colocados na mão e no pé: um na superfície dorsal do punho direito entre os ossos ulnar e rádio e outro no terceiro metacarpo, um na superfície anterior do tornozelo direito entre as porções proeminentes dos ossos e outro na superfície dorsal do terceiro metatarso. Uma corrente elétrica de baixa amplitude (entre 500 a 800 A) e frequência de 50 KHz foi aplicada nos eletrodos distais da mão e do pé. Os valores de resistência e reatância foram colocados em fórmulas especiais para análise da composição corporal de obesos, obtendo-se assim os valores de massa corporal magra (MCM). Para obtenção dos valores de gordura corporal (MCG), foi subtraída a quantidade de MCM (kg) do peso total (kg). A fórmula para o cálculo da MCM está apresentada no Quadro 3.

Quadro 3. Equação para correção da massa corporal magra (MCM) de mulheres com obesidade

$\text{MCM (kg)} = 2,68 + (0,2 \times \text{Est}^2 / R) + 0,19 \times P + 2,55 \times \text{etnia}$ (caucasianos = 0, afrodescendentes = 1) + 0,1157 x Est.
Est = estatura em metros; P = peso em quilogramas; R = resistência em ohm.

Fonte: Adaptado de Jakicic, Wing e Lang (1998).

4.7.2 Avaliação bioquímica

Para avaliação bioquímica utilizou-se os exames feitos rotineiramente no hospital: glicemia de jejum e lipidograma. Foram utilizados valores de referência padronizados no HCFMRP-USP de acordo com os kits utilizados nas dosagens. Os valores de referência de exames bioquímicos utilizados e os métodos de análise estão descritos no Quadro 4.

Quadro 4. Valores de referência de indicadores bioquímicos utilizados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo

Exames Bioquímicos	Valores de Referência	Método de Análise
Glicemia de jejum (mg/dL)	70 – 100	Colorimétrico - equipamento Cobas Integra 700® <i>Roche Diagnostic Systems</i>
Colesterol Total (mg/dL)	< 200	Colorimétrico - equipamento Automatic Analyzer HITACHI 902®
HDL colesterol (mg/dL)	> 35	Colorimétrico - equipamento Automatic Analyzer HITACHI 902®
LDL colesterol (mg/dL)	< 130	Colorimétrico - equipamento Automatic Analyzer HITACHI 902®
Triglicérides (mg/dL)	<150	Colorimétrico - equipamento Automatic Analyzer HITACHI 902®
mg: miligrama; dL: decilitro; HDL: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade.		

4.7.3 Avaliação do consumo alimentar

A análise da ingestão alimentar foi realizada por meio da aplicação de três Recordatórios Alimentares de 24 horas (R24h) em cada etapa. Por meio dos R24h foi realizada análise quantitativa da dieta, observando a ingestão energética diária (kcal) e a quantidade ingerida de macronutrientes (proteínas, lipídios, carboidratos e fibras) e de micronutrientes (cálcio, ferro, vitamina B12 e folato). E para as mulheres que estavam fazendo uso de suplementação Materna® foi calculado junto com o recordatório alimentar. Os dados foram calculados no programa Dietwin® (REINSTEIN, 2008).

4.8 Análise de metilação

4.8.1 Extração e quantificação de DNA

O DNA foi extraído a partir do sangue total por meio do método de extração automatizada por *beads* magnéticas, utilizando o equipamento MaxwellIMDx e reagentes sugeridos pelo fabricante (Promega). O tubo de coleta de sangue com EDTA foi centrifugado a 2.000 x g por 10 minutos e 300 µL do Buffy Coat foram retirados para serem adicionados no cartucho. O DNA foi eluído em 480 µL de H₂O ultrapura e armazenado em freezer -80°C.

A concentração do DNA, foi avaliada utilizando NanoDrop, a integridade foi verificada por meio de gel de agarose e a qualidade, a partir das razões obtidas por leitura óptica (razões 260/280 e 260/230).

4.8.2 Conversão do DNA por bissulfito de sódio

O DNA foi convertido por bissulfito de sódio por meio do kit de conversão EZ DNA Methylation (ZymoResearch, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante, com conversão de citosinas não metiladas em uracila. As citosinas metiladas permaneceram inalteradas durante o tratamento.

4.8.3 Array de metilação de DNA

Após o tratamento inicial pelo bissulfito, as amostras foram amplificadas e hibridizadas com *Infinium Human Methylation 450K BeadChip* – Illumina, seguindo-se as especificações do fabricante (Illumina, San Diego, CA). Os chips foram escaneados utilizando a plataforma *iScan* – Illumina. A intensidade das imagens foi obtida por meio do software *Genome Studio Methylation* (1.9.0, Illumina®), na qual se verificaram os níveis de metilação em valores beta (β).

Figura 7. Foto ilustrativa do BeadChip e do equipamento Iscan (Illumina®)

Fonte: BeadChip - Iscan (Illumina®).

4.8.4 Análise de bioinformática

Os alvos já descritos na literatura e nos bancos de dados (GeneMANIA® e KEGG®) foram selecionados para avaliar a metilação do DNA (quadros 1 e 2).

A variação dos níveis de metilação ($\Delta\beta$) foi calculada para um determinado sítio CpG subtraindo-se o valor beta médio do total de amostras do período pré cirurgia em comparação com o conjunto de amostras pós cirurgia.

Valores de $\Delta\beta$ positivos indicam hipermetilação, enquanto de $\Delta\beta$ negativos indicam hipometilação relativa. Para identificar padrões consistentes de CpGs diferencialmente metilados, o teste de Wilcoxon foi realizado. Aplicamos um limiar para os sítios CpG significativos baseados em $\Delta\beta$ com um valor mínimo de 5% (valor maior que 0,5 ou menor que -0,5) e um valor de p menor que 0,01. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software R (versão 3.2.0) (BIBIKOVA; FAN, 2009; NICOLETTI et al., 2019).

Dos alvos que passaram pelos filtros, foi feito um levantamento dos sítios CpGs localizados nos genes selecionados para o estudo.

Os genes que tiveram sítios diferencialmente metilados, também foram analisados os sítios de forma pontual, ou seja, foram avaliados todos os sítios presentes no *BeadChip*. Para essa análise foi utilizado o valor M, esse valor trata-se

uma transformação sugerida por Du e colaboradores (2010), melhora a visualização dos dados uma vez que amplia o range de variação dos valores β (0-1). Valores de M menor que -2 indicam hipometilação, enquanto valores maiores que 2 indicam hipermetilação. Ainda os valores de M são mais utilizados para avaliar a relação da metilação do DNA e a expressão gênica (DAVÉ *et al.*, 2015).

4.9 Análise da expressão gênica

4.9.1 Extração e quantificação de RNA

O RNA foi extraído a partir do sangue total utilizando o método de extração fenolclorofórmio descrito por Chomczynski e Sacchi (1987), a partir de 1,0 mL de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). O RNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro por fluorescência (Qubit® 2.0 Spectrophotometer), e a absorbância foi medida nos comprimentos de onda de 260/280 e 230nm, para avaliação do grau de pureza. As amostras de RNA foram armazenadas a -80°C em alíquotas, garantindo estabilidade e preservação do RNA, evitando, dessa forma, a degradação do material a cada descongelamento. Para quantificar o RNA de cada amostra utilizou-se o aparelho NanoDrop 2000.

4.9.2 Síntese de cDNA

A síntese do cDNA foi realizada por meio da transcrição reversa por reação em cadeia de polimerase – RT – qPCR (Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction). O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado por meio da reação de 50 μ l composto por 100 ng de RNA total, utilizando kit High-CapacitycDNA Reverse Transcription® (*Life Technologies*), seguindo as instruções do fabricante.

4.9.3 Análise de expressão gênica – PCR em tempo real (qPCR)

Com base nos sítios que foram diferencialmente metilados o gene *FTO* foi escolhido, pois foi o mais diferencialmente metilado no momento pós comparado ao pré.

A análise de expressão gênica foi realizada em triplicata por RT-qPCR utilizando o aparelho 7500 Fast real PCR System (Applied Biosystems). Para quantificar a expressão relativa do gene *FTO*, foi utilizada a sonda de hidrólise descrita no Quadro 4.

Quadro 5. Sonda de hidrólise para o gene avaliado no presente estudo

Gene	Sonda
<i>FTO</i>	Hs01057139_g1
TaqMan MGB 6-FAM fluorogênicas, seguindo instruções do fabricante.	

Para controle endógeno, dois genes de referência foram utilizados com o objetivo de normalizar a expressão dos mRNAs dos genes analisados para diferenças na quantidade e qualidade de RNA, sendo eles *β -actina* (Hs99999903_m1) e *GAPDH* (Hs99999905_m1). Além da verificação de eficiência da reação de transcrição reversa entre as amostras. Esses genes são frequentemente utilizados em estudos para determinar o melhor normalizador para as amostras analisadas. Os genes de referência foram amplificados e detectados por sonda TaqMan MGB 6-FAM fluorogênicas (Applied Biosystems), seguindo instruções do fabricante.

4.9.4 Análise de expressão gênica com a metilação do DNA

Para analisar a relação entre expressão gênica e metilação do DNA, foram utilizados os valores de M. Regressões lineares individuais foram feitas para verificar associações, o modelo de regressão linear multivariável foi desenvolvido conforme sugerido por Davé e colaboradores (2015). Os dois sítios CpG diferencialmente metilados no pós operatório em relação ao pré, cujos r^2 foram maiores, permaneceram

no modelo final. Genes de controle endógenos foram utilizados para ajustar o modelo final. O modelo de regressão linear foi conduzido usando a função `lm()` da versão R 3.5.2. (DAVÉ *et al.*, 2015).

4.10 Análise estatística

Para análise estatística, a normalidade da distribuição dos dados foi verificada pelo teste de *Shapiro-Wilk*. A estatística descritiva foi composta por valores de média e desvio-padrão. Foi utilizado o teste de *Wilcoxon* para as comparações entre os momentos antes e após a intervenção cirúrgica, e o teste de Mann-Whitney para comparação entre o grupo controle como grupo cirurgia bariátrica. Correlações de Pearson foram utilizadas para avaliar a correlação de padrões de metilação do DNA com as variáveis fenotípicas. Modelos de regressão linear foram aplicados para analisar a previsão do padrão de metilação e as variáveis selecionadas. A significância estatística foi estabelecida em $p < 0,05$, sendo todas as análises realizadas no software *Statistical Package for Social Science* (SPSS versão 22.0 Inc. Chicago. IL).

Resultados

5. RESULTADOS

Participaram deste estudo 48 mulheres, sendo 24 com obesidade graus II e III ($36,9 \pm 10,3$ anos), submetidas à derivação gástrica em Y-Roux e 24 mulheres eutróficas ($39,1 \pm 13,4$ anos).

