

Beatriz de Azevedo Muner Ferreira

Expressão de genes do metabolismo do folato e consumo alimentar em mulheres obesas graves após derivação gástrica em Y-Roux (DGYR)

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Ciências em Gastroenterologia
Orientador: Prof. Dr. Dan Linetzky Waitzberg

São Paulo

2021

Beatriz de Azevedo Muner Ferreira

Expressão de genes do metabolismo do folato e consumo alimentar em mulheres obesas graves após derivação gástrica em Y-Roux (DGYR)

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Ciências em Gastroenterologia
Orientador: Prof. Dr. Dan Linetzky Waitzberg

São Paulo

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Ferreira, Beatriz de Azevedo Muner

Expressão de genes do metabolismo do folato e consumo alimentar em mulheres obesas graves após derivação gástrica em Y-Roux (DGYR) / Beatriz de Azevedo Muner Ferreira. -- São Paulo, 2021.

Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências em Gastroenterologia.

Orientador: Dan Linetzky Waitzberg.

Descritores: 1.Cirurgia bariátrica 2.Derivação gástrica 3.Trato gastrointestinal 4.Ácido fólico 5.Expressão gênica

USP/FM/DBD-436/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

Dedico este trabalho a **Deus**, por sempre me fortalecer e iluminar o meu caminho. Assim como aos meus **avôs** e **avós** que moram em meu coração e são anjos na minha vida.

Aos meus pais, **Elizabeth e José Carlos**, que são a minha fortaleza e base. Obrigada por nunca medirem esforços para oferecer o melhor para a nossa família. Obrigada por estarem sempre ao meu lado, amando, cuidando, se preocupando, aconselhando e ensinando. Sem vocês nada disso seria possível. Vocês são os melhores pais desse universo.

À minha irmã **Letícia** e meu cunhado **Felipe**, pelo amor, apoio e incentivo. Obrigada por sempre torcerem pelas minhas conquistas. Eu tenho a melhor família do mundo.

Ao meu marido, melhor amigo e porto seguro, **André**, obrigada por ser o melhor parceiro de vida. Você foi essencial para que eu chegasse até aqui, sem o seu amor, apoio, incentivo e carinho eu não teria conseguido enfrentar essa jornada. Agradeço a paciência e compreensão em todo esse processo.

À **vida que estou gerando dentro de mim**, o maior presente e benção que eu poderia ganhar.

Por fim, à **ciência**, pelos novos horizontes e o propósito de servir ao próximo.

Agradecimentos

“Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, pois cada pessoa é única, e nenhuma substitui outra. Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, mas não vai só, nem nos deixa sós. Leva um pouco de nós mesmos, deixa um pouco de si mesmo. Há os que levam muito; mas não há os que não levam nada. Há os que deixam muito; mas não há os que não deixam nada. Esta é a maior responsabilidade de nossa vida e a prova evidente que duas almas não se encontram ao acaso.”

Antoine de Saint-Exupéry

Agradeço ao meu orientador **Dan L. Waitzberg**, pela oportunidade e por ter me acolhido como aluna. Minha eterna gratidão e admiração. Um privilégio poder conviver com alguém que transborda sabedoria, competência e serenidade. Muito obrigada por tanto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**), pelo apoio financeiro ao projeto temático (2011/09612-3). O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (**CAPES**) - Código de Financiamento 001.

Às **pacientes** do estudo, que com generosidade aceitaram participar desta pesquisa, sem elas nada disso seria possível. Obrigada pelo carinho e confiança, foi uma honra conhecer e conviver com cada uma de vocês.

A todos os professores e funcionários da Disciplina de Cirurgia do Aparelho Digestivo do HC-FMUSP que me acolheram no programa de pós-graduação. E um obrigada especial à **Vilma de Jesus Libério**, pela paciência e por tantas orientações durante essa caminhada.

A toda equipe de endoscopia do HC-FMUSP, agradeço pela paciência, pelo auxílio, pela persistência e pela oportunidade.

Agradeço, em especial, ao **Dr. Eduardo Moura**, **Dr. Paulo Sakai**, **Dr. Robson Ishida** e **Dr. Ismael Guarda**, pela persistência, oportunidade e ensinamentos. Obrigada por fazerem esse estudo dar certo.

A toda equipe de cirurgia bariátrica do HC-FMUSP, que ajudaram a execução desse projeto em todos os momentos, em especial ao **Dr Marco Aurélio Santo** pelo apoio constante.

À enfermeira **Janete**, por sempre se disponibilizar a realizar as coletas de material para o estudo.

À minha amiga-irmã **Danielle Fonseca**, um presente na minha vida. Fico sem palavras para descrever a sintonia, amor e parceria em nossa amizade. Obrigada por estar, de verdade, presente em todos os momentos da minha vida, nos alegres e em uma das fases mais difíceis que já precisei enfrentar. Você não mede esforços para estar ao meu lado, me apoiando, ajudando e acolhendo. Obrigada por me fazer acreditar que isso seria possível.

À querida **Priscila Sala**, obrigada pela oportunidade, por ter me acolhido e apresentado ao mundo da genética. Tenho uma admiração gigante e gratidão por tantos ensinamentos.

À **Natasha Machado**, por me receber tão bem e ensinar tanto. Você é uma grande parceira do Temático. Te admiro demais.

À **Raquel Torrinhos**, você é uma grande inspiração. Muito obrigada por todo apoio, ajuda e ensinamentos. Você foi essencial para concretização dessa etapa. Te admiro muito e serei eternamente grata.

Às minhas amigas queridas **Bianca, Letícia, Ana Cristina e Ana Paula**, minhas parceiras de temático. Obrigada por tantos momentos e por termos superado juntas algumas dificuldades no caminho. Vocês são especiais para mim.

A todos os pesquisadores desta e de outras instituições que contribuíram para o desenvolvimento do estudo temático SURMetaGIT.

A todos **da equipe Metanutri – LIM-35**, é um privilégio fazer parte dessa equipe brilhante. Obrigada pela parceria, convivência e por me ensinarem tantas lições valiosas.

Aos meus **familiares e amigos**, obrigada por me apoiarem, torcerem por mim e acreditarem acima de tudo que eu conseguiria.

À minha sogra **Clei**, pelo carinho, apoio e torcida em tantos momentos
dessa caminhada.

Por fim, aos meus amores **Nickinho e Toddynho**, pelo amor genuíno e
por tantos momentos de alegria e distração.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá

Normalização Adotada

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS	12
LISTA DE FIGURAS.....	14
LISTA DE QUADROS.....	15
LISTA DE TABELAS	16
RESUMO.....	17
ABSTRACT	19
1. INTRODUÇÃO	22
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	25
2.1 Obesidade.....	25
2.2 Tratamento cirúrgico da obesidade grave por DGYR	26
2.3 Deficiência nutricional após DGYR.....	29
2.4 Vitamina B9 - Folato.....	30
2.4 Deficiência de Folato após DGYR.....	35
4. OBJETIVO	38
4.2 Objetivo primário.....	38
5. MATERIAS E MÉTODOS.....	40
5.1 Local de execução do trabalho	40
5.2 Aspectos éticos.....	40
5.3 Casuística	40
5.4 Acompanhamento clínico ambulatorial.....	41
5.5 Cirurgia bariátrica	42
5.6 Dados antropométricos	43
5.7 Ingestão alimentar.....	43
5.8 Obtenção das amostras.....	44
5.8.1 Plasma.....	44
5.8.2 Biópsias Intestinais.....	44
5.9 Análise do Transcriptoma	45
5.9.1 Análise transcriptoma por Microarray.....	45

5.9.2 Análise transcriptoma alvo por RT-qPCR	46
5.10 Análises estatísticas	47
6 RESULTADOS.....	50
6.1 Descrição da amostra	50
6.2 Ingestão de folato.....	50
6.3 Concentração plasmática de folato	51
6.4 Expressão de genes intestinais	51
6.5 Correlações.....	55
7. DISCUSSÃO.....	58
7.1 Da contribuição científica.....	58
7.2 Dos métodos.....	58
7.3 Dos resultados	61
8. CONCLUSÃO	67
9. ANEXOS.....	69
ANEXO A - Aprovação da Comissão de Ética para Análises de Projetos de Pesquisas do Hospital das Clínicas da FMUSP (CAPPesq).....	69
ANEXO B – Desmembramento do projeto temático	70
ANEXO C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	72
10 REFERÊNCIAS	77
11. APÊNDICES	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

%	Porcentagem
<	Menor
≤	Menor ou igual
=	Igual
>	Maior
≥	Maior ou igual
®	Marca Registrada Nacional
μl	Microlitros
5-MTHF	5-metiltetrahidrofolato
ACTB	Beta-actina
ATP	Adenosina trifosfato
B12	Cobalamina
B9	Folato
BGA	Banda gástrica ajustável
BPD/DS	Derivação bileopancreática com switch duodenal
Cappesq	Comissão de Ética para Análises de Projetos de Pesquisas
Cdna	DNA complementar
CFM	Conselho Federal de Medicina
Cm	Centímetros
DGYR	Derivação Gástrica em Y de Roux
DHF	Di-hidrofolato
DHFR	Di-hidrofolato redutase
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
Dris	Dietary Reference Intakes
EAR	Estimated Average Requirements
ECLIA	Eletroquimioluminescência
EDB	Enteroscopia de duplo balão
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FAD	Dessaturase de ácidos graxos
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FC	Fold-change
FGCP/GCPII	Enzima folipoli-gama-glutamato carboxipeptidase
Folrs	Receptores de folato
FPGS	Folipoli-gama-glutamato sintetase
Frs	Receptores de folato
GCPII	Glutamato carboxipeptidase II
GGH	Gama-glutamil hidrolase
GV	Gastrectomia vertical
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IMC	Índice de Massa Corporal
IQR	Intervalo interquartil
Kg	Quilogramas
Kg/m ²	Quilogramas / metros quadrados