Na Tabela 1 estão descritas as variáveis antropométricas e de composição corporal das pacientes do grupo controle, pré-operatório e pós-operatório. Ao comparar o grupo controle com o pré-operatório e pós-operatório observaram-se diferenças significativas em todos os indicadores, exceto a idade. Entre os momentos pré-operatório e pós-operatório evidenciou-se uma diminuição significativa de todas as variáveis, exceto na MCM.

Tabela 1. Varáveis antropométricas e de composição corporal de indivíduos eutróficos (controle) e pacientes com obesidade (pré-operatório) e após 6 meses de cirurgia bariátrica (pós-operatório)

	Controle (n=24)	Pré-operatório (n=24)	Pós-operatório (n=24)
Peso (Kg)	59,9 $\pm$ 6,8	113,3 $\pm$ 16,3 ^a	86,3 $\pm$ 12,5 ^{a,b}
IMC (Kg/m ²)	22,7 $\pm$ 1,9	43,3 $\pm$ 5,7 ^a	33,1 $\pm$ 4,8 ^{a,b}
CA (cm)	80,8 $\pm$ 7,1	124,7 $\pm$ 14,9 ^a	107,0 $\pm$ 13,5 ^{a,b}
MCM (Kg)	42,1 $\pm$ 6,3	62,8 $\pm$ 6,6 ^a	60,1 $\pm$ 8,0 ^a
MCM (%)	70,1 $\pm$ 4,5	54,1 $\pm$ 6,1 ^a	55,0 $\pm$ 3,8 ^a
MCG (Kg)	18,0 $\pm$ 2,8	51,5 $\pm$ 10,2 ^a	32,2 $\pm$ 8,9 ^{a,b}
MCG (%)	29,9 $\pm$ 4,5	45,7 $\pm$ 5,7 ^a	36,1 $\pm$ 5,9 ^{a,b}

IMC: índice de massa corporal, CA: circunferência abdominal, MCM: massa corporal magra, MCG: massa corporal gorda.

a: $p < 0,05$ em relação ao controle; b: $p < 0,05$ em relação ao pré-operatório.

Os indicadores bioquímicos mostram que pacientes com obesidade antes da cirurgia apresentaram maiores concentrações de glicose, triglicerídeos e menores de HDL-colesterol que o grupo controle. Após 6 meses de cirurgia bariátrica essa diferença se manteve apenas nas concentrações de LDL-colesterol, pois houve redução significativa dos outros indicadores (Tabela 2).

Tabela 2. Indicadores bioquímicos de indivíduos eutróficos (controle) e pacientes com obesidade (pré-operatório) e após 6 meses de cirurgia bariátrica (pós-operatório)

	Controle (n=24)	Pré-operatório (n=24)	Pós-operatório (n=24)
Glicemia (mg/dL)	82,5±9,9	96,1±28,3 ^a	83,6±6,7 ^b
Colesterol total (mg/dL)	185,4±32,6	183,3±37,3	154,2±32,9 ^b
HDL - colesterol (mg/dL)	56,5±15,3	43,9±7,8 ^a	46,4±10,6
LDL - colesterol (mg/dL)	115,1±26,9	111,7±33,9	91,1±25,1 ^{ab}
Triglicérides (mg/dL)	68,8±30,1	126,8±44,2 ^a	78,7±22,1 ^b

HDL: *High Density Lipoprotein* (Lipoproteína de alta densidade), LDL: *Low Density Lipoprotein* (Lipoproteína de baixa densidade), mg: miligramas, dL: decilitro.

a: $p < 0,05$ em relação ao controle; b: $p < 0,05$ em relação ao pré-operatório.

Na Tabela 3 estão apresentados os dados do consumo alimentar. A ingestão de carboidrato e lipídio foi diferente entre os indivíduos com obesidade no pré-operatório e o grupo controle. Houve após a cirurgia, redução da ingestão de macronutrientes (carboidrato, proteína e lipídio), micronutrientes (cálcio, ferro e folato) e, conseqüentemente, da ingestão energética. Ressalta-se que a ingestão de cálcio e ferro do grupo pós-operatório foi menor que no grupo controle.

Tabela 3. Análise de consumo alimentar energético e de macronutrientes de indivíduos eutróficos (controle) e pacientes com obesidade (pré-operatório) e após 6 meses de cirurgia bariátrica (pós-operatório)

	Controle (n=24)	% de pacientes em adequação	Pré-operatório (n=24)	% de pacientes em adequação	Pós-operatório (n=24)	% de pacientes em adequação	EAR
kcal/dia	1768,7±429,4	-	1332,3±366,1 ^a	-	902,8±266,7 ^{ab}	-	-
kcal/kg/dia	29,7±7,7	-	12,0±4,2	-	10,4±3,1	-	-
Carboidrato (g/dia)	218,8±59,2	-	161,8±56,4 ^a	-	104,7±25,6 ^{ab}	-	-
Carboidrato (g/kg/dia)	3,7±1,1	-	1,5±0,6	-	1,2±0,3	-	-
Proteína (g/dia)	74,0±24,2	-	71,0±21,2 ^a	-	52,4±23,4 ^{ab}	-	-
Proteína (g/kg/dia)	1,1±0,3	-	0,4±0,1	-	0,4±0,1	-	-
Lipídio (g/dia)	64,9±20,7	-	46,4±13,5	-	30,1±9,3 ^{ab}	-	-
Lipídio (g/kg/dia)	1,2±0,4	-	0,6±0,2	-	0,6±0,3	-	-
Fibras (g/dia)	10,5±3,1	-	11,9±7,0	-	8,9±3,9	-	-
Ca (mg/dia)	614,8±356,7	21%	687,2±369,5	29%	387,1±159,8 ^{ab}	12%	800
Fe (mg/dia)	9,3±2,4	75%	8,7±2,6	62%	6,7±2,3 ^{ab}	33%	8,1
Vit. B12 (mcg/dia)	3,2±1,9	62%	5,0±4,4	71%	2,7±2,1	46%	2,0
Folato (mcg/dia)	136,0±88,7	12%	157,8±94,8	17%	95,1±35,5 ^b	12%	320

kcal: quilocalorias, kg: quilogramas, mg: miligrama, mcg: micrograma, g: gramas, Ca: Cálcio, Fe: Ferro, Vit. B12: Vitamina B12, RDA: ingestão dietética recomendada, EAR: Necessidade média estimada. a: p<0,05 em relação ao controle; b: p<0,05 em relação ao pré-operatório. (DRIS, 2019).

Na análise de metilação, foram avaliados 476.895 sítios CpGs e foram detectados 499 sítios em genes relacionados ao apetite e saciedade (Figura 5).

Após aplicados os limiares de significância pré-estabelecidos ($\Delta\beta$ mínimo de 5% e p menor que 0,01), comparando indivíduos com obesidade e eutróficos, assim como pré e pós 6 meses da cirurgia bariátrica, observou-se que 5 sítios foram diferencialmente metilados: 4 sítios em genes orexigênicos (*AGRP* - cg02936043 e cg05382012, *GRHL* - cg04924511 e *FTO* - cg00625110) e 1 sítio no gene *POMC* - cg03560973).

Indivíduos com obesidade antes da cirurgia apresentaram maior metilação da cg02936043 no gene *AGRP* quando comparados às mulheres eutróficas. Após a derivação DGYR houve aumento da metilação da cg00625110 no gene *FTO* e cg04924511 no gene *GHRL*. Ainda, após a cirurgia, os níveis de metilação de todas as CpGs foram maiores em comparação ao grupo controle. Dos genes avaliados, observou-se que das cinco CpGs selecionadas três encontravam-se nas regiões promotoras dos genes, com exceção do gene *FTO* e *POMC* (Tabela 4).

Figura 8. Fluxograma das CpGs selecionadas para o estudo

Tabela 4. Análise da metilação de genes relacionados a apetite e saciedade de indivíduos eutróficos (controle) e pacientes com obesidade antes (pré-operatório) e após 6 meses de cirurgia bariátrica (pós-operatório)

Genes	CpG	CHR	Região do Gene	Controle β	Pré- operatório β	Pós- operatório B	$\Delta\beta 1$	$\Delta\beta 2$	$\Delta\beta 3$
Genes Orexigênicos									
<i>AGRP</i>	cg02936043	16	TSS1500	0,53±0,04	0,58±0,06	0,58±0,05	0,06*	0,05*	<0,01
<i>AGRP</i>	cg05382012	16	TSS200	0,41±0,06	0,43±0,06	0,48±0,08	0,17	0,07*	-0,1
<i>GHRL</i>	cg04924511	3	TSS200	0,29±0,07	0,31±0,07	0,37±0,08	0,02	0,08*	0,06*
<i>FTO</i>	cg00625110	16	Corpo do gene	0,34±0,09	0,37±0,07	0,44±0,10	0,03	0,09*	0,07*
Gene Anorexigênico									
<i>POMC</i>	cg03560973	2	5`UTR	0,43±0,05	0,46±0,05	0,48±0,05	0,03	0,05*	0,02

FTO: massa gorda e obesidade associadas; POMC: Proopiomelanocortina; AGRP: Peptídeo relacionado ao Agouti; GHRL: Pré-pró-peptídeo de grelina e obestatina; CHR: Cromossomo; UTR: Untranslated region / Região não traduzida; TSS: Transcription start site / Local de início da transcrição; β : Metilação; $\Delta\beta 1$: Variação da metilação do grupo controle comparado ao pré-operatório; $\Delta\beta 2$: Variação da metilação do grupo controle comparado ao pós-operatório; $\Delta\beta 3$: Variação da metilação do grupo pré-operatório comparado ao pós-operatório; *: $p < 0,05$.

Nas figuras 9 a 12 estão demonstrados os padrões de metilação dos genes cujos sítios foram diferencialmente metilados. Os sítios CpGs foram ordenados de acordo com a sua localização na sequência genética (TSS - local de início da transcrição, 5'UTR e corpo do gene).

A figura 9 mostra os sítios CpGs do gene *AGRP*. A figura 9A mostra a comparação entre os grupos pré cirurgia bariátrica e controle. De 4 sítios diferencialmente metilados, 1 foi hipermetilado no grupo pós cirurgia e 3 no grupo controle, sendo 3 CpGs na região promotora (TSS1500) e 1 no corpo do gene. A figura 9B mostra a comparação entre os grupos pós cirurgia bariátrica e controle, observou-se diferença significativa em 4 sítios CpGs, a metilação do grupo controle foi maior em 1 sítio (corpo do do gene) e menor em 2 sítios na região promotora (TSS1500 e TSS200). Não houve diferenças entre pré e pós cirurgia bariátrica.

A metilação do gene *GHRL* está apresentado na figura 10. A figura 10A mostra a comparação entre os grupos pós cirurgia bariátrica e controle, evidenciando nove sítios diferencialmente metilados, sendo que todos estavam hipometilados no grupo controle, sendo que 3 CpGs estavam na região promotora (TSS1500) e 4 no corpo do gene. A figura 10B mostra a comparação entre os grupos pré e pós cirurgia bariátrica, evidenciando aumento na metilação dos cinco sítios, sendo 2 na região promotora (TSS1500) e 3 no corpo do gene.

A figura 11 mostra a metilação do gene *FTO*. Ao comparar o grupos pós cirurgia bariátrica com o grupo controle observou-se diferença em 3 sítios, sendo que todos estavam mais metilados no grupo pós-operatório e localizavam-se no corpo do gene (figura 11A). A figura 11B mostra a comparação entre os grupos pré e pós cirurgia bariátrica, 6 sítios foram diferentemente metilados, sendo que houve aumento da metilação em 5 deles e diminuição em 1.

Figura 9. Gráficos dos sítios CpGs do gene *AGRP*

Figura 10. Gráficos dos sítios CpGs do gene *GHRL*

Figura 11. Gráficos dos sítios CpGs do gene *FTO*

A figura 12 mostra a análise do gene *POMC*. Na comparação entre os grupos controle e pós cirurgia bariátrica, 6 sítios foram diferencialmente metilados, 5 estavam mais metilados no grupo pós cirurgia e somente em 1 no grupo controle, sendo 1 CpG na região promotora (TSS200) e 5 em região 5'UTR.

Figura 12. Gráficos dos sítios CpGs do gene *POMC*

As análises de correlações da metilação mostraram que a cg02936043 do gene *AGRP*, foi positivamente correlacionada com o peso e negativamente com a ingestão energética (kcal/kg/dia), de carboidratos (g/kg/dia), de proteínas (g/kg/dia) e de lipídeos (g/kg/dia). Não houve correlação dos níveis de metilação e ingestão dos micronutrientes analisados (Ca, Fe, Vitamina B12 e Folato), (Figura 13).

Figura 13. Correlação da metilação da cg02936043 do gene *AGRP* com variáveis antropométricas e consumo alimentar em mulheres com obesidade (pré-operatório)

A Tabela 5 mostra as análises de regressão linear, evidenciando a contribuição dos níveis basais de metilação da cg02936043 no gene *AGRP* no peso e na ingestão energética (kcal/dia) no período pré-operatório. Observou-se que os níveis basais de metilação dessa cg influenciou tanto o peso corporal (Modelo 1) como a ingestão energética (Modelo 2), avaliados separadamente. E a influência no peso se manteve mesmo quando ajustada pela ingestão energética (Modelo 3). Houve correlação positiva da metilação dessa cg com peso (Figura 14).

Tabela 5. Análise de regressão linear mostrando a contribuição dos níveis basais de metilação da cg02936043 do gene *AGRP* no peso e na ingestão energética em mulheres com obesidade (pré-operatório)

	r^2	β	p
Modelo 1	0,395	0,629	0,001
Modelo 2	0,178	-0,422	0,005
Modelo 3	0,438	0,563	0,001

r^2 : coeficiente de determinação; $p < 0,05$; Modelo 1: regressão linear simples mostrando a contribuição dos níveis de metilação da cg 02936043 no gene *AGRP* no peso corporal (kg). Modelo 2: regressão linear simples mostrando a contribuição dos níveis de metilação da cg02936043 no gene *AGRP* na ingestão energética (kg). Modelo 3: regressão linear ajustada pela ingestão energética mostrando a contribuição dos níveis de metilação da cg 02936043 no gene *AGRP* no peso (kg).

Figura 14. Correlação da metilação da cg02936043 do gene *AGRP* com peso em mulheres pós cirurgia bariátrica

Análise de regressão linear do gene *AGRP* mostrou que não houve contribuição dos níveis basais de metilação da cg02936043 no peso (Tabela 6).

Tabela 6. Contribuição dos níveis basais de metilação da cg02936043 do gene *AGRP* no peso em mulheres com obesidade (pós-operatório)

	r^2	β	p
Modelo 1	0,061	0,001	0,159

r^2 : coeficiente de determinação; $p < 0,05$; IC: Intervalo de confiança; Modelo 1: regressão linear simples mostrando a contribuição dos níveis de metilação da cg 02936043 no gene *AGRP* no peso corporal (kg).

Observou-se que a cg05382012 do gene *AGRP* foi positivamente correlacionada com peso e negativamente com a ingestão energética (kcal/kg/dia) e de carboidratos (g/kg/dia). Não houve correlação com a ingestão dos micronutrientes analisados (Figura 15).

Figura 15. Correlação da metilação da cg05382012 do gene *AGRP* com variáveis antropométricas e consumo alimentar em mulheres com obesidade (pré-operatório)

Não houve influência dos níveis basais de metilação da cg05382012 do gene *AGRP* no peso e na ingestão energética de mulheres com obesidade (pré-operatório) (Tabela 7).

Tabela 7. Contribuição dos níveis basais de metilação da cg05382012 do gene *AGRP* no peso e na ingestão energética em mulheres com obesidade (pré-operatório)

	r^2	β	P
Modelo 1	0,108	0,356	0,014
Modelo 2	0,144	-0,413	0,015
Modelo 3	0,295	0,066	0,686

r^2 : coeficiente de determinação; $p < 0,05$; IC: Intervalo de confiança Modelo 1: regressão linear simples dos níveis de metilação da cg 02936043 no gene *AGRP* no peso corporal (kg). Modelo 2: regressão linear simples dos níveis de metilação da cg02936043 no gene *AGRP* na ingestão energética (kg). Modelo 3: regressão linear ajustada pela ingestão energética dos níveis de metilação da cg 02936043 no gene *AGRP* no peso (kg).

Observou-se correlação negativas entre a metilação da cg04924511 do gene *GHRL* com a ingestão energética (kcal/kg/dia) e de carboidratos (g/kg/dia) (Figura 16).

Figura 16. Correlação da metilação da cg04924511 do gene *GHRL* com a ingestão energética e de carboidratos em mulheres com obesidade (pré-operatório)

A Figura 17 mostra correlações entre a metilação da cg03560973 do gene *POMC* com as variáveis antropométricas e consumo alimentar, evidenciando correlação positiva com o peso em quilogramas (kg) e negativa com a ingestão energética (kcal/kg/dia) e de carboidratos (g/kg/dia). Não houve correlação com a ingestão dos micronutrientes analisados (Ca, Fe, Vitamina B12 e Folato).

Figura 17. Correlação da metilação da cg03560973 do gene *POMC* com variáveis antropométricas e consumo alimentar em mulheres com obesidade (pré-operatório)

Na Tabela 8 está apresentada a análise de regressão linear múltipla mostrando a contribuição dos níveis basais de metilação da cg03560973 do gene *POMC* no peso e na ingestão energética no período pré-operatório. Observou-se que os níveis basais de metilação dessa CpG influenciaram tanto o peso corporal (Modelo 1) como a ingestão energética (Modelo 2). Entretanto, isso não foi evidenciado ajustado pela ingestão energética (Modelo 3).

Tabela 8. Contribuição dos níveis de metilação da cg03560973 do gene *POMC* no peso e na ingestão energética em mulheres com obesidade (pré-operatório)

	r^2	β	P
Modelo 1	0,301	0,549	0,001
Modelo 2	0,230	-0,479	0,004
Modelo 3	0,355	0,280	0,089

r^2 : coeficiente de determinação; $p < 0,05$; IC: Intervalo de confiança; Modelo 1: regressão linear simples mostrando a contribuição dos níveis de metilação da cg 03560973 no gene *POMC* no peso corporal (kg). Modelo 2: regressão linear simples mostrando a contribuição dos níveis de metilação da cg03560973 no gene *POMC* na ingestão energética (kg). Modelo 3: regressão linear ajustada pela ingestão energética mostrando a contribuição dos níveis de metilação da cg 03560973 no gene *POMC* no peso (kg).

Não houve correlações entre a metilação da cg00625110 do gene *FTO* com as variáveis antropométricas, composição corporal e consumo alimentar.

A análise de expressão gênica do gene *FTO* no grupo controle, antes e após a intervenção cirúrgica, mostrou menor expressão no grupo controle comparado ao pós-operatório ($p=0,042$) (Figura 18).

Figura 18. Expressão relativa do gene *FTO* em mulheres eutróficas (controle) e pacientes antes e após seis meses do procedimento cirúrgico

FTO: (do inglês: massa gorda e obesidade associadas)

Entretanto, ao avaliar a expressão relativa de cada paciente após seis meses do procedimento cirúrgico, observou-se perfis diferentes de acordo com a magnitude da expressão gênica. Pacientes foram subdivididos em dois grupos levando em consideração que, expressão relativa maior que 1 significa que teve aumento, e expressão relativa menor que 1 significa que baixou em relação ao pré operatório. Desse modo, observou-se diferenças na expressão entre os pacientes pré e pós seis meses do procedimento cirúrgico (figura 19).

Figura 19. Expressão gênica relativa de genes associada ao apetite e saciedade em pacientes antes e após seis meses do procedimento cirúrgico

FTO (do inglês: massa gorda e obesidade associadas); **< expressão**: grupo cuja expressão gênica foi diminuída no período pós operatório; **> expressão**: grupo cuja expressão gênica foi aumentada no período pós operatório.

A Tabela 9 mostra a análise de regressão linear simples da contribuição dos níveis de metilação dos sítios CpGs diferencialmente metilados do gene *FTO* na expressão gênica no período pós-operatório. Os sítios analisados foram os que apresentaram $p < 0,05$ na Figura 11B. No modelo final, foi aplicada a análise de regressão linear múltipla, que mostrou a contribuição de dois sítios CpGs

(cg00625110 e cg26651810) na expressão gênica, e apresentaram influência mais forte quando analisados conjuntamente.

Tabela 9. Influência dos níveis de metilação do gene *FTO* na expressão gênica em mulheres com obesidade (pós-operatório)

	r^2	β	p
cg01485549	0,275	-1,057	0,029
cg00625110	0,314	-1,142	0,019
cg04036070	0,299	-1,890	0,023
cg01986630	0,261	-0,0214	0,034
cg26651810	0,312	-1,997	0,019
Modelo final:			
cg00625110 +	0,331	-1,213	0,029
cg26651810		-2,126	

r^2 : coeficiente de determinação; $p < 0,05$; Modelo final: regressão multivariada

Discussão

6. DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou que pacientes submetidas a cirurgia bariátrica apresentaram redução dos parâmetros antropométricos e bioquímicos, assim como da ingestão calórica e de macronutrientes. Além disso, a intervenção cirúrgica foi capaz de influenciar o padrão de metilação do DNA de genes relacionados com a via do apetite/saciedade e de expressão do gene *FTO*.