LIM	Linha de Investigação Médica
M	Metros
M ²	Metro quadrado
Mcg	Microgramas
Mcg/d	Microgramas / dia
Mg	Miligramas
Min	Minutos
MI	Mililitros
MRP	Proteína associada à resistência a múltiplas drogas
MSM	Multiple Source Method
MTHFD1	Metilenotetraidrofolato Desidrogenase, Cicloidrolase e Formiltetraidrofolato Sintetase 1
MTHFR	Metilenotetra-hidrofolato redutase
MTR	Metionina sintase
Ng	Nanogramas
Ng/ml	Nanogramas / mililitros
°c	Graus Celsius
OMS	Organização Mundial da Saúde
P=	Valor de p
PCFT	Transportador de folato acoplado a prótons
RDA	Recommended Dietary Allowances
RFC	Carreador de folato reduzido
RFC1	Transportador de folato reduzido
RIN	RNA Integrity Number
RT-qPCR	Reação de transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia de polimerase quantitativa
SBCBM	Sociedade Brasileira de Cirurgia Bariátrica e Metabólica
SHMT	Enzima serina hidroxil-metiltransferase
Surmetagit	Protocolo de pesquisa sobre efeitos metabólicos induzidos cirurgicamente no trato gastrointestinal humano (surmetagit)
TACO	Tabela Brasileira de Composição de Alimentos
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TGI	Trato gastrointestinal
THF	Tetrahidrofolato
THF	Ácido tetra-hidrofólico
Vigitel	Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mudanças anatômicas induzidas pela DGYR.	28
Figura 2. Estrutura do ácido fólico e folato	31
Figura 3. Poliglutamatos hidrolisados em monoglutamatos	32
Figura 4. Absorção, transporte e captação celular de folato.	33
Figura 5. Fluxo de seleção de pacientes	41
Figura 6. Desenho do protocolo do estudo.....	42
Figura 7. Marcação da mucosa intestinal com tinta nanquim.....	45
Figura 8. Fluxograma da Análise do Transcriptoma	47
Figura 9. Mapas de calor da expressão gênica	53
Figura 10. Via de transporte e de biossíntese de folato	54
Figura 11. Fold-change médio segundo cada gene nos três sítios estudados	55

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Classificação nutricional de acordo com o índice de massa corporal e sua relação com risco de comorbidades	25
Quadro 2. Recomendação para tratamento da obesidade estratificado pelo índice de massa corpórea	27
Quadro 3. Estágios da dieta no pós-operatório	29
Quadro 4. Principais recomendações diárias para a prevenção e tratamento da deficiência de ácido fólico após cirurgia bariátrica	36
Quadro 5. Matriz de correlação entre o fold-change nos segmentos intestinais duodeno, jejuno e íleo com a concentração plasmática e consumo alimentar de folato	55
Quadro 6. Resumo das alterações transcriptômicas envolvidas no metabolismo intestinal do folato, de níveis dietéticos e plasmáticos desse micronutriente e das correlações entre essas variáveis, observadas após 3 meses de derivação gástrica a Y de Roux	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados descritivos das 20 pacientes incluídas no estudo, avaliadas antes e 3 meses após derivação gástrica em Y de Roux.....	50
Tabela 2. Consumo de folato no pré-operatório e pós-operatório de 3 meses de derivação gástrica em Y de Roux.....	51
Tabela 3. Concentração plasmática de folato em condições de jejum, no pré-operatório e após 3 meses da DGYR.....	51
Tabela 4. Expressão global (<i>microarray</i>) e alvo (RT-qPCR) de genes envolvidos na via do folato em tecidos intestinais.....	52
Tabela 5. Fold-change médio da expressão gênica 3 meses após a realização do procedimento.....	54
Tabela 6. Características dos oito genes relacionados às vias de metabolismo intestinal do folato diferencialmente expressos no intestino de mulheres obesas após 3 meses de derivação gástrica em Y de Roux	60

RESUMO

Ferreira, BAM. *Expressão de genes do metabolismo do folato e consumo alimentar em mulheres obesas graves após derivação gástrica em Y de Roux* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

Introdução: Técnicas cirúrgicas bariátricas são consideradas o tratamento mais eficaz para obesidade grave. A derivação gástrica em Y-Roux (DGYR) é uma técnica cirúrgica mista que consiste na redução do reservatório gástrico (restrição) e desvio do duodeno e jejuno proximal do trânsito alimentar (disabsorção). A DGYR tem sucesso na perda de peso e controle metabólico; entretanto, a ocorrência de deficiências nutricionais é uma de suas complicações mais comuns, o que inclui deficiência de folato. O folato é uma vitamina hidrossolúvel do complexo B e atua como aceptor e doador de unidades de carbono em reações críticas para o metabolismo de ácidos nucleicos e aminoácidos. *Objetivo:* O presente estudo buscou identificar alterações de variáveis relacionadas ao metabolismo do folato que pudessem contribuir para sua deficiência pós-DGYR. *Metodologia:* A expressão de genes gastrointestinais relacionados à via do folato, assim como os níveis séricos e de ingestão alimentar deste micronutriente foram avaliados em 20 mulheres obesas graves, antes e após 3 meses de DGYR. Nesses períodos foram coletadas biópsias do duodeno, jejuno e íleo, por enteroscopia de duplo balão, para o estudo de alterações da expressão tecidual de ácido ribonucleico mensageiro (RNA), por técnica de *microarray* (abordagem global). Os resultados encontrados pelo *microarray* foram validados por técnica de RT-qPCR (abordagem alvo). O consumo dietético habitual de folato foi estimado pelo método *Multiple Source Method*, a partir de dados de registro alimentar de 7 dias, e suas concentrações plasmáticas foram dosadas em condições de jejum por Eletroquimioluminescência. A análise estatística contemplou teste de correlações entre expressão gênica tecidual e as variáveis sistêmicas e dietéticas avaliadas. *Resultados:* Após 3 meses de DGYR (vs. pré-operatório), foram observadas alterações transcriptômicas em todos os segmentos intestinais avaliados, com diminuição da expressão de genes que codificam transportadores do folato e aumento da expressão de genes envolvidos na sua biossíntese ($p < 0,05$). Em paralelo, o consumo alimentar de ácido fólico (que já

se apresentou deficiente no pré-operatório) e suas concentrações plasmáticas diminuíram após 3 meses de DGYR, em relação ao período pré-operatório ($p < 0,05$). Ademais, a concentração plasmática de folato apresentou correlação inversa significativa com a expressão duodenal de *FOLR2* e *SHMT2* ($p < 0,001$).

Conclusões: As observações do presente estudo sugerem que alterações anatômicas intestinais induzidas por DGYR podem modificar a expressão de genes relacionados ao metabolismo do folato e que essas alterações, ao menos no duodeno, podem afetar níveis sistêmicos desse micronutriente. Nesse sentido, nossos dados suportam a necessidade de se monitorar níveis de folato no pré e pós-operatório de DGYR, para identificar eventuais deficiências e indicar sua suplementação.

Descritores: Cirurgia bariátrica; Derivação gástrica; Trato gastrointestinal; Ácido fólico; Expressão gênica.

ABSTRACT

Ferreira, BAM. *Gene expression of folate metabolism and food intake in severely obese women after Roux-en-Y gastric bypass* [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2021.

Background: Bariatric surgical techniques are considered the most effective treatment for severe obesity. Roux-en-Y gastric bypass (RYGB) is a mixed surgical technique that consists of reducing the gastric reservoir (restriction) and diverting the duodenum and the proximal jejunum from the food transit (disabsorption). RYGB is successful in weight loss and metabolic control; however, nutritional depletion is one of its most common complications, which includes folate deficiency. Folate is a water-soluble B-complex vitamin and acts as an acceptor and donor of carbon units in critical reactions for the metabolism of nucleic acids and amino acids. *Objective:* The present study sought to identify changes in variables related to the folate metabolism that could contribute to its post-RYGB deficiency. *Methodology:* The expression of gastrointestinal genes related to the folate pathway, as well as serum levels and dietary intake of this micronutrient were evaluated in 20 severely obese women, before and after 3 months of RYGB. During these periods, biopsies of the duodenum, jejunum and ileum were collected by double-balloon enteroscopy to study alterations in tissue expression of messenger ribonucleic acid (RNA_m), by microarray technique (global approach). The results found by the microarray were validated by the RT-qPCR technique (target approach). The usual dietary intake of folate was estimated by the Multiple Source Method method, from 7-day food record data, and its plasma concentrations were measured under fasting conditions by Electrochemiluminescence. Statistical analysis included test of correlations between tissue gene expression and systemic and dietary variables evaluated. *Results* After 3 months of RYGB (vs. preoperative period), transcriptomic changes were observed in all intestinal segments evaluated, with decreased expression of genes encoding folate transporters and increased expression of genes involved in folate biosynthesis ($p < 0.05$). In parallel, dietary intake of folic acid (which was already deficient in the preoperative period) and its plasma concentrations decreased after 3 months of RYGB, compared to the preoperative period ($p < 0.05$). Furthermore, plasma folate concentration was inversely

correlated with duodenal expression of FOLR2 and SHMT2 ($p < 0.001$).
Conclusions: The observations of the present study suggest that RYGB-induced intestinal anatomical changes can modify the expression of genes related to folate metabolism and that these changes, at least in the duodenum, can affect systemic levels of this micronutrient. In this sense, our data support the need to monitor folate levels in the pre- and postoperative period of RYGB, to identify any deficiencies and indicate their supplementation.

Descriptors: Bariatric surgery; Gastric bypass; Gastrointestinal tract; Folic acid; Gene expression.



Introdução

1. INTRODUÇÃO

Cirurgias bariátricas permanecem o tratamento mais eficaz para obesidade grave, ao promoverem perda de peso sustentável e reduzirem suas principais comorbidades e risco de mortalidade. A derivação gástrica em Y-Roux (DGYR) é uma técnica cirúrgica bariátrica mista, que consiste na redução do reservatório gástrico e desvio do duodeno e jejuno proximal do trânsito alimentar¹⁻³. Alterações da configuração do trato gastrointestinal (TGI) após DGYR conduzem à modificação de padrões dietéticos, que devem ser adaptados a novas condições fisiológicas.