O número crescente de indivíduos com obesidade, juntamente com o insucesso das intervenções clínicas no tratamento da doença faz com que a cirurgia bariátrica seja cada vez mais reconhecida como uma das mais eficazes, para alcançar perda de peso significativa, bem como a melhora do controle metabólico (HENKEL *et al.*, 2017; LE ROUX; HENEGHAN, 2018). Inicialmente, acreditava-se que a perda de peso provocada pela cirurgia bariátrica fosse causada somente pela restrição da ingestão alimentar e má absorção, mas hoje já se hipotetiza sobre a importância do controle neuroendócrino da ingestão alimentar que exerce sua ação por meio de vias de apetite e saciedade (MULLA; MIDDELBEEK; PATTI, 2018). Estudo recente mostra que alterações anatômicas e fisiológicas promovidas pelo processo cirúrgico podem explicar o maior sucesso na manutenção da perda de peso em longo prazo pela DGYR em comparação com aqueles que perdem peso apenas com restrição calórica (HALLIDAY *et al.*, 2019).

Neste estudo, as pacientes apresentaram perda média de peso de 27 kg, equivalente a 23,8% do peso inicial, corroborando com os dados obtidos por Ivaska *et al.* (2017) e Viljanen *et al.* (2018), os quais observaram, após seis meses da DGYR, redução de 22,9% e 22,8% do peso, respectivamente. Estudo recente também mostrou redução de 26% do peso inicial após 6 meses da cirurgia bariátrica, porém esta foi realizada pela técnica de Gastrectomia Vertical Laparoscópica (GVL) (BEISANI *et al.*, 2019). Os achados relacionados a perda de peso equivalem a uma redução de 23,6% do IMC, corroborando com outros autores que revelaram redução de 26% (BEISANI *et al.*, 2019) e 21% dessa variável (BERISHA *et al.*, 2011).

Evidências sustentam que a perda de peso apenas por restrição calórica aumenta as sensações de apetite, relacionadas aos múltiplos estímulos orexigênicos, que em conjunto poderiam favorecer a recuperação do peso (HINTZE *et al.*, 2017). Jakubowicz *et al.* (2012) mostraram que, durante os primeiros 6 meses de tratamento com dieta hipocalórica em indivíduos com obesidade, houve uma perda significativa

do peso corporal; no entanto, após 6 meses, os autores observaram um aumento de 16% no peso.

Em relação à análise da composição corporal, observou-se que, além da perda de peso, houve redução de MCG (19,3 kg). Dados semelhantes foram observados no estudo de Crisp *et al.* (2018), que evidenciaram similar redução de MCG (24,7 kg). Nossos dados mostram que a perda de massa corporal gorda foi a principal contribuinte para a redução da massa corporal.

Houve redução média de 17,7 cm da circunferência abdominal após a DGYR. Estudos prévios evidenciaram redução média de 26,4 cm (CHIAPPETTA *et al.*, 2018), assim como Heffron *et al.* (2018) apontaram redução de 24 cm após seis meses do procedimento cirúrgico. Entretanto, a redução alcançada no presente estudo não foi suficiente para atingir o padrão recomendado da circunferência abdominal (≤ 80 cm) para mulheres, pensando na prevenção do risco de doenças cardiovasculares, associado aos riscos de complicações metabólicas (ABESO, 2016).

Com relação às análises dos indicadores bioquímicos, observou-se que pacientes com obesidade no pré-operatório apresentaram valores significativamente menores de HDL colesterol e maiores de glicemia e triglicérides em comparação ao grupo de mulheres eutróficas. A DGYR propiciou redução das concentrações séricas de glicose, colesterol total, LDL-colesterol e triglicérides. Os dados corroboram com a literatura, que sugere melhora de parâmetros bioquímicos associados à perda de peso após DGYR (COPPEDE *et al.*, 2019; LIASKOS *et al.*, 2018).

Estudos prévios abordaram a importância da melhora dos indicadores bioquímicos para a diminuição do risco de doenças cardiometabólicas (OUYANG *et al.*, 2015; SCHMATZ *et al.*, 2017). De acordo com Beisani *et al.* (2019), após 6 meses, houve melhora na sensibilidade à insulina de indivíduos submetidos à cirurgia bariátrica. Esses resultados estão de acordo com outros estudos que demonstraram que após a cirurgia bariátrica há controle da glicemia de forma efetiva e segura, devido a redução da ingestão alimentar, aumento na secreção de incretinas no trato gastrointestinal, e por seu efetivo estímulo para a perda de peso (SALA *et al.*, 2014; SCHMATZ *et al.*, 2017).

Ainda, devido à diminuição da capacidade gástrica e desvios intestinais realizados nos procedimentos cirúrgicos, nos quais há inúmeros sítios absorptivos de nutrientes, ocorrem como consequência alterações hormonais gastrointestinais e peptídicas, levando a má absorção de nutrientes e podendo, a longo prazo, contribuir

para complicações de deficiências nutricionais, principalmente vitaminas e minerais (FALKÉN *et al.*, 2011; RUBINO *et al.*, 2006; SANDOVAL, 2011).

O consumo habitual de calorias, carboidratos, proteínas e lipídios de mulheres com obesidade foi menor que do grupo controle. Esses dados são contraditórios aos indicadores antropométricos destas pacientes e a possível explicação é o sub relato nos recordatórios alimentares, que corroboram com dados prévios de Nonino-Borges *et al.* (2007) os quais mostraram que, ao oferecer um esquema alimentar de 2.500 kcal/dia para as pacientes que participaram de um programa de perda de peso, houve perda ponderal mesmo com relato alimentar fora do ambiente hospitalar de 2.110 kcal/dia. Estudo mais recente reforça que em pacientes com obesidade, o relato de ingestão de energia é incompatível com o excesso de peso corporal apresentado (AVELINO *et al.*, 2014).

Em relação ao consumo alimentar, foi identificada redução na ingestão calórica e de macronutrientes após 6 meses da DGYR. Foi possível observar uma redução média de 429,5 kcal/dia, considerada baixa quando comparada com estudo de Odstroil *et al.* (2010), no qual os autores mostraram reduções na ingestão de 1418 a 2062 kcal/dia em 5 a 14 meses após a DGYR.

A ingestão de micronutrientes tem sido um ponto de investigação de mecanismos epigenéticos, em especial a metilação do DNA (ANDERSON; SANT; DOLINOY, 2012). Nesse caso, é reconhecido que o processo de metilação está diretamente relacionado com influências nutricionais e ambientais. O principal doador metil para a metilação do DNA é a S-adenosilmetionina (SAM), uma espécie gerada no processo celular cíclico chamado metabolismo de carbono um. Que é catalisado por várias enzimas na presença de micronutrientes dietéticos, incluindo minerais e vitaminas, principalmente as do complexo B: B9 e B12 (CHENG; ZHENG; ALMEIDA, 2018).

Estudos mostraram a relação dos fatores nutricionais da dieta como polifenóis, minerais e vitaminas com os mecanismos epigenéticos; no caso da metilação, como doadores do grupo metil (CHENG; ZHENG; ALMEIDA, 2018; REMELY *et al.*, 2015). No entanto, neste estudo, nenhum dos micronutrientes analisados (Ca, Fe, B9 (folato) e B12) influenciaram significativamente na metilação dos genes *AGRP*, *GHRL*, *FTO* e *POMC*.

Nossos dados mostraram maiores níveis de metilação de CpGs específicas em genes orexigênicos (*AGRP*, *GHRL* e *FTO*) no grupo pré DGYR em relação ao grupo

controle. Maiores níveis de metilação podem estar relacionados com menores níveis de expressão, principalmente quando a modificação epigenética ocorre na região promotora do gene. Isso pode ser decorrente de falhas nos mecanismos transcricionais, que vão desde o bloqueio dos ativadores da transcrição até o recrutamento de co-repressores que alteram a estrutura da cromatina (HERRERA; KEILDSON; LINDGREN, 2011).

Os sítios CpGs (cg02936043 e cg05382012) do gene *AGRP* foram mais metilados em pacientes com obesidade comparado ao controle, no entanto, as duas CpGs apresentaram comportamentos distintos comparado ao controle: a cg02936043 apresentou-se mais metilada em pacientes com obesidade somente no período pós-operatório comparado ao controle, já a cg05382012 observou-se diferença significativa antes e após 6 meses da cirurgia. No entanto, ao analisar os sítios de forma pontual, pelo valor M, foram encontradas mais diferenças significativas.

Evidenciou-se nesse estudo correlação positiva da metilação da cg02936043 do gene *AGRP* com o peso (kg) e correlação negativa da metilação com ingestão energética (kcal/kg/dia), de carboidratos (g/Kg/dia), de proteínas (g/Kg/dia) e de lipídeos (g/Kg/dia). A análise de regressão linear múltipla mostrou que os níveis basais de metilação da cg02936043 do gene *AGRP* influenciaram tanto o peso corporal como a ingestão energética e sua contribuição no peso se confirmou mesmo quando ajustado pela ingestão energética. Mais estudos utilizando estratégias *downstream* como expressão gênica e expressão de proteínas, podem elucidar o papel da cg02936043 no contexto geral. No momento pós-operatório não foram observadas as mesmas relações do período pré, esse resultado sugere que a influência do perfil de metilação é diferente antes e após a cirurgia.

As correlações da metilação da cg05382012 do gene *AGRP* com as variáveis antropométricas, de composição corporal e consumo alimentar apresentaram o mesmo comportamento do sítio CpG anterior no mesmo gene. Por outro lado, não foi observada associação entre os níveis basais de metilação no peso e na ingestão energética.

A hipermetilação do gene *GHRL* após a cirurgia bariátrica encontrada no presente estudo, não corrobora com achados da literatura. Em um estudo recente, realizado em 35 pacientes submetidos a cirurgia bariátrica pela técnica de gastrectomia vertical e 33 indivíduos eutróficos, os autores destacaram que as quatro CpGs estudadas na região promotora do gene *GHRL* seguiram o mesmo padrão de

metilação, sem diferença significativa entre os períodos pré e seis meses pós-operatório (BEISANI *et al.*, 2019), contrário ao nosso estudo, em que houve aumento da metilação no pós-operatório em cinco CpGs, sendo duas na região promotora. Já estudo de Coppedè *et al.* (2019) mostrou uma ampla variabilidade individual no padrão de metilação do gene *GHRL* (região promotora) após um ano da DGYR; contudo, sem diferença significativa. Com tais achados, esses autores evidenciaram que nenhuma das CpGs estudadas poderiam funcionar como um biomarcador efetivo na resposta ao procedimento DGYR. Entretanto, ressalta-se que nesse estudo houve uma correlação negativa da metilação do gene *GHRL* com massa magra (%), ingestão energética (kcal/kg/dia) e de carboidratos (g/Kg/dia), e por ele estar envolvido em resposta ao apetite, esperava-se que, quanto menor a metilação, maior a ingestão.

Com relação ao gene *FTO*, observou-se maior metilação no grupo pós DGYR em relação aos grupos controle e pré-operatório. Considerando que o gene *FTO* está fortemente correlacionado com o aumento de IMC e adiposidade (RAMOS *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2013) e da obesidade de um modo geral nos seres humanos (FRAYLING *et al.*, 2007; GERKEN *et al.*, 2007; LLEWELLYN *et al.*, 2014), estima-se a associação desse gene com controle do apetite. Isso explica o fato de a expressão gênica ser maior nas mulheres com obesidade em relação às mulheres do grupo controle, como observado em nosso estudo. Diferentemente, estudo realizado por Beisani *et al.* (2019) mostrou maior expressão do gene *FTO* no grupo controle comparado ao grupo pré cirurgia bariátrica, não diferindo após 6 meses da cirurgia.

O *FTO* e o *GHRL* foram os únicos genes que apresentaram sítio diferencialmente metilados quando comparado pré com pós operatório. Para complementar fez-se análise da expressão somente do gene *FTO* para verificar relação com a metilação do DNA, a escolha do gene foi feita com base no estudo de Karra e colaboradores (2013), que mostraram que o *FTO* é um importante regulador da grelina. A maioria dos sítios CpGs localizaram-se em regiões promotoras do gene, no entanto também aparecem no corpo do gene e podem assim atuar como promotores alternativos (SAXONOV; BERG; BRUTLAG, 2006). As associações mostradas nesse estudo evidenciaram que dois sítios CpG tiveram maior influência na expressão gênica deste alvo: cg00625110 e cg26651810.

Já em relação às alterações no padrão de metilação do gene *POMC*, o qual está relacionado com maior saciedade, observou-se maior metilação em mulheres com obesidade após cirurgia bariátrica em relação às mulheres do grupo controle,

além disso todas as alterações significativas foram na região inicial do gene (região promotora e 5'UTR).

Ressalta-se que houve correlação positiva da metilação da cg03560973 do gene *POMC* com o peso, circunferência abdominal e massa gorda (%). Dados que corroboram com a literatura, a qual mostra que esse gene é crucial para o controle neuroendócrino em resposta à saciedade. Assim, acredita-se que, quanto maior a metilação, menor o controle da saciedade e, conseqüentemente, maior peso, circunferência abdominal e massa gorda (CRUJEIRAS *et al.*, 2013; CRUJEIRAS *et al.*, 2015; VELÁZQUEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2017).

Por outro lado, diferentemente do que era esperado, foi observada correlação negativa entre a metilação da cg03560973 *POMC* com a ingestão energética (kcal/kg/dia) e de carboidratos (g/Kg/dia). Esse dado reforça o estudo de Crujeiras *et al.* (2015), segundo o qual as funções anorexigênicas de um gene não são suficientes para suprimir totalmente o apetite, devido a outros mecanismos de sinalização, como a resistência a leptina, que já está bem estabelecida. Assim, pode-se justificar a recuperação de peso dos indivíduos obesos a longo prazo.

Além disso, a análise de regressão linear múltipla mostrou que os níveis de metilação do sítio cg03560973 influenciou tanto o peso corporal como a ingestão energética. Entretanto, quando o modelo foi ajustado pela ingestão energética, a metilação deixou de ter efeito no peso. Sugere-se que a perda de peso sofra uma maior influência da ingestão alimentar do que da metilação do gene *POMC*.

A literatura tem mostrado que a principal preocupação com relação aos estudos nessa área refere-se à escolha dos sítios CpGs em regiões relevantes no gene (LI *et al.*, 2016), no entanto nosso estudo mostrou que mesmo níveis de metilação em regiões não promotoras apresentaram efeito na expressão gênica e também nas variáveis clínicas. E, de acordo com Coppedè *et al.* (2019), os dados existentes até o presente momento não permitem afirmar que os níveis de metilação estejam envolvidos na regulação do apetite e saciedade. Mais estudos precisam ser conduzidos para elucidar o papel da metilação do DNA nos genes de apetite e saciedade e os desfechos relacionados a DGYR. Inclusive avaliações com mais de 6 meses de pós operatório podem elucidar melhor as associações observadas. Uma vez que a maioria das pacientes continuavam na faixa classificatória de obesidade, isso poderia ser uma justificativa para a fragilidade dos achados nos modelos de regressão.

Recente revisão bibliográfica mostrou a importância de haver mais estudos intervencionais entre a metilação do DNA e a obesidade, visto que a maioria dos estudos são de associação, correlacionando a metilação do DNA com resultados fenotípicos (SAMBLAS; MILAGRO; MARTÍNEZ, 2019). Estudos são necessários para elucidar os mecanismos moleculares nos quais a metilação do DNA e a obesidade estão ligadas. Dessa forma, o entendimento da regulação transcricional de genes que participam da via apetite/saciedade, é crucial para compreender a fisiopatologia da doença, visto que alterações no padrão de metilação do DNA dos genes podem contribuir para modificar a expressão e modular funções em importantes vias metabólicas.

Conclusão

7. CONCLUSÃO

Em conclusão, a DGYR é capaz de promover melhora na composição corporal e nos indicadores bioquímicos em mulheres com obesidade. O consumo alimentar relatado por essas pacientes não é condizente com os dados antropométricos, evidenciando um sub relato dessas pacientes.

Após seis meses do procedimento cirúrgico é possível observar alteração no padrão de metilação de genes envolvidos com apetite e saciedade. Além disso, existem diferenças no padrão de metilação entre mulheres eutróficas e mulheres com obesidade.

Após 6 meses da intervenção cirúrgica foi verificada alteração na expressão do gene FTO; houve dois padrões distintos, sendo que alguns indivíduos tiveram aumento e outros diminuição da expressão, mostrando que não existe um padrão epigenético associado à doença ou desfecho de intervenção, mas que os fatores genéticos, ambientais e fisiológicos interagem entre si.

Assim, nossos resultados sugerem que a regulação da metilação dos genes analisados, pode influenciar a ingestão alimentar, fator que contribui para a perda de peso após a DGYR.

Referências

REFERÊNCIAS

- AHIMA, R. S.; ANTWI, D. A. Brain regulation of appetite and satiety. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v. 37, n. 4, p. 811-823, 2008.
- ALVAREZ-LEITE, J. I.; SOARES, F. L. P.; TEIXEIRA, L. G. Controle neuroendócrino da saciedade. *In*: ORIÁ, R. B.; BRITO, G. A. C. (org.). **Sistema digestório: integração básico-clínica**. São Paulo: Edgard Blucher, 2016. p. 389-409.
- ANDERBERG, R. H. *et al.* Glucagon-like peptide-1 and its analogs act in the dorsal raphe and modulate central serotonin to reduce appetite and body weight. **Diabetes**, v. 66, n. 4, p. 1062-1073, abr. 2017.
- ANDERSON, O. S.; SANT, K. E.; DOLINOY, D. C. Nutrition and epigenetics: an interplay of dietary methyl donors, one-carbon metabolism and DNA methylation. **J Nutr Biochem**, v. 23, n. 8, p. 853-859, 2012.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA OBESIDADE E DA SÍNDROME METABÓLICA (ABESO). **Diretrizes brasileiras de obesidade 2009/2010**. 3. ed. Itapevi, SP: AC Farmacêutica, 2009.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA OBESIDADE E DA SÍNDROME METABÓLICA (ABESO). **Diretrizes brasileiras de obesidade 2016**. 4. ed. São Paulo: Banca de Conteúdo, 2016.
- ATTWOOD, J. T.; YUNG, R. L.; RICHARDSON, B. C. DNA methylation and the regulation of gene transcription. **Cell Mol Life Sci**, v. 59, n. 2, p. 241-257, 2002.
- AVELINO, G. F. *et al.* Sub-relato da ingestão energética e fatores associados em estudo de base populacional. **Cad Saúde Pública**, v. 30, n. 3, p. 663-668, 2014.
- BANERJEE, A.; HEIDEN, E. Obesity and the effects on the respiratory system. *In*: WEAVER, J. U. **Practical Guide to Obesity Medicine**. [S. l.]: Elsevier, 2018. p. 109-121.
- BARKHOLT, P. *et al.* Alterations in hypothalamic gene expression following Roux-en-Y gastric bypass. **Mol Metab**, v. 5, n. 4, p. 296-304, 2016.
- BASTIEN, M. *et al.* Overview of epidemiology and contribution of obesity to cardiovascular disease. **Prog Cardiovasc Dis**, v. 56, n. 4, p. 369-381, jan./fev. 2014.
- BEISANI, M. *et al.* Laparoscopic sleeve gastrectomy induces molecular changes in peripheral white blood cells. **Clin Nutr**, 2019.
- BELL, C. G.; WALLEY, A. J.; FROGUEL, P. The genetics of human obesity. **Nat Rev Genet**, v. 6, n. 3, p. 221-234, 2005.

BELLAR, A.; JAROSZ, P. A.; BELLAR, D. Implications of the biology of weight regulation and obesity on the treatment of obesity. **J Am Acad Nurse Pract**, v. 20, n. 3, p. 128-135, 2008.

BERISHA, S. Z. *et al.* Changes in whole blood gene expression in obese subjects with type 2 diabetes following bariatric surgery: a pilot study. **PloS one**, v. 6, n. 3, e16729, 2011.

BERTHOUD, H. R.; SHIN, A. C.; ZHENG, H. Obesity surgery and gut-brain communication. **Physiol Behav**, v. 105, n. 1, p. 106-119, 2011.

BIBIKOVA, M.; FAN, J. B. GoldenGate assay for DNA methylation profiling. **Methods Mol Biol**, v. 507, p. 149-163, 2009.

BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes Dev**, v. 16, n. 1, p. 6-21, 2002.

BOUCHARD, C.; PÉRUSSE, L. Genetics of Obesity. **Annu Rev Nutr**, v. 13, p. 337-354, 1993.