A reposição e a incorporação de micronutrientes a partir da alimentação é a maneira mais recomendada de se manter seus estoques corporais em níveis adequados. No entanto, em pacientes submetidos à DGYR alguns fatores justificam a suplementação nutricional, uma vez que não se pode afirmar que a oferta de nutrientes é plenamente aproveitada pelo organismo^{4,5}. Nesses pacientes, a complementação de inquéritos alimentares com dosagens plasmáticas poder ser necessária para determinar se o consumo de determinado nutriente está adequado⁶.

Graças às modificações anatômicas induzidas pela DGYR, essa técnica cirúrgica bariátrica tem deficiências nutricionais como uma de suas principais complicações. Entre as depleções nutricionais mais comuns pós-DGYR incluem-se vitaminas do complexo B, como a vitamina B12 (cobalamina) e a vitamina B9 (folato)⁷. Quanto mais ampla a compreensão de mecanismos relacionados ao metabolismo de micronutrientes pós-DGYR, maiores as chances de se desenvolver abordagens clínicas mais eficazes para a prevenção e tratamento de suas deficiências.

Particularmente, a deficiência de folato afeta cerca de 38% dos pacientes submetidos à DGYR. Concentrações inadequadas de folato podem promover instabilidade genômica e culminar em danos por de quebra na fita dupla do DNA. Além disso, baixas concentrações de folato são associadas a concentrações elevadas de homocisteína total, que, por sua vez, são consideradas fator de risco para doença cardiovascular⁸⁻¹¹. Sinais e sintomas de deficiência deste

micronutriente incluem anemia megaloblástica, leucopenia, trombocitopenia, glossite e elevados níveis de homocisteína ⁸⁻¹¹.

O presente estudo é parte do SURMetaGIT ¹², estudo clínico maior que identificou alterações da expressão de genes que codificam transportadores e receptores intestinais de cobalamina (vitamina B12), em resposta às mudanças anatômicas induzidas por DGYR. Apesar dos vários mecanismos fisiológicos já descritos que podem culminar na deficiência de folato (vitamina B9) pós-DGYR, as observações do estudo SURMetaGIT sugerem possível contribuição adicional de mecanismos moleculares envolvendo alterações na expressão intestinal de genes envolvidos em seu metabolismo.

Nesse sentido, a hipótese (H1) do presente estudo considerou que alterações na expressão de genes envolvidos no metabolismo de folato possam ocorrer após DGYR e se correlacionarem com a ingestão e níveis sistêmicos desse importante micronutriente. Nossos dados poderão ser úteis para identificar possíveis mecanismos que norteiem o desenvolvimento de medidas terapêuticas, para prevenção e correção de deficiência de folato em pacientes submetidos à DGYR, o que justificou seu desenvolvimento.



Revisão da literatura

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Obesidade

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define obesidade como “acúmulo anormal ou excessivo de gordura, que pode prejudicar a saúde”. O excesso de peso e, principalmente, a obesidade estão entre os problemas de saúde pública mais preocupantes enfrentados atualmente no mundo ^{13,14}. Em 2025, a estimativa é de que 2,3 bilhões de adultos ao redor do mundo estejam acima do peso, sendo 700 milhões de indivíduos com obesidade; isto é, com um índice de massa corporal (IMC) acima de 30 ¹⁵. A OMS¹⁶ descreve a existência de uma associação direta do IMC com o risco de desenvolvimento de comorbidades, conforme demonstrado no Quadro 1.

Quadro 1. Classificação nutricional de acordo com o índice de massa corporal e sua relação com risco de comorbidades

Classificação	IMC	Risco de comorbidades
Baixo peso	< 18,5 kg/m ²	Baixo
Peso normal	18,5 a 24,9 kg/m ²	Médio
Sobrepeso	≥ 25,0 kg/m ²	Aumentado
Pré-obeso	25,0 a 29,9 kg/m ²	Aumentado
Obeso I	30,0 a 34,9 kg/m ²	Moderado
Obeso II	35,0 a 39,9 kg/m ²	Grave
Obeso III	≥ 40,0 kg/m ²	Muito grave
Superobeso	≥ 50kg/m ²	Muito grave
Super-superobeso	≥ 60kg/m ²	Muito grave

Fonte: WHO, 2000 ¹⁶.

A pesquisa Vigitel, realizada anualmente desde 2006, obteve um total de 52.443 entrevistas em 2019 ¹⁷. Nela, o estado nutricional da amostra foi refletido pelo IMC, definido como peso em quilogramas dividido pelo quadrado da altura em metros, ambos autorreferidos. Os valores contínuos do IMC, em nível individual, foram usados para estimar a média do IMC e a prevalência de suas distintas categorias, de acordo com a OMS (descritas anteriormente no Quadro 1). Essa estimativa foi feita de 2006 a 2019, por sexo, para cada capital dos estados brasileiros e o Distrito Federal. O excesso de peso e obesidade também

foram diagnosticados, de acordo com as distintas categorias de IMC propostas pela OMS.

No conjunto das 27 cidades estudadas, a frequência de excesso de peso foi de 55,4%, ligeiramente maior entre homens (57,1%) do que entre mulheres (53,9%). A prevalência geral da obesidade aumentou 72% nos últimos treze anos, saindo de 11,8% (2006) para 20,3% (2019). De acordo com esses dados, dois a cada 10 brasileiros estão obesos ¹⁷. A frequência de obesidade aumentou com a idade até os 64 anos, para homens, e até os 54 anos, para mulheres. Entre as mulheres, a frequência de obesidade diminuiu intensamente com o aumento da escolaridade ¹⁷. Houve ainda superação da prevalência de obesidade sobre a prevalência de baixo peso. Este resultado chama a atenção, pois evidencia estágio avançado da transição nutricional ¹⁷.

2.2 Tratamento cirúrgico da obesidade grave por DGYR

A incidência e a prevalência da obesidade atingem níveis alarmantes em todo o mundo; mais especificamente, o número de obesos grau III é crescente em alguns países, entre eles o Brasil. Por isso, o objetivo do tratamento nestes indivíduos é reduzir o percentual de gordura corporal e prevenir ou tratar as comorbidades associadas. Ainda são importantes para o tratamento, as mudanças de hábitos de vida, pautadas na intervenção dietética e atividade física (Quadro 2). Contudo, o indivíduo obeso grau III é um desafio à parte, pois conjuga três aspectos graves da doença: elevada prevalência de compulsão alimentar, resistência ao tratamento clínico e alta taxa de comorbidades. Dessa forma, a intervenção cirúrgica faz parte das possibilidades terapêuticas desses pacientes ¹⁸.

Quadro 2. Recomendação para tratamento da obesidade estratificado pelo índice de massa corpórea, de acordo com a publicação do National Institute of Health ¹⁹

Tratamento	Índice de massa corpórea(kg/m ²)				
	25 a 26,9	27 a 29,9	30 a 34,9	35 a 39,9	≥ 40
Hábitos de vida*	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Farmacoterapia	Não	Comorbidade	Comorbidade	Sim	Sim
Cirurgia	Não	Não	Não	Comorbidade	Sim

*Dieta, exercício e terapia comportamental. Fonte: National Institute of Health, 2000¹⁹

A cirurgia bariátrica é o tratamento mais eficaz para obesidade grave e está associada a redução das principais comorbidades e do risco de mortalidade. Entretanto, como todo o procedimento invasivo, não está livre de riscos e complicações. Nesse sentido, a abordagem clínica (de hábitos de vida e farmacoterapia) deve ser a primeira opção para o tratamento da obesidade e suas comorbidades, devendo o tratamento cirúrgico ser considerado mediante seu insucesso após, pelo menos, dois anos de seu início. Os critérios de indicação cirúrgica incluem ainda: idade entre 18 e 65 anos (exceto casos selecionados); história de obesidade de longa duração; comprometimento do paciente em modificar hábitos de vida ^{20, 21}.

Conforme consenso da Sociedade Brasileira de Cirurgia Bariátrica e Metabólica (SBCBM) e do Conselho Federal de Medicina (CFM), existe indicação absoluta de cirurgia bariátrica nos pacientes com obesidade grave (grau III). Nos pacientes com obesidade grau II (IMC > 35), deve-se avaliar as comorbidades associadas para indicação cirúrgica. Já naqueles com obesidade grau I, pode haver indicação de cirurgia metabólica quando houver falha no controle das comorbidades, apesar do uso de arsenal farmacológico e demais estratégias clínicas ²².

No Brasil, o Conselho Federal de Medicina reconhece cinco técnicas cirúrgicas para o tratamento da obesidade: a gastrectomia vertical (GV) ou sleeve gastrectomy, a DGYR, a banda gástrica ajustável (BGA), a derivação bileopancreática ou cirurgia de Scopinaro e a derivação bileopancreática com switch duodenal (BPD/DS) ²². Tradicionalmente, essas técnicas cirúrgicas

bariátricas dividem-se em três categorias: restritivas, disabsortivas e mistas. Dentre elas, a DGYR é a técnica mista mais consagrada mundialmente. Recentemente, esta foi ultrapassada pela gastrectomia, em números absolutos, mas permanece a técnica bariátrica mais realizada no Brasil ²².

A técnica de DGYR consiste na redução do reservatório gástrico e no desvio do duodeno e jejuno proximal do trânsito alimentar, abaixo a ilustração deste procedimento (Figura 1) ^{1,2,23}. Brevemente, cria-se uma pequena câmara gástrica, chamado *pouch* gástrico, com capacidade de aproximadamente 30 mL a 50 mL, responsável pelo componente restritivo. Essa pequena câmara gástrica é separada do restante do estômago e anastomosada ao jejuno proximal isolado em Y (daí a origem do nome, sendo Roux o cirurgião criador da técnica). O estômago remanescente, o duodeno e os primeiros centímetros de jejuno ficam permanentemente excluídos do trânsito alimentar. A partir da anastomose jejuno-jejunal, que é o encontro da alça alimentar e da alça bilio-pancreática, encontra-se a alça comum, onde a absorção dos nutrientes acontece ^{22,23}.

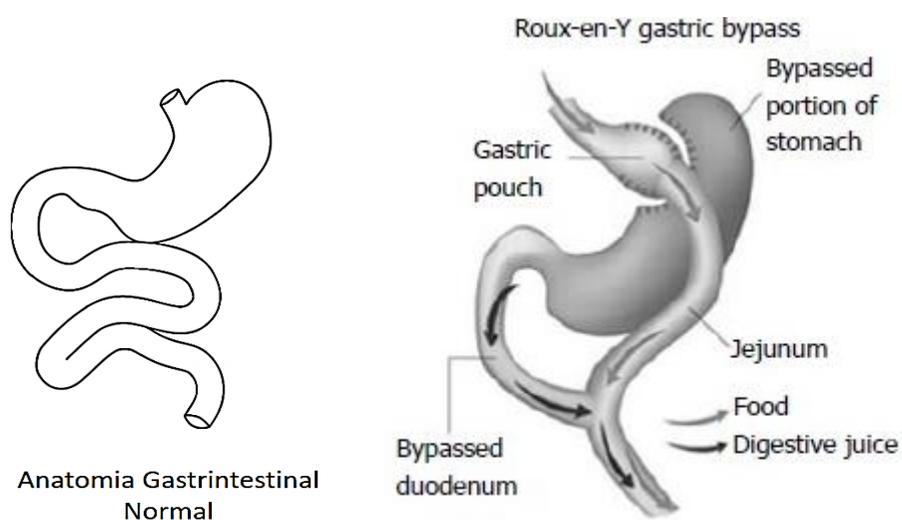


Figura 1. Mudanças anatômicas induzidas pela derivação gástrica a Y de Roux

Legenda: Anatomia gastrointestinal normal (à esquerda) e alterada (à direita) após a técnica cirúrgica bariátrica mista derivação gástrica a Y de Roux (DGYR). Modificado de (Ceneviva, 2016) e (Lupoli et al., 2017) ^{24,25}.

2.3 Deficiência nutricional após DGYR

Em que pese os benefícios da DGYR, as mudanças anatômicas e alimentares a ela atribuídas podem contribuir para a ocorrência de deficiências em macro e micronutrientes, a curto, médio e longo prazo^{9,25-28}. A obesidade, por si só, é frequentemente acompanhada por deficiências nutricionais subclínicas, que podem ser agravadas após DGYR. No entanto, existem poucos dados sobre o estado nutricional de pacientes obesos candidatos à DGYR. Por outro lado, o elevado risco de desenvolver distúrbios nutricionais após diferentes tipos de cirurgia bariátrica é bastante documentado e segue a seguinte ordem de relevância: banda gástrica ajustável < gastrectomia vertical < derivação gástrica em Y-de-Roux < derivação biliopancreática²⁶.

Particularmente, deficiências de vitaminas estão entre as complicações mais comuns de cirurgias bariátricas. No fim do primeiro ano pós-operatório observa-se deficiência de vitaminas em cerca de 50% dos casos^{1,2,25,26}. Dada a frequente prevalência de deficiências nutricionais em indivíduos obesos, a adequada avaliação e abordagem nutricional de pacientes bariátricos deve ser iniciada no pré-operatório, quando ainda candidato ao procedimento cirúrgico. Nesse período, o paciente deve ainda receber informações e material detalhado sobre os estágios dietéticos de 8 a 2 semanas que ocorrem no pós-operatório²⁹ (Quadro 3).

Quadro 3. Estágios da dieta no pós-operatório

Fases dietéticas	Duração (dias)	Data de início no pós-operatório
Líquida clara	1-2	1-2
Totalmente líquida	10-14	2-16
Pastosa	10-14+	16-30
Branda	≥14	30-60
Regular	-	60

Fonte: American Society for Metabolic and Bariatric Surgery³⁰.

A estimativa do consumo de nutrientes auxilia a detecção precoce de ingestão nutricional deficiente e faz parte do monitoramento nutricional pós-cirurgia bariátrica. Ao lado de dosagens laboratoriais, para afirmar que há consumo adequado de folato faz-se necessário obter o registro alimentar de 7

dias - método de referência para avaliação da ingestão de alimentos ^{31,32}. Como o nome indica, essa ferramenta permite avaliar a ingestão alimentar detalhada de 7 dias sequenciais e fornece uma média mais próxima dos hábitos alimentares reais de um indivíduo. Suas principais limitações incluem a necessidade de alfabetização do indivíduo e um intervalo mínimo de 7 dias para obtenção de dados ^{31,32}.

As Sociedades Americanas de Obesidade e de Cirurgia Metabólica e Bariátrica sugerem a suplementação de vitaminas após todos os tipos de operações bariátricas; entretanto, a dose e o tipo de suplementos prescritos podem depender do tipo da técnica cirúrgica empregada ^{4,33}. No pós-operatório, a suplementação de vitaminas deve ser iniciada 1 a 2 dias após a cirurgia, através de multivitamínicos que apresentem 100% dos valores diários necessários de, pelo menos, 2-3 dos micronutrientes. Doses superiores às definidas pela RDA (*Recommended Dietary Allowances*) podem ser necessárias ³⁰.

2.4 Vitamina B9 - Folato

Folato vem do grego “folium”, que significa folha. Também conhecido como vitamina B9, folato é o termo genérico que designa um grupo de compostos quimicamente semelhantes e hidrossolúveis que podem ser convertidos a metiltetrahydrofolato (a forma metabolicamente ativa da vitamina B9): o ácido fólico e seus derivados 5-formiltetrahydrofolato (5-FTHF, o ácido folínico), 5-metiltetrahydrofolato (5-MTHF), 10-formil-THF, 5,10-metileno-THF e THF não substituído. Folatos na forma de monoglutamato não ocorrem naturalmente na natureza (sintéticos) e, portanto, são encontrados apenas em suplementos vitamínicos e em alimentos fortificados; já os folatos na forma de poliglutamato (com dois a oito resíduos de ácido glutâmico) são encontrados naturalmente nos alimentos, em formas metabolicamente ativas no organismo ³⁴.

O ácido fólico é um membro sintético do folato, solúvel em água e composto pela ligação de duas unidades principais: um grupo pteroil e um ácido glutâmico (Figura 2A). Constitui a forma mais oxidada e estável da vitamina B9, mas, por não ser ativo como uma coenzima, precisa passar por várias etapas metabólicas dentro da célula para ser convertido a THF. Ao contrário do folato

sintético, o ácido fólico é prontamente convertido em THF, sem exigir ação enzimática (Figura 2B). Entretanto, sua cadeia de poliglutamato deve ser removida pela enzima conjugase intestinal, para sua absorção e transporte, via veia porta ³⁵. Por essa razão, a forma monoglutamato do folato tem biodisponibilidade muito maior que sua forma poliglutamato, sendo descrito que 0,6 mcg de ácido fólico equivale a 1 mcg de folato da alimentação ^{36,37}. O 5-MTHF é a forma biologicamente ativa mais abundante do folato, ao representar mais de 90% de sua concentração plasmática (Figura 2C).

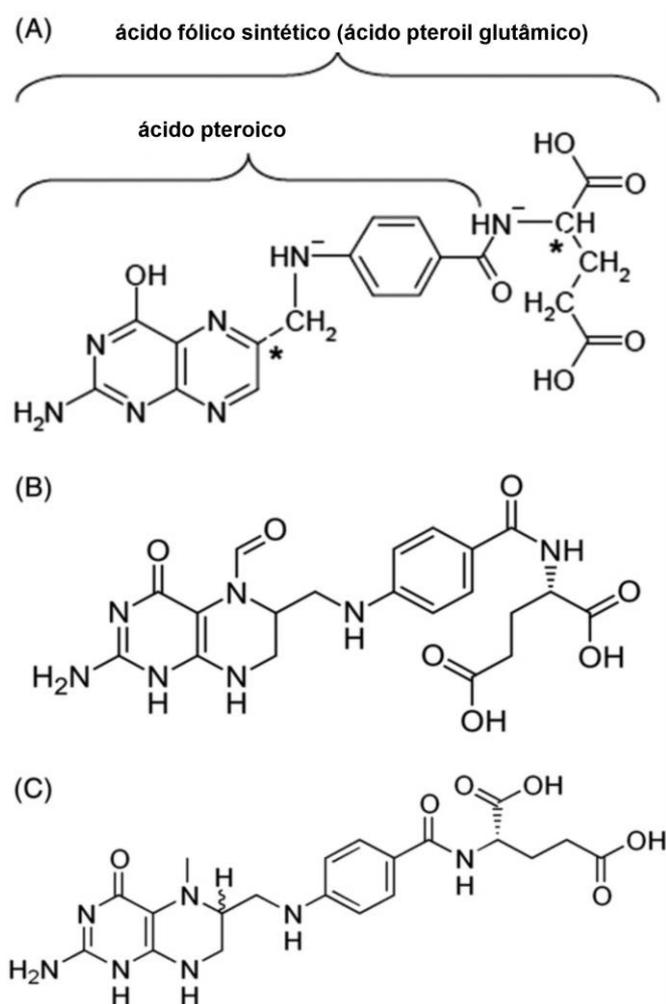


Figura 2. Estrutura do ácido fólico (A) e seus derivados, ácido fólico (B) e L-5-metiltetra-hidrofolato (C). Adaptado de (Scaglione, 2014) ³⁴

Folatos naturais são majoritariamente encontrados em vísceras, carnes, ovos, feijão e vegetais de folhas verdes escuras, como espinafre, aspargo, repolho e brócolis. A biodisponibilidade do folato da dieta é menor que 50% ^{9,36}.