BOUCHARD, L. *et al.* Differential epigenomic and transcriptomic responses in subcutaneous adipose tissue between low and high responders to caloric restriction. **Am J Clin Nutr**, v. 91, n. 2, p. 309-320, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigitel Brasil 2018: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico**. Brasília: Ministério da Saúde, 2019. Disponível em: <http://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/julho/25/vigitel-brasil-2018.pdf>. Acesso em: 10 agosto 2019.

BRAY, G. A. *et al.* Management of obesity. **Lancet**, v. 387, n. 10031, p. 1947-1956, maio 2016.

BUCHWALD, H. *et al.* Bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. **Jama**, v. 292, n.14, p. 1724-1737, out. 2004.

CARSWELL, K. A. *et al.* The effect of bariatric surgery on intestinal absorption and transit time. **Obes Surg**, v. 24, n. 5, p. 796-805, 2014.

CAZZO, E.; RAMOS, A. C.; CHAIM, E. A. Bariatric surgery offer in Brazil: a macroeconomic analysis of the health system's inequalities. **Obes Surg**, v. 29, n. 6, p. 1874-1880, 2019.

CHENG, Z.; ZHENG, L.; ALMEIDA, F. A. Epigenetic reprogramming in metabolic disorders: nutritional factors and beyond. **J Nutr Biochem**, v. 54, p. 1-10, 2018.

CHIAPPETTA, S. *et al.* The impact of obesity and metabolic surgery on chronic inflammation. **Obes Surg**, v. 10, p. 3028-3040, 2018.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal Biochem**, v. 162, n. 1, p. 156-159, 1987.

COPPEDÈ, F. *et al.* DNA methylation of genes regulating appetite and prediction of weight loss after bariatric surgery in obese individuals. **J Endocrinol Invest**, v. 42, n. 1, p. 37-44, 2019.

CRISP, A. H. *et al.* Changes in physical activities and body composition after Roux-Y gastric bypass surgery. **Obes Surg**, v. 28, n. 6, p. 1665-1671, 2018.

CRUJEIRAS, A. B. *et al.* Association of weight regain with specific methylation levels in the NPY and POMC promoters in leukocytes of obese men: a translational study. **Regul Pept**, v. 186, p. 1-6, set. 2013.

CRUJEIRAS, A. B. *et al.* Leptin resistance in obesity: an epigenetic landscape. **Life Sci**, v. 140, p. 57-63, 2015.

DAILEY, M. J.; MOGHADAM, A. A.; MORAN, T. H. Jejunal linoleic acid infusions require GLP-1 receptor signaling to inhibit food intake: implications for the effectiveness of Roux-en-Y gastric bypass. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 301, n. 6, p. e1184-e1190, dez. 2011.

DALVI, P. S. *et al.* High fat induces acute and chronic inflammation in the hypothalamus: effect of high-fat diet, palmitate and TNF- α on appetite-regulating NPY neurons. **Int J Obes (Lond)**, v. 41, n. 1, p.149-158, 2016.

DAMIANI, D.; DAMIANI, D. Sinalização cerebral do apetite. **Rev Bras Clin Med**, v. 9, n. 2, p. 138-145, mar./abr. 2011.

DAVÉ, V. *et al.* Relationship between expression and methylation of obesity-related genes in children. **Mutagenesis**, v. 30, n. 3, p. 411-420, 2015.

DEANS, C.; MAGGERT, K. A. What do you mean, “epigenetic”? **Genetics**, v. 199, n. 4, p. 887-896, 2015.

DEITEL, M. Overweight and obesity worldwide now estimated to involve 1.7 billion people. **Obes Surg**, v. 13, n. 3, p. 329-330, jun. 2003.

DU, P. *et al.* Comparison of Beta-value and M-value methods for quantifying methylation levels by microarray analysis. **BMC Bioinformatics**, v. 11, n. 1, p. 587, 2010.

FALKÉN, Y. *et al.* Changes in glucose homeostasis after roux-en-Y gastric bypass surgery for obesity at day three, two months, and one year after surgery: role of gut peptides. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 96, n. 7, p. 2227-2235, 2011.

FAN, S.; ZHANG, X. Padrão de metilação da ilha CpG em diferentes tecidos humanos e sua correlação com a expressão gênica. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 383, n. 4, p. 421-425, 2009.

FINGERET, M.; MARQUES-VIDAL, P.; VOLLENWEIDER, P. Incidence of type 2 diabetes, hypertension, and dyslipidemia in metabolically healthy obese and non-obese. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v. 28, n. 10, p. 1036-1044, 2018.

FINKELSTEIN, E. A. *et al.* Obesity and severe obesity forecasts through 2030. **Am J Prev Med**, v. 42, n. 6, p. 563-570, jun. 2012.

FLIER, J. S. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 337-350, jan. 2004.

FRAYLING, T. M. *et al.* A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. **Science**, v. 316, n. 5826, p. 889-894, 2007.

FRIED, M. *et al.* Interdisciplinary european guidelines on metabolic and bariatric surgery. **Obes Facts**, v. 6, n. 5, p. 449-468, out. 2013.

GERKEN, T. *et al.* The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. **Science**, v. 318, n. 5855, p. 1469-1472, 2007.

GODOY, C. M. A. **Tolerância alimentar após derivação gástrica em Y de Roux: avaliação da abordagem integrada e interdisciplinar.** 2013. 64 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

GOLDSTONE, A. P. *et al.* Link between increased satiety gut hormones and reduced food reward after gastric bypass surgery for obesity. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 101, n. 2, p. 599-609, fev. 2016.

GOLZARAND, M.; TOOLABI, K.; DJAFARIAN, K. Changes in Body Composition, Dietary Intake, and Substrate Oxidation in Patients Underwent Laparoscopic Roux-en-Y Gastric Bypass and Laparoscopic Sleeve Gastrectomy: a Comparative Prospective Study. **Obes Surg**, v. 29, n. 2, p. 406-413, fev. 2019.

GRIBBLE, F. M. The gut endocrine system as a coordinator of postprandial nutrient homeostasis. **Proc Nutr Soc**, v. 71, n. 4, p. 456-462, 2012.

GRUNDBERG, E. *et al.* Global analysis of DNA methylation variation in adipose tissue from twins reveals links to disease-associated variants in distal regulatory elements. **Am J Hum Gen**, v. 93, n. 5, p. 876-890, 2013.

HALLIDAY, T. M. *et al.* Comparison of surgical versus diet-induced weight loss on appetite regulation and metabolic health outcomes. **Physiol Rep**, v. 7, n. 7, e14048, 2019.

HAQQ, A. M. *et al.* Serum ghrelin levels are inversely correlated with body mass index, age, and insulin concentrations in normal children and are markedly increased in Prader-Willi syndrome. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 88, n. 1, p. 174-178, 2003.

HEFFRON, S. P. *et al.* Changes in high-density lipoprotein cholesterol efflux capacity after bariatric surgery are procedure dependent. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 38, n. 1, p. 245-254, 2018.

HENKEL, D.S. *et al.* Trends in the prevalence of severe obesity and bariatric surgery access: a state-level analysis from 2011 to 2014. **Journal of Laparoendoscopic & Advanced Surgical Techniques and Videoscopy**, v. 27, n. 7, p. 669-675, 2017.

HERRERA, B. M.; KEILDSON, S.; LINDGREN, C. M. Genetics and epigenetics of obesity. **Maturitas**, v. 69, n. 1, p. 41-49, 2011.

HINNEY, A.; VOLCKMAR, A. L.; ANTEL, J. Genes and the hypothalamic control of metabolism in humans. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, v. 28, n. 5, p. 635-647, out. 2014.

HINTZE, L. J. *et al.* Weight loss and appetite control in women. **Curr Obesity Rep**, v. 6, n. 3, p. 334-351, 2017.

HORVATH, T. L. *et al.* Minireview: ghrelin and the regulation of energy balance - a hypothalamic perspective. **Endocrinology**, v. 142, n. 10, p. 4163-4169, 2001.

IVASKA, K. K. *et al.* Changes in bone metabolism after bariatric surgery by gastric bypass or sleeve gastrectomy. **Bone**, v. 95, p. 47-54, 2017.

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. 243-249, 1998.

JAKUBOWICZ, D. *et al.* Meal timing and composition influence ghrelin levels, appetite scores and weight loss maintenance in overweight and obese adults. **Steroids**, v. 77, n. 4, p. 323-231, 2012.

KAIRUPAN, T. S. *et al.* Role of gastrointestinal hormones in feeding behavior and obesity treatment. **J Gastroenterol**, v. 51, n. 2, p. 93-103, 2016.

KAPUT, J.; RODRIGUEZ, R. L. **Nutritional genomics**: discovering the path to personalized nutrition. Hoboken: Wiley, 2006.

KARRA, E. *et al.* A link between FTO, ghrelin, and impaired brain food-cue responsivity. **J Clin Invest**, v. 123, n. 8, p. 3539-3551, 2013.

KENNEDY, G. C. The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. **Proc R Soc Lond B Biol Sci**, v. 140, n. 901, p. 578-596, jan. 1953.

KULIS, M.; ESTELLER, M. DNA methylation and cancer. **Advances in genetics**, v. 70, p. 27-56, 2010.

KULKARNI, K. *et al.* Obesity and osteoarthritis. **Maturitas**, v. 89, p. 22-28, 2016.

KYLE, U. G. *et al.* Espen guidelines for bioelectrical impedance analysis - part II: utilization in clinical practice. **Clin Nutr**, v.23, n. 6, p. 1430-1453, dez. 2004.

LAURENIUS, A. *et al.* Changes in eating behaviour and meal pattern following Roux-en-Y gastric bypass. **Int J Obes (Lond)**, v. 36, n. 3, p. 348-355, 2012.

LE ROUX, C. W.; HENEGHAN, H. M. Bariatric surgery for obesity. **Medical Clinics of North America**, v. 102, n. 1, p. 165-182, 2018.

LE ROUX, C. W. *et al.* Ghrelin does not stimulate food intake in patients with surgical procedures involving vagotomy. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 90, n. 8, p. 4521-4524, 2005.

LEE, Y. S. The role of genes in the current obesity epidemic. **Ann Acad Med Singapore**, v. 38, n. 1, p. 45-47, 2009.

LI, H. *et al.* DNMT1, DNMT3A and DNMT3B polymorphisms associated with gastric cancer risk: a systematic review and metaanalysis. **EBioMedicine**, v. 13, p. 125-131, 2016.

LIASKOS, C. *et al.* Roux-en-Y gastric bypass is more effective than sleeve gastrectomy in improving postprandial glycaemia and lipaemia in non-diabetic morbidly obese patients: a short-term follow-up analysis. **Obes Surg**, v. 12, p. 3997-4005, 2018.