Devido à sua estabilidade química e maior disponibilidade comercial, em comparação à forma natural de folato, o ácido fólico é a forma do folato mais comumente empregada em suplementos e fortificação de alimentos ³⁵. A partir do ano de 2004, farinhas de trigo e milho passaram a ser enriquecidas com ácido fólico, de acordo com a determinação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) ^{9,36}.

Os alimentos fornecem folato, em sua maior parte, na forma “vinculada”, ou seja, combinada a uma sequência de aminoácidos (glutamato), conhecido como poliglutamato. O intestino absorve a forma de folato “livre” – folato com apenas um glutamato ligado (monoglutamato). Por isso, no processo de absorção, a forma de poliglutamato é hidrolisada para formar monoglutamato pela enzima folipoli-gama-glutamato carboxipeptidase (FGCP ou GCPII), uma exopeptidase que está ancorada na membrana apical dos enterócitos ^{9,36,38}. Esta primeira etapa do metabolismo do folato ocorre na mucosa intestinal ³⁴ e encontra-se ilustrada de maneira resumida na Figura 3.

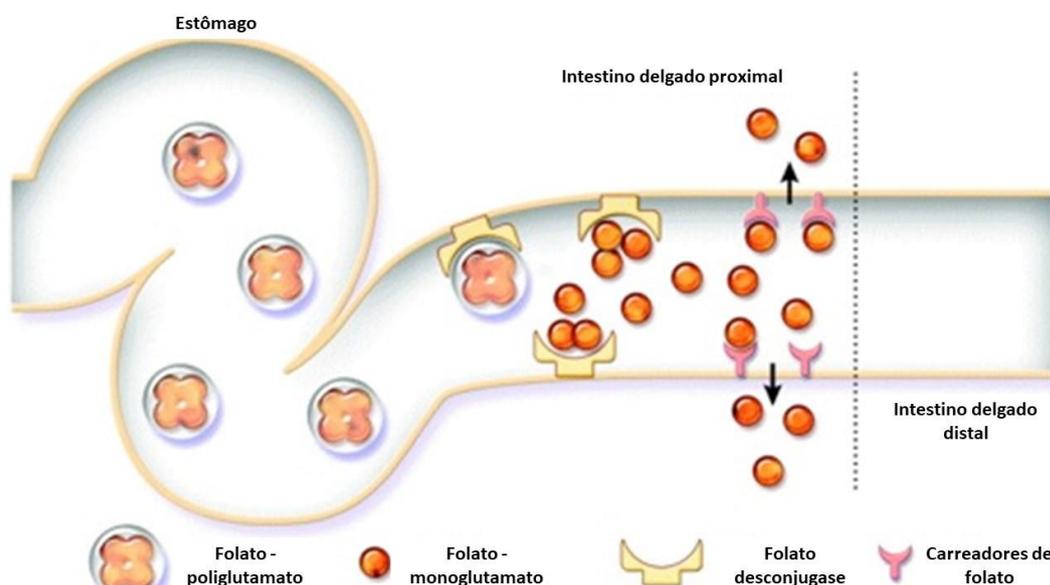


Figura 3. Poliglutamatos hidrolisados em monoglutamatos para serem transportados, adaptado de (Litwack, 2008) ³⁹

A absorção do folato da dieta ocorre no intestino delgado, principalmente no duodeno e no jejuno proximal. O folato em forma de monoglutamato é transportado através do enterócito por meio da ação de transportadores específicos, o que requer pH ideal entre 5,5 e 6,0 ⁴⁰. Graças à sua característica

hidrofílica, a captação celular de folato emprega três sistemas de transporte: (1) o transportador de folato acoplado a prótons (PCFT), (2) o transportador de folato reduzido (RFC1) e (3) os receptores de folato (FOLRs), também chamados de proteínas de ligação ao folato ⁴¹. O PCFT é postulado como sendo o principal mecanismo de transporte de folato no trato intestinal superior ³⁵. Após seu transporte, os monoglutamatos são reduzidos a di- e tetrahydrofolato (THF) pelas enzimas redutase. Na próxima etapa, o THF é convertido em 5,10-metilenotetrahydrofolato e 5-MTHF. De lá, eles são transferidos para a veia porta hepática e à circulação sanguínea sistêmica ³⁵. O esquema descrito até este ponto encontra-se ilustrado na Figura 4.

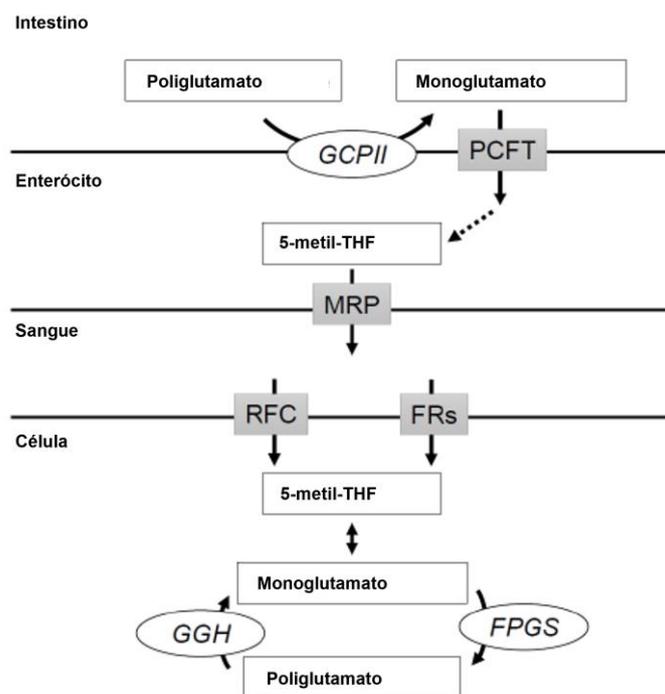


Figura 4. Absorção, transporte e captação celular de folato. Adaptado de (Ebara, 2017) ⁴²

Legenda: (GCP II) glutamato carboxipeptidase II; (FPGS) folilpoli-gama-glutamato sintetase; (GGH) gama-glutamil hidrolase; (PCFT) transportador de folato acoplado a prótons; (MRP) proteína associada à resistência a múltiplas drogas; (RFC) portador de folato; (FRs) receptores de folato.

Após a absorção do folato pela circulação portal, principalmente na forma de monoglutamato, parte dele pode ser metabolizado a derivados do poliglutamato. O folato intracelular é convertido em poliglutamato pela enzima folilpoliglutamato sintase FPGS - ATP dependente. Esta é uma maneira de aprisionamento metabólico, que impede a perda celular de folato, por meio de

transportadores de efluxo, uma vez que o poliglutamato é um substrato melhor do que o monoglutamato para enzimas intracelulares dependentes de folato. O poliglutamato é armazenado no fígado e parte pode ser lançada à circulação. As reservas normais de folato no organismo variam de 5 a 10 mg, dos quais aproximadamente metade encontram-se no fígado ^{9,36,38}.

Através de transportadores de alta e baixa afinidade, o folato é conduzido do local de absorção para células da medula óssea, reticulócitos, fígado, fluido cerebrospinal e células tubulares renais. Esse processo ocorre contra um gradiente de concentração, o que sugere ser um transporte ativo. Após absorção celular, a maior parte do monoglutamato é reduzida e metilada, aparecendo na circulação, principalmente, na forma de 5-metil-THF. Essa forma é necessária para a remetilação da homocisteína à metionina e formação do THF, reação que depende da coenzima metil-B12, da enzima MTR e da FAD ^{10,11}. O folato é excretado na urina e na bile em formas metabolicamente ativas e inativas. Parte do folato secretado na bile pode ser reabsorvido no intestino, pela circulação entero-hepática ^{10,11}.

No ciclo do folato, o THF recebe um grupamento metil da serina, na presença da enzima serina hidroxil-metiltransferase (SHMT) e da vitamina B6, formando 5, 10 metileno-THF e glicina. Este pode ser usado na síntese de timidina, sendo convertido a di-hidrofolato (DHF), que posteriormente será reduzido a THF pela di-hidrofolato redutase (DHFR). O 5, 10 metileno-THF pode ainda ser convertido a 5,10-metenil-THF, 10-formil-THF e THF, pela ação da metilenotetra-hidrofolato redutase (MTHFR) - uma enzima citoplasmática trifuncional, também chamada de 5,10-metilenotetra-hidrofolato desidrogenase ou 5,10-meteniltetra-hidrofolato ciclodrolase ou 10-formiltetra-hidrofolato sintase ^{10,11, 39}.

Ambas DHFR e MTHFD1 são enzimas dependentes de nicotinamida-adenina difosfato (NADP⁺). A DHFR desempenha importante atividade na conversão do ácido fólico sintético à forma fisiologicamente ativa de folato, ao reduzir ácido fólico para DHF e, desta maneira, permitir o uso dessa vitamina pelas células ⁴³. A MTHFD1 é essencial para a síntese do DNA, provendo 10-formil-THF e 5,10-metileno-THF, para síntese *de novo* de purinas e timidilato

^{10,11,39}. Na biossíntese de ácidos nucleicos, as coenzimas ligadas ao folato atuam na transferência de unidades de carbono para síntese de metionina (metil, -CH₃), doadora de grupos metil para metilação do DNA ¹⁰. Portanto, o folato pode influenciar a metilação do DNA e, posteriormente, os padrões de expressão de genes. Em semelhança, há relatos de que intervenções como a cirurgia bariátrica possam modular os perfis de metilação, em diferentes tipos de tecidos ⁴⁴.

2.4 Deficiência de Folato após DGYR

A deficiência de folato afeta, aproximadamente, 38% dos pacientes submetidos à DGYR ^{1-2,26-27}. Esta foi relatada em 11,4% e 6,4% dos pacientes incluídos em estudo que avaliou os períodos de 1 mês e 12 meses após DGYR, respectivamente ⁴⁵. Os pacientes desse estudo foram suplementados com 200 mcg de ácido fólico. Por outro lado, alguns estudos não relatam deficiência de folato após DGYR; entretanto, estes incluem a suplementação pós-operatória de ácido fólico em quantidades maiores que 200 mcg.

Pesquisadores avaliaram a ocorrência da deficiência de folato antes e após DGYR, porém o déficit deste micronutriente ainda se mostra variável não sendo encontrado na presença de suplementação ⁴⁶.

Vários marcadores têm sido utilizados para caracterizar a deficiência de folato no organismo, como sua concentração no soro, plasma e nos eritrócitos, ou com marcadores funcionais (homocisteína total e ácido metilmalônico). A concentração sérica de folato pode ser alterada pelo consumo alimentar nos dias anteriores à coleta do sangue, por isso, tem sido recomendada a determinação concomitante do folato eritrocitário, que é um indicador das concentrações dessa vitamina em médio prazo (cerca de três meses) ^{47,48}.

Procedimentos que associam técnicas restritivas e disabsortivas, como a DGYR, podem limitar a ingestão, digestão e absorção de vitaminas ²⁸. Nesse cenário, a deficiência de folato pode decorrer do consumo inadequado e absorção diminuída dessa vitamina, ou ainda do aumento de suas necessidades. Adiciona-se que, atrofia gástrica, acloridria e gastrectomia também estão associadas com má absorção de folato ⁵. Sinais de deficiência deste

micronutriente incluem anemia megaloblástica, leucopenia, trombocitopenia, glossite e elevados níveis de homocisteína⁹⁻¹¹.

Em indivíduos com o TGI íntegro recomenda-se a ingestão diária de 65 a 600 mcg de folato^{31,32}, que deve ser preferencialmente obtido a partir da alimentação. No entanto, em pacientes submetidos à cirurgia bariátrica justifica-se a suplementação nutricional, ao se desconhecer se a oferta de nutrientes é plenamente aproveitada pelo organismo^{49,50}. A Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia determinou recomendações para a profilaxia e tratamento das deficiências de vitaminas mais comuns após a cirurgia bariátrica, das quais, aquelas referentes à suplementação de ácido fólico estão descritas no Quadro 4⁵¹.

Quadro 4. Principais recomendações diárias para a prevenção e tratamento da deficiência de ácido fólico após cirurgia bariátrica

Vitamina	Prevenção (oral)	Tratamento (oral)
Folato	400-800 mcg 800-1.000 mcg, para gestantes	1.000 mcg até atingir níveis normais e manutenção destes com dose de prevenção

Fonte: American Association of Clinical Endocrinology⁵²

Em semelhança a qualquer deficiência nutricional, a deficiência de folato deve ser diagnosticada e corrigida precocemente, tanto no pré- quanto no pós-operatório de cirurgia bariátrica. O exame físico nem sempre é suficiente para tal diagnóstico, devendo sempre estar associado a exames laboratoriais. Os protocolos de acompanhamento e intervenção nutricional devem ser realizados durante a internação hospitalar e, após a alta, na primeira ou segunda semana e nos primeiro, segundo, terceiro, sexto, nono e décimo segundo meses pós-operatórios. Após os 12 meses, as revisões podem ser anuais, exceto em situações especiais, em que houver necessidade de maior frequência de avaliações²⁹.



Objetivo

4. OBJETIVO

4.2 Objetivo primário

Avaliar a resposta transcriptômica à DGYR de genes envolvidos no metabolismo intestinal de folato e sua associação com níveis dietéticos e circulantes desse micronutriente, em mulheres obesas



Materiais e métodos

5. MATERIAS E MÉTODOS

5.1 Local de execução do trabalho

O presente estudo foi conduzido no Laboratório de Nutrição e Cirurgia Metabólica do Aparelho Digestivo (LIM-35) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), em parceria com a Unidade de Cirurgia Bariátrica e Metabólica do HC-FMUSP e o Serviço de Endoscopia Gastrointestinal do HC-FMUSP.

5.2 Aspectos éticos

Este estudo foi realizado de acordo com as normas éticas da Declaração de Helsinki. Seu protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) (CAPPesq1011/09), CONEP - Plataforma Brasil (19339913.0.0000.0068) e registrado em www.ClinicalTrials.gov (NCT01251016). Todos os pacientes selecionados assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, antes de sua inclusão no estudo.

5.3 Casuística

O presente estudo clínico, prospectivo e autocontrolado (pareado) faz parte do estudo SURMetaGIT ¹², estudo clínico que envolveu 20 mulheres adultas (18-60 anos), obesas [índice de massa corporal (IMC) > 35 kg/m²], recrutadas na Unidade de Cirurgia Bariátrica e Metabólica do HC-FMUSP, entre fevereiro de 2011 à dezembro de 2014. Foram critérios de exclusão para as participantes: infecção por *Helicobacter pylori*, uso de probióticos e/ou prebióticos, diagnóstico de doenças da tireoide ou hepáticas; submissão à outra técnica cirúrgica bariátrica e participação atual ou recente em outro protocolo de estudo intervencionista. No total, o SURMetaGIT ¹² recrutou 507 pacientes, até a obtenção das 20 pacientes que se enquadravam nos critérios de inclusão descritos (Figura 5). O tamanho da amostra foi estimado baseado em testes paramétricos (ANOVA) e não paramétrico (Wilcoxon signed-rank teste), que calcularam uma amostra de 20 participantes, com poder de 80% para a detecção de efeitos teciduais e sistêmicos da DGYR, e um valor alfa estimado de 0,05. Dada a elevada sensibilidade do método de microarray, uma amostra mínima de

7 pacientes tem poder de 80%, com nível de significância de 5%, para detectar diferença de 0,756 para o *fold-change* de expressão gênica, considerando desvio padrão de 0,556, segundo teste de Wilcoxon.

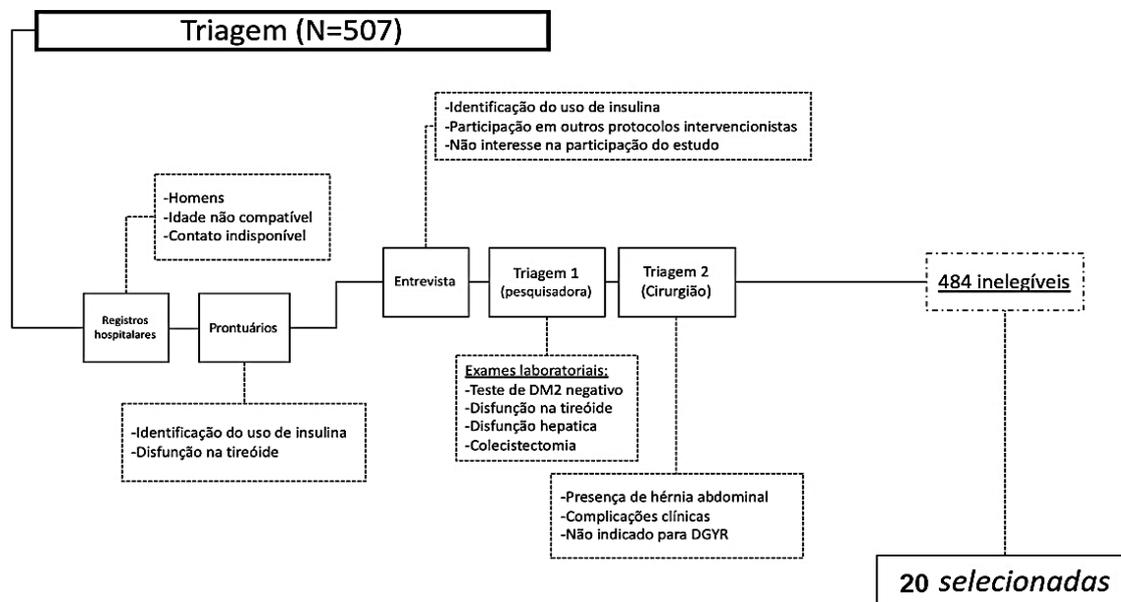


Figura 5. Fluxo de seleção de pacientes (Machado, 2018) ⁵³

Legenda: N, número de pacientes; DM2, diabetes mellitus tipo 2; DGYR, derivação gástrica em Y de Roux. Quadros pontilhados indicam fatores de não inclusão identificados ao longo do processo de triagem e seleção

5.4 Acompanhamento clínico ambulatorial

Todas as pacientes foram acompanhadas no período pré-operatório e, mensalmente, até 90 dias da DGYR. Em cada consulta foram realizadas algumas avaliações, como ilustrado na Figura 6, em ambos os períodos de acompanhamento.

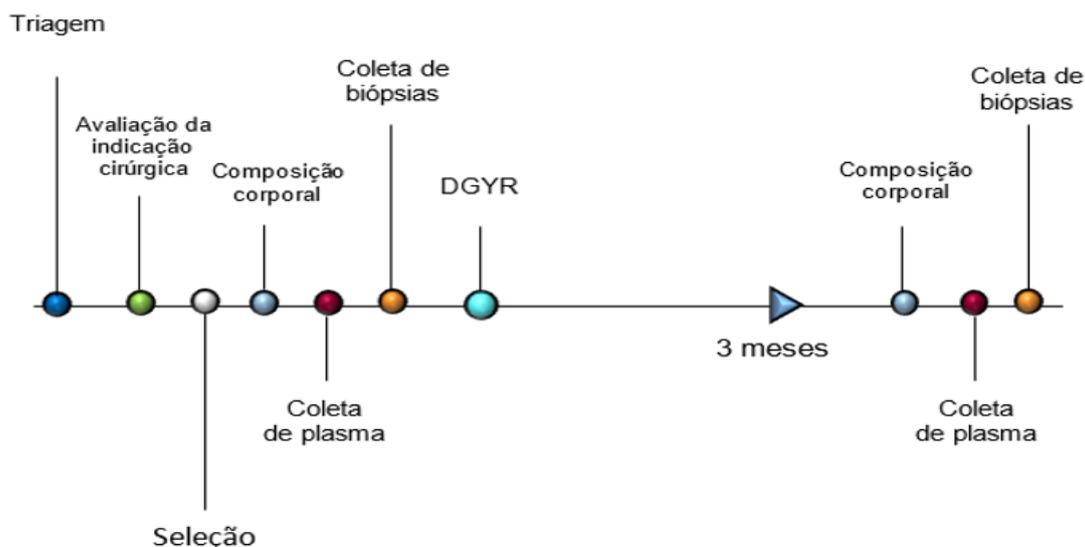


Figura 6. Desenho do protocolo do estudo (Machado, 2018) ⁵³

Legenda. Triagem: identificação do perfil das pacientes pela história clínica e pelos exames laboratoriais; Avaliação da indicação cirúrgica: avaliação clínica do cirurgião em consulta ambulatorial e discussão da indicação cirúrgica pela equipe da divisão de cirurgia bariátrica e metabólica do HC-FMUSP; Seleção: seleção das pacientes dentro do perfil determinado pelos critérios inclusão e assinatura do TCLE; Composição corporal: aferição de medidas antropométricas e avaliação de consumo alimentar; Coleta de plasma: coleta de plasma após jejum de 12 horas, com preparo de alíquotas e armazenamento em -80°C ; Coleta de biópsias: coleta de biópsias por enteroscopia anterógrada de duplo balão, congelamento imediato em nitrogênio líquido e armazenamento em -80°C . DGYR: intervenção cirúrgica.

As consultas para avaliação de composição corporal e consumo alimentar, assim como as coletas de plasma e de biópsias, foram repetidas após 3 meses do procedimento cirúrgico.

5.5 Cirurgia bariátrica

Todas as pacientes foram submetidas à DGYR, por meio de laparotomia, realizada na Unidade de Cirurgia Bariátrica e Metabólica (HC-FMUSP). A técnica cirúrgica realizada não contou com anel de silicone. Houve a redução do volume do estômago, através da realização de uma bolsa gástrica proximal com aproximadamente 30 mL de capacidade, excluindo o resto do estômago, duodeno e jejuno proximal do fluxo de nutrientes. Conforme o presente protocolo, os tamanhos das alças intestinais foram padronizados em cada uma das

intervenções cirúrgicas; a alça biliopancreática de 50-60 cm e alça alimentar de 100-120 cm ¹².

5.6 Dados antropométricos

As medidas antropométricas do presente estudo foram aferidas no pré-operatório e pós-operatório de 3 meses de cirurgia. O peso atual (kg) foi mensurado em balança eletrônica para indivíduos obesos, com carga máxima 500 kg e divisão 100 gramas (Lucastec®, Brasil). Durante este procedimento, as pacientes vestiram apenas roupas leves. A altura foi medida com auxílio de estadiômetro (Sanny®, American Medical do Brasil), com a paciente em pé, com os pés descalços, calcanhares unidos, costas eretas e os braços estendidos ao lado do corpo. Para o cálculo do IMC foi utilizada a fórmula: peso (kg)/altura (m)².

5.7 Ingestão alimentar

Para avaliação da ingestão alimentar, as pacientes registraram seu consumo alimentar durante 7 dias consecutivos (incluindo um final de semana), no pré-operatório e pós-operatório de 3 meses. A quantidade de alimento consumido foi registrada em medidas caseiras (por exemplo, colheres, copos), tomando-se como referência ilustrações de um livro padronizado (“Consumo alimentar: Visualizando Porções”) ⁵⁴, que foi oferecido para todas as pacientes. As pacientes anotaram na ficha de registro alimentar de 7 dias o número da foto correspondente ao tamanho da porção alimentar ingerida em cada refeição.

A quantidade de folato ingerida (mcg/d) foi calculada a partir dos dados do registro alimentar de 7 dias, através do software brasileiro Virtual Nutri Plus®. Para esse cálculo, utilizaram-se as seguintes tabelas de composição alimentar: Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO) e Sônia Tucunduva ⁵⁵.

A ingestão habitual de folato foi então calculada pelo método *Multiple Source Method* (MSM), na plataforma desenvolvida pelo Departamento de Epidemiologia do Instituto Alemão de Nutrição Humana Potsdam-Rehbrücke (DIfE)© 2008-2021 Versão 1.0.1 online. Este método é caracterizado por uma técnica que estima a probabilidade de ingestão individual de cada nutriente, seguido do cálculo da ingestão habitual individual de cada um desses nutrientes nos dias de consumo e, por fim, multiplicado os valores obtidos nos passos

anteriores para obter a ingestão diária habitual reduzindo as variações inter e intraindividuais ⁵⁶. Além disso, foi aplicada a técnica de ajustamento de energia (regressão linear), favorecendo a acurácia do método ⁵⁷⁻⁵⁹.

Por fim, o cálculo de adequação do consumo de folato foi baseada na necessidade média estimada (*Estimated Average Requirements* - EAR) da Ingestão Dietética de Referência (*Dietary Reference Intakes* - DRIs) para o folato (mulheres: 320 mcg por dia) ^{60,61}. Destaca-se que não foi prescrita ou orientada uma dieta específica em nenhum dos períodos de acompanhamento, foram avaliados apenas os hábitos alimentares das pacientes, incluindo o consumo de suplementos alimentares prescritos pela equipe médica.

5.8 Obtenção das amostras

5.8.1 Plasma

Nos períodos pré-operatório (n = 17) e pós-operatório de 3 meses (n = 16), amostras de sangue periférico foram coletadas por enfermeira treinada, sob condições de jejum (12 horas) e com o auxílio de tubos de coleta tratados com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). Imediatamente após a coleta e, o plasma foi obtido por centrifugação (Eppendorf® 5804R) - 2.800 rpm 10 min, 4°C. O plasma sobrenadante foi transferido para microtubos, em pequenas alíquotas, e mantido em -80°C até a análise. A análise quantitativa de folato foi realizada por Eletroquimioluminescência (ECLIA) ⁶², em laboratório clínico especializado (Salomão Zoppi Diagnósticos) e de acordo com as instruções do fabricante ⁶³.

5.8.2 Biópsias Intestinais

Exame de enteroscopia de duplo balão (EDB) foi realizado no Serviço de Endoscopia Gastrointestinal (HC-FMUSP), cerca de duas semanas antes e 3 meses depois da DGYR. As pacientes compareceram em jejum de 12 horas e se abstiveram do uso de drogas orais durante 3 a 5 dias antes do procedimento, para evitar qualquer impacto dos medicamentos orais na expressão gênica no intestino. Durante o exame, foram coletadas biópsias de mucosa intestinal do duodeno, jejuno e íleo (aproximadamente 15-20 mg de cada segmento) e estas foram imediatamente armazenadas em nitrogênio líquido. No exame pré-

operatório, os locais de coleta das biópsias gastrointestinais, foram marcados por tinta nanquim SPOT®, o que permitiu coletar biópsias próximas a esses mesmos locais nos exames pós-operatórios (Figura 7).

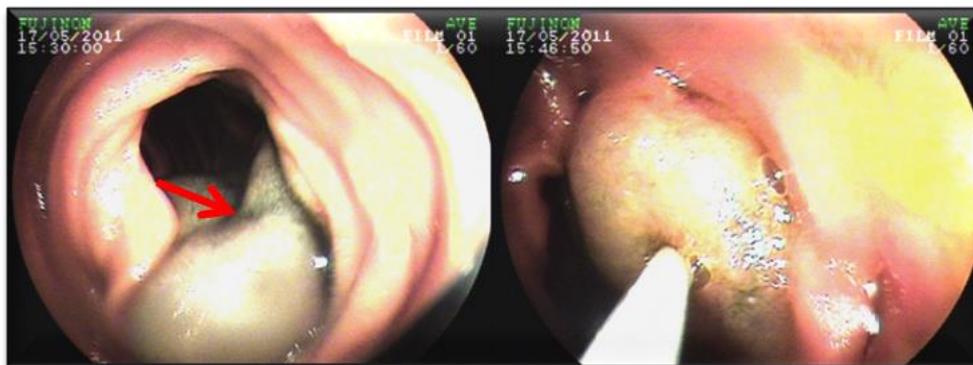


Figura 7. Marcação da mucosa intestinal com tinta nanquim (seta vermelha) durante o exame pré-operatório

5.9 Análise do Transcriptoma

As biópsias intestinais foram submetidas à extração e purificação do RNA total, com uso do Kit RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen™, USA) e de acordo com as instruções de seu fabricante. A concentração de RNA total foi obtida pela leitura da absorbância nos comprimentos de onda de 260 e 280 nM, em espectrofotômetro NanoDrop (ND-1000™ *Spectrophotometer*, NanoDrop Technologies, USA), sendo a pureza avaliada pela razão 260/280. Foram consideradas amostras de pureza adequada quando os valores dessa razão se situavam entre 1,8 e 2,1. A análise de integridade do RNA foi averiguada por meio de aparelho de eletroforese, Bionalyzer (Model 2100; *Agilent Technologies*, CA, USA), que detecta biomoléculas pela fluorescência induzida pelo laser. A imagem de um eletroferograma foi gerada e a qualidade das amostras foi identificada pelo valor de RIN (*RNA Integrity Number*), o qual varia de 0 a 10 em ordem crescente de integridade.

5.9.1 Análise transcriptoma por Microarray

A expressão de genes relacionados à via do metabolismo intestinal de folato foi avaliada pelo método de *microarray*, utilizando-se o *Human Gene Chip 1.0 ST Array* (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA), de acordo com as orientações

do fabricante. Somente as amostras com quantidade de RNA (> 100 ng/uL) e qualidade adequada de RNA (RNA Integrity Number - RIN \geq 7) para biópsias pré e pós-operatórias pareadas (da mesma paciente) foram incluídas na análise de *microarray*.

5.9.2 Análise transcriptoma alvo por RT-qPCR

A fim de possibilitar a validação dos dados de transcriptômica, realizou-se a técnica de reação em cadeia de polimerase quantitativa (RT-qPCR). Para tal, síntese e purificação de DNA complementar (cDNA) foram obtidas a partir de 1 micrograma das amostras de RNA previamente processadas, utilizando o kit comercial *High Capacity cDNA Reverse Transcription*TM Kits com inibidor de RNase (*Applied Biosystems*, USA).