LLEWELLYN, C. H. *et al.* Satiety mechanisms in genetic risk of obesity. **JAMA Pediatr**, v. 168, n. 4, p. 338-344, 2014.

MACARTNEY-COXSON, D. *et al.* Genome-wide DNA methylation analysis reveals loci that distinguish different types of adipose tissue in obese individuals. **Clin Epigenetics**, v. 9, n. 1, p. 48, 2017.

MALANI, P. N. Harrison's principles of internal medicine. **JAMA**, v. 308, n. 17, p. 1813-1814, 2012.

MARX, J. Cellular warriors at the battle of the bulge. **Science**, v. 299, n. 5608, p. 846-849, fev. 2003.

MEEK, C. L. *et al.* The effect of bariatric surgery on gastrointestinal and pancreatic peptide hormones. **Peptides**, v. 77, p. 28-37, 2016.

MILAGRO, F. I. *et al.* A dual epigenomic approach for the search of obesity biomarkers: DNA methylation in relation to diet-induced weight loss. **FASEB J**, v. 25, n. 4, p. 1378-1389, 2011.

MIRAS, A. D. *et al.* Gastric bypass surgery for obesity decreases the reward value of a sweet-fat stimulus as assessed in a progressive ratio task. **Am J Clin Nutr**, v. 96, n. 3, p. 467-473, 2012.

MORTON, G. J.; MEEK, T. H.; SCHWARTZ, M. W. Neurobiology of food intake in health and disease. **Nat Rev Neurosci**, v. 15, n. 6, p. 367-378, jun. 2014.

MORTON, G. J. *et al.* Central nervous system control of food intake and body weight. **Nature**, v. 443, n. 7109, p. 289-295, 2006.

MULLA, C. M.; MIDDELBEEK, R. J. W.; PATTI, M. E. Mechanisms of weight loss and improved metabolism following bariatric surgery. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1411, n. 1, p. 53-64, 2018.

MÜNZBERG, H. *et al.* Appetite and body weight regulation after bariatric surgery. **Obes Rev**, v. 16, p. 77-90, 2015. Supl. 1.

NCD RISK FACTOR COLLABORATION (NCD-RISC). Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. **Lancet**, v. 387, n. 10026, p. 1377-1396, abr. 2016.

NGUYEN, D. M.; EL-SERAG, H. B. The epidemiology of obesity. **Gastroenterol Clin North Am**, v. 39, n. 1, p. 1-7, mar. 2010.

NIBLETT, P. **Statistics on obesity, physical activity and diet**. Health and Social Care Information Centre (HSCIC). Inglaterra, 3 mar. 2015. Disponível em: <https://digital.nhs.uk/data-and-information/publications/statistical/statistics-on-obesity-physical-activity-and-diet/statistics-on-obesity-physical-activity-and-diet-england-2015>. Acesso em: 8 mar. 2019.

NICOLETTI, C. F. *et al.* DNA methylation screening after roux-en Y gastric bypass reveals the epigenetic signature stems from genes related to the surgery per se. **BMC Med Genomics**, v. 12, n. 1, p. 72, 2019.

NONINO-BORGES, C. B. *et al.* Influence of meal time on salivary circadian cortisol rhythms and weight loss in obese women. **Nutrition**, v. 23, n. 5, p. 385-391, 2007.

ODSTRCIL, E. A. *et al.* The contribution of malabsorption to the reduction in net energy absorption after long-limb Roux-en-Y gastric bypass. **Am J Clin Nutr**, v. 92, n. 4, p. 704-713, 2010.

OUYANG, X. *et al.* Anthropometric parameters and their associations with cardio-metabolic risk in Chinese working population. **Diabetol Metabol Syndr**, v.7, n. 37, p. 2-7, 2015.

PANAGIOTOU, G.; NIELSEN, J. Nutritional systems biology: definitions and approaches. **Annu Rev Nutr**, v. 29, p. 329-339, 2009.

PATKAR, P. P. *et al.* Unlike calorie restriction, Roux-en-Y gastric bypass surgery does not increase hypothalamic AgRP and NPY in mice on a high-fat diet. **Int J Obes (Lond)**, v. 43, p. 2143-2150, fev. 2019.

PÉRUSSE, L. *et al.* The human obesity gene map: the 2004 update. **Obes Res**, v. 13, n. 3, p. 381-490, 2005.

PUCCI, A.; BATTERHAM, R. L. Mechanisms underlying the weight loss effects of RYGB and SG: similar, yet different. **J Endocrinol Investig**, v. 42, n. 2, p. 117-128, maio 2018.

RAMOS, A. V. *et al.* The contribution of FTO and UCP-1 SNPs to extreme obesity, diabetes and cardiovascular risk in Brazilian individuals. **BMC Med Genet**, v. 13, n. 1, p. 101, 2012.

RANGEL, L. *et al.* Perfil de saúde e nutricional de pacientes portadores de obesidade mórbida candidatos à cirurgia bariátrica. **Rev Bras Nutr Clin**, v. 22, n. 3, p. 214-219, 2007.

RANKINEN, T. *et al.* The human obesity gene map: the 2005 update. **Obesity**, v. 14, n. 4, p. 529-644, 2006.

RAVEENDRAN, R. *et al.* Obesity hypoventilation syndrome, sleep apnea, overlap syndrome: perioperative management to prevent complications. **Curr Opin Anesthesiol**, v. 30, n. 1, p. 146-155, 2017.

RAZQUIN, C.; MARTI, A.; MARTINEZ, J. A. Evidences on three relevant obesogenes: MC4R, FTO, and PPAR γ : approaches for personalized nutrition. **Mol Nutr Food Res**, v. 55, n. 1, p. 136-149, 2011.

REINSTEIN, C. S. B. **Dietwin**: software de avaliação nutricional. Porto Alegre: Brubins, 2008.

REMELY, M. *et al.* Therapeutic perspectives of epigenetically active nutrients. **Br J Pharmacol**, v. 172, n. 11, p. 2756-2768, 2015.

ROBLES, R. G.; RAMÍREZ, P. A. A.; VELÁSQUEZ, S. P. P. Epigenética: definición, bases moleculares e implicaciones en la salud y en la evolución humana. **Rev Cienc Salud**, v. 10, n. 1, p. 59-71, 2012.

RODRIGUES, A. M.; SUPLICY, H. L.; RADOMINSKI, R. B. Neuroendocrine control of food intake: implications in the genesis of obesity. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 47, n. 4, p. 398-409, 2003.

RUBINO, F. *et al.* The mechanism of diabetes control after gastrointestinal bypass surgery reveals a role of the proximal small intestine in the pathophysiology of type 2 diabetes. **Ann Surg**, v. 244, n. 5, p. 741-749, 2006.

SABIOSCIENCES. **Genes of appetite and satiety**. Frederick: SABiosciences, 2012. Disponível em: www.sabiosciences.com/rt_pcr_product/HTML/PAHS-017Z.html. Acesso em: 30 out. 2018.

SALA, P. C. *et al.* Relationship between gut hormones and glucose homeostasis after bariatric surgery. **Diabetol Metabol Syndr**, v. 6, n. 1, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1186/1758-5996-6-87>.

SALA, P. *et al.* Tissue-specific methylation profile in obese patients with type 2 diabetes before and after Roux-en-Y gastric bypass. **Diabetol Metab Syndr**, v. 9, n. 1, p. 1-15, 2017.

SAMBLAS, M.; MILAGRO, F. I.; MARTÍNEZ, A. DNA methylation markers in obesity, metabolic syndrome, and weight loss. **Epigenetics**, v. 14, n. 5, p. 421-444, 2019.

SÁNCHEZ, A. *et al.* Micronutrient deficiencies in morbidly obese women prior to bariatric surgery. **Obes Surg**, v. 26, n. 2, p. 361-368, fev. 2016.

SANDOVAL, D. Bariatric surgeries: beyond restriction and malabsorption. **Int J Obes**, v. 35, n. 3, 2011.

SAXONOV, S.; BERG, P.; BRUTLAG, D. L. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 5, p. 1412-1417, 2006.

SCHMATZ, R. *et al.* Evaluation of the biochemical, inflammatory and oxidative profile of obese patients given clinical treatment and bariatric surgery. **Clin Chim Acta**, v. 465, p. 72-79, 2017.

SCHWARTZ, M. W.; MORTON, G. J. Obesity: keeping hunger at bay. **Nature**, v. 418, n. 6898, p. 595-597, 2002.

SHARMA, A. Transgenerational epigenetics: integrating soma to germline communication with gametic inheritance. **Mech Ageing Dev**, v. 163, p. 15-22, 2017.

SHENKER, N. S. *et al.* Epigenome-wide association study in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-Turin) identifies novel genetic loci associated with smoking. **Hum Mol Genet**, v. 22, n. 5, p. 843-851, 2013.

SILVA, C. F. *et al.* Association between a frequent variant of the *FTO* gene and anthropometric phenotypes in Brazilian children. **BMC Med Genet**, v. 14, n. 1, p. 1-8, 2013.

SINGH, M. Mood, food, and obesity. **Front Psychol**, v. 5, p. 925, 2014.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIRURGIA BARIÁTRICA E METABÓLICA (SBCBM). **Número de cirurgias bariátricas no Brasil aumenta 46,7%**. [São Paulo], 11 jul.

2018. Disponível em: <https://www.sbcbm.org.br/numero-de-cirurgias-bariatricas-no-brasil-aumenta-467/>. Acesso em: 8 mar. 2019.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIRURGIA BARIÁTRICA E METABÓLICA (SBCBM). **Quem pode fazer**. [São Paulo], 5 out. 2017. Disponível em: <https://www.sbcbm.org.br/quem-pode-fazer/#1508954555254-8e2c7d79-d26c>. Acesso em: 18 jul. 2019.

STEFATER, M. A. *et al.* Sleeve gastrectomy induces loss of weight and fat mass in obese rats, but does not affect leptin sensitivity. **Gastroenterology**, v. 138, n. 7, p. 2426-2436.e3, 2010.

STEINERT, R. E. *et al.* Ghrelin, CCK, GLP-1, and PYY(3-36): secretory controls and physiological roles in eating and glycemia in health, obesity, and after RYGB. **Physiol Rev**, v. 97, n. 1, p. 411-463, 2017.

SUMITHRAN, P.; PROIETTO, J. The defence of body weight: a physiological basis for weight regain after weight loss. **Clin Sci (Lond)**, v. 124, n. 4, p. 231-241, 2013.

THAKER, V. V. Genetic and epigenetic causes of obesity. **Adolesc Med State Art Rev**, v. 28, n. 2, p. 379-405, 2017.

VALASSI, E.; SCACCHI, M.; CAVAGNINI, F. Neuroendocrine control of food intake. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v. 18, n. 2, p. 158-168, fev. 2008.