O uso de gene endógeno como forma de controle em reações de RT-qPCR é necessário para assegurar qualidade da análise, em nosso grupo realizou-se estudo piloto no qual o gene Beta-actina (ACTB) foi selecionado como mais adequado em comparação aos genes 18S, Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) e beta 2 mioglobulina (B2M)⁶⁴.

Os genes diferencialmente expressos (DEGs) relacionados às vias do metabolismo (transporte e síntese) do folato identificados pela análise global de *microarray*, após a correção para taxa de descoberta falsa (FDR), foram identificados usando o método de produtos de classificação (RP) ($p < 0,05$) e foram avaliados por RT-qPCR em duplicada biológica, utilizando ensaios Taqman® (*Applied Biosystems*, USA), e sua leitura foi realizada no equipamento *7500 Fast*TM *Real-Time PCR* (*Life Technologies*, USA).

Por utilizarmos ensaios Taqman® (Thermo Fisher Scientific) pré-desenhados não foi necessário realizar customizações nas sequências dos primers. Este sistema foi selecionado, por sua compatibilidade e melhor reprodutibilidade em aparelho *7500 Fast*TM *Real-Time PCR*.

Todos os genes avaliados no presente trabalho foram selecionados com a classificação *Best coverage*, a cobertura de sequência descreve o número médio de leituras que alinham bases de referência conhecidas. Em níveis mais altos de cobertura, cada base é coberta por um número maior de leituras de

sequências alinhadas, de modo que a chamada base pode ser feita com maior grau de confiança.

O parâmetro *Assay Location* indica em que posição no genoma a sonda TaqMan® está desenhada, utilizando como parâmetro a sequência correspondente na base de dados de verificação da sequência completa RefSeq (Banco de dados NCBI Reference Sequence) [Apêndice 1].

A figura 8 ilustra as diferentes etapas realizadas para a execução das análises transcriptômicas do presente estudo.

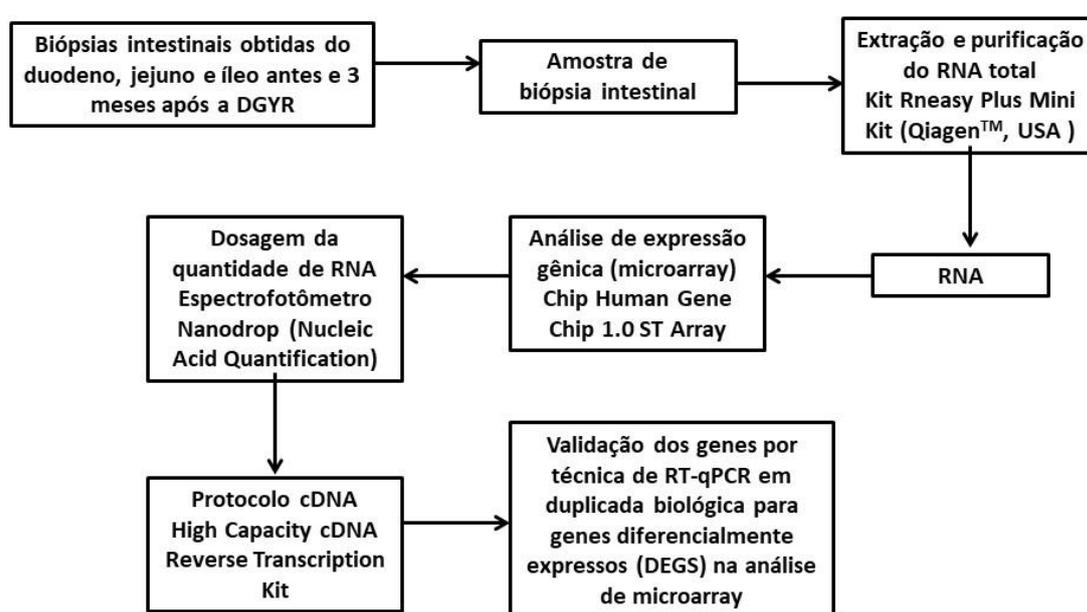


Figura 8. Fluxograma da Análise do Transcriptoma

5.10 Análises estatísticas

O presente estudo propõe avaliar alterações transcriptômicas intestinais após 3 meses da DGYR, para tal, foi comparada a expressão gênica nos períodos pré e pós-operatório da referida cirurgia. Em adição, realizou-se comparação das informações clínicas e bioquímicas das pacientes em ambos períodos. Todos os resultados foram analisados em conjunto e submetidos aos testes estatísticos pertinentes de acordo com a distribuição da amostra para determinar adequadamente as alterações entre os períodos analisados.

Análises descritivas foram sumarizadas através de frequências, mediana e intervalo interquartil (IQR). Para a comparação de grupos, foi utilizado o teste

t de student, para variáveis normais (teste de shapiro-wilk) e teste não paramétrico de *Mann-Whitney*, quando a hipótese de normalidade não foi identificada.

Para avaliação dos resultados de expressão gênica provenientes das análises global e alvo, o *fold-change* (FC) foi aplicado para determinar as alterações relativas e para descrever o tamanho do efeito e a direção das alterações dos genes. Esta medida é frequentemente usada em análise de expressão gênica, pois descreve a diferença entre o valor final e o valor inicial dividido pelo valor inicial. Esta formulação tem as seguintes classificações: nenhuma mudança quando FC for igual a zero, um aumento de 100% é igual a 1 (positivo) e uma redução de 100% quando FC for igual a -1 (negativo) ⁶⁵.

Para a comparação dos valores Δ RT-qPCR no momento pré-operatório e após 3 meses do procedimento foi utilizado o teste de Wilcoxon para medidas pareadas. Comparações múltiplas ajustadas pelo método de Bonferroni foram aplicadas para comparar o FC observado nos três sítios anatômicos estudados.

Para correlação dos dados de concentração plasmática e consumo alimentar de folato com as alterações na expressão gênica observadas no presente estudo foi utilizada correlação de Spearman considerando o grau de correlação muito forte (0,9-1,0), forte (0,7-0,9) ou moderadas (0,5-0,7) como biologicamente relevantes ⁶⁶.

Todos os testes de hipóteses realizados foram bicaudais com valores-p inferiores a 5% denotando significância estatística. As análises foram realizadas com o auxílio do software Rstudio 1.3.959 (<https://www.rstudio.com>).

6 RESULTADOS

6.1 Descrição da amostra

A amostra estudada foi composta por 20 pacientes, com idade mediana de 46,5 anos e variação de 33 a 59 anos. O IMC mediano foi de 46,4 (IQR 44-48,6) no momento do procedimento cirúrgico, quando a maioria das pacientes apresentava IMC acima de 45 Kg/m². Após 3 meses da DGYR, o percentual de perda de peso mediano foi de 17,7% (variação:12,6%-22,9%) e a maioria das pacientes (75%) apresentava IMC entre 35-44 Kg/m² (Tabela 1).

Tabela 1. Dados descritivos das 20 pacientes incluídas no estudo, avaliadas antes e 3 meses após derivação gástrica em Y de Roux

Idade, mediana (IQR)	46,5 (43,0-52,0)
IMC pré-operatório, mediana (IQR)	46,4 (44,0-48,6)
35 – 39 Kg/m ²	3 (15%)
40 – 44 Kg/m ²	4 (20%)
≥ 45 Kg/m ²	13 (65%)
IMC pós-operatório, mediana (IQR)	38,5 (36,3-40,6)
30 – 34 Kg/m ²	4 (20%)
35 – 39 Kg/m ²	8 (40%)
40 – 44 Kg/m ²	7 (35%)
≥ 45 Kg/m ²	1 (5%)
Perda de peso (%), mediana (IQR)	17,7 (16,5-18,7)

Legenda: IQR = intervalo interquartil; IMC = Índice de Massa Corporal; Kg= quilogramas; m² = metro quadrado.

6.2 Ingestão de folato

O consumo dietético de folato diminuiu significativamente 3 meses após DGYR, em comparação ao período pré-operatório ($p = 0,001$), conforme pode ser observado na Tabela 2. De acordo com o cálculo de adequação de consumo do folato, nenhuma paciente atingiu a necessidade média estimada (EAR) no pré-operatório e no pós-operatório de 3 meses da DGYR, em ambos os períodos de análise o consumo diário de folato foi abaixo dos 320 mcg recomendados na EAR. Além disso, não houve registro de qualquer suplementação contendo folato, que tivesse sido prescrita ou consumida pelas pacientes em ambos os períodos estudados.

Tabela 2. Consumo de folato no pré-operatório e pós-operatório de 3 meses de derivação gástrica em Y de Roux

Folato (μg)	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor p
Pré-Op	20	132,78	126,55	104,6	182	0,001
Pós-Op 3 m	20	89,21	76,55	8,6	166	

Legenda: Dados obtidos pela aplicação de registro alimentar de 7 dias (R7d). Diferenças significativas encontram-se destacadas em negrito (teste de Wilcoxon; $p \leq 0,05$). μg = micrograma; Pré-Op = pré-operatório; Pós-Op 3 m = pós-operatório de 3 meses; n = número amostral;

6.3 Concentração plasmática de folato

Conforme descrito na Tabela 3, no pós-operatório de 3 meses de DGYR observou-se redução significativa das concentrações plasmáticas em jejum de folato, quando comparado ao período pré-operatório ($p = 0,006$).

Tabela 3. Concentração plasmática de folato em condições de jejum, no pré-operatório e após 3 meses da DGYR

Ácido fólico (ng/ml)	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor p
Pré-Op	17	14,78	13,40	8,99	30,20	0,006
Pós-Op 3 m	16	9,09	8,13	4,69	16,45	

Legenda: Diferenças significativas encontram-se destacadas em negrito (teste de Wilcoxon; $p \leq 0,05$). ng/ml