VELÁZQUEZ-FERNÁNDEZ, D. *et al.* Analysis of gene candidate SNP and ancestral origin associated to obesity and postoperative weight loss in a cohort of obese patients undergoing RYGB. **Obes Surg**, v. 27, n. 6, p. 1481-1492, 2017.

VILJANEN, A. *et al.* The effect of bariatric surgery on intraocular pressure. **Acta Ophthalmol**, v. 96, n. 8, p. 849-852, 2018.

WANDERLEY, E. N.; FERREIRA, V. A. Obesity: a plural perspective. **Cien Saude Colet**, v. 15, n. 1, p. 185-194, 2010.

WELEDJI, E. P. Overview of gastric bypass surgery. **Int J Surg Open**, v. 5, p. 11-19, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global status report on noncommunicable diseases 2014**. Geneva, WHO, 2014. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/148114/9789241564854_eng.pdf?sequence=1. Acesso em: 16 jun. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Obesity: preventing and managing the global epidemic**. Geneva: WHO, 1998. Report of a WHO consultation on obesity. Disponível em: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/63854/WHO_NUT_NCD_98.1_\(p1-158\).pdf](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/63854/WHO_NUT_NCD_98.1_(p1-158).pdf). Acesso em: 16 jun. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Obesity and overweight**. [Geneva]: WHO, 2016. Fact sheet.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Obesity and overweight**. [Geneva]: WHO, 2018. Fact sheet. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. Acesso em: 8 mar. 2019.

XU, H. C. *et al.* Systematic review and meta-analysis of the change in ghrelin levels after Roux-en-Y gastric bypass. **Obes Surg**, v. 29, n. 4, p. 1343-1351, abr. 2019.

YANG, D. *et al.* Orexin-A and endocannabinoid signaling regulate glucose-responsive arcuate nucleus neurons and feeding behavior in obese rats. **Neuropeptides**, v. 69, p. 26-38, jun. 2018.

YOUNG, A. A. Brainstem sensing of meal-related signals in energy homeostasis. **Neuropharmacology**, v. 63, n. 1, p. 31-45, 2012.

Apêndices

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido das pacientes que realizaram intervenção dietética

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO E PARA GUARDA DE MATERIAL BIOLÓGICO

O(a) senhor(a) está sendo convidado(a) a participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte deste estudo, assine ao final deste documento em duas vias. Caso o(a) senhor(a) não aceite participar da pesquisa, não será penalizado(a) de forma alguma e seu atendimento não será prejudicado na Instituição. O objetivo da pesquisa é avaliar modificações no padrão de metilação de genes relacionados com a via do apetite/saciedade em mulheres com obesidade grau III, antes e após a derivação gástrica em Y de Roux (DGYR), e comparar todos esses dados com o grupo de indivíduos magros, o qual o (a) senhor (a) fará parte.

Caso concorde em participar, o (a) senhor(a) deverá inicialmente passar por uma única avaliação de antecedentes pessoais, por meio de um questionário, em seguida realizar avaliação antropométrica, como o peso, estatura e análise de composição corporal pelo método de Bioimpedância Elétrica. Além disso, coleta das amostras de sangue no período da manhã após doze horas de jejum, serão coletados 6 ml de sangue, sendo 3 ml para as análises genéticas (metilação do DNA) e 3 ml para as análises bioquímicas.

Os riscos ou desconfortos da pesquisa são mínimo, possíveis dores semelhantes a uma picada nas coletas de sangue. Contudo, a pesquisa não causará sensações que possam oferecer riscos a sua saúde. Além disso, caso ocorra algum dano direto ou indireto decorrente da sua participação desta pesquisa, será fornecida toda assistência médica necessária. Os benefícios esperados da pesquisa são fundamentais para o entendimento, assim como para o desenvolvimento de estratégias para prevenir e tratar a obesidade.

Sua participação nesta pesquisa é voluntária e o(a) senhor(a) tem liberdade deixar de participar a qualquer momento, é só avisar algum dos pesquisadores. Caso não aceite participar

o seu tratamento no Hospital será o mesmo. Será mantido sigilo absoluto dos dados obtidos individualmente neste estudo, para assegurar a privacidade dos participantes. Caso o(a) senhor(a) se sinta prejudicado em participar desta pesquisa, o(a)senhor(a) poderá buscar indenização de acordo com as normas vigentes no país.

Os pesquisadores estarão disponíveis para qualquer dúvida a qualquer momento durante o estudo e o sr.(a) tem a garantia de acesso aos resultados da pesquisa. Caso tenha dúvidas sobre aspectos éticos desta pesquisa o(a) senhor(a) também poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da faculdade de Medicina de Ribeirão Preto pelo telefone (16) 3602-2228.

Esta pesquisa está vinculada ao biorrepositório Genômica Nutricional criado na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP com o objetivo de guardar amostras de sangue para que se possa manter a integridade do material e ser utilizado em futuros estudos. Gostaríamos de convidá-lo (a) a autorizar a coleta, o depósito, o armazenamento e a utilização do material biológico humano de sangue para fins de pesquisa e análise científica.

Após coletado, o material será armazenado em freezer a -80°C em biorrepositório localizado no Laboratório de Estudos em Nutrigenômica situado dentro da Universidade de São Paulo, cujo o telefone para contato é (16) 3315-4810, onde as amostras serão armazenadas durante 5 anos. Os pesquisadores responsáveis pela equipe se comprometem a identificar as amostras e os dados coletados de modo que garanta o seu sigilo e a sua confidencialidade, para isso a sua amostra de sangue será identificada por meio de números. Quanto ao material, será coletado 5 mL de sangue (1 colher de sopa). Em decorrência da coleta poderá sentir leves desconfortos como dores e hematomas no local, sendo que será fornecida toda assistência médica necessária.

Sua participação é voluntária, tendo liberdade de aceitar ou não que sua amostra seja guardada, sem risco de qualquer penalização ou prejuízo no atendimento que lhe for prestado. O (A) Sr. (a) também tem o direito de retirar seu consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado a qualquer momento. Solicitamos também os dados de contato do(a) senhor(a), para que seja possível encontrá-lo(a) posteriormente. Através dos contatos, garantimos fornecer as informações de seu interesse, além de receber eventuais benefícios provenientes do estudo com seu material biológico. Também solicitaremos sua autorização, se necessário, para o descarte do material armazenado em decorrência do armazenamento inadequado.

Declaramos para os devidos fins que a cada a nova pesquisa o Sr.(a) será contatado para a utilização do seu material biológico armazenado neste biorrepositório, e também a nova pesquisa

será submetida à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) institucional e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Solicitamos seus dados de contato e sua assinatura, tendo recebido as informações acima, para confirmação de aceitação de participação. Também afirmamos que uma via deste documento, devidamente assinada e rubricada, será entregue ao senhor (a).

Dados do participante:

Nome: _____, RG: _____, Endereço: _____
_____, nº _____, Bairro _____
_____, cidade _____, telefone _____

Abaixo também seguem os dados de contato do pesquisador responsável, caso o(a) senhor(a) tenha alguma dúvida posteriormente.

Nome do participante: _____

Assinatura: _____ **data:** _____

Nome do pesquisador: _____

Assinatura: _____ **data:** _____

Dados do responsável legal ou testemunha (caso aplicável):

Nome legível: _____

Assinatura: _____ data: _____

Anexos

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética do HCFMRP-USP

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

Ofício Nº 1239/2018
CEP/MGV

RIBEIRÃO PRETO, 10 DE MAIO DE 2018

PREZADAS SENHORAS,

O TRABALHO INTITULADO “MARCADORES EPIGENÉTICOS RELACIONADOS À VIA DO APETITE/SACIEDADE EM MULHERES COM OBESIDADE GRAU III ANTES E APÓS A DERIVAÇÃO GÁSTRICA EM Y DE ROUX” – VERSÃO 2, DE 23/04/2018 E CRIAÇÃO DE BIORREPOSITÓRIO, FORAM ANALISADOS PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SUA 469ª REUNIÃO ORDINÁRIA, REALIZADA EM 07/05/2018 E ENQUADRADOS NA CATEGORIA: **APROVADO**, BEM COMO O TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO E PARA GUARDA DE MATERIAL BIOLÓGICO – VERSÃO 3, DE 19/04/2018 (CONTROLE E INTERVENÇÃO), DE ACORDO COM O PROCESSO HCRP Nº 2555/2018.

DE ACORDO COM CARTA CIRCULAR Nº 003/2011/CONEP/CNS, DATADA DE 21/03/2011, O SUJEITO DE PESQUISA OU SEU REPRESENTANTE, QUANDO FOR O CASO, DEVERÁ RUBRICAR TODAS AS FOLHAS DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE – APONDO SUA ASSINATURA NA ÚLTIMA DO REFERIDO TERMO; O PESQUISADOR RESPONSÁVEL DEVERÁ DA MESMA FORMA, RUBRICAR TODAS AS FOLHAS DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE – APONDO SUA ASSINATURA NA ÚLTIMA PÁGINA DO REFERIDO TERMO.

ESTE COMITÊ SEGUE INTEGRALMENTE A CONFERÊNCIA INTERNACIONAL DE HARMONIZAÇÃO DE BOAS PRÁTICAS CLÍNICAS (IGH-GCP), BEM COMO A RESOLUÇÃO Nº 466/12 CNS/MS.

LEMBRAMOS QUE DEVEM SER APRESENTADOS A ESTE CEP, O RELATÓRIO PARCIAL E O RELATÓRIO FINAL DA PESQUISA.

ATENCIOSAMENTE.

DRª. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
COORDENADORA DO COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DO HCRP E DA FMRP-USP

Ilustríssimas Senhoras
LETICIA SANTANA WOLF
PROFª.DRª.CARLA BARBOSA NONINO(ORIENTADORA)
Depto. de Clínica Médica

ANEXO B – Questionário sobre hábitos de vida e presença de comorbidades**Questionário**

Amostra: _____

1. IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____

Prontuário: _____

Data de Nascimento e Idade: _____

Sexo _____

Naturalidade: _____

Endereço: _____

Telefones: _____

Bairro _____ Cidade: _____

CEP: _____

2. HISTÓRICO MÉDICO

( ) Aneurisma ( ) Hipertensão ( ) Etilismo ( ) Dislipidemia (colesterol) ( ) Doença Renal

( ) Tabagismo ( ) Diabetes mellito ( ) Transplante ( ) Doença Hepática (cirrose)

( ) Fibromialgia ( ) Doenças Cardiovasculares ( ) Doenças Psiquiátricas

( ) Neurodegenerativa

Qual? _____

Há quanto tempo? _____

Obesidade Grau: _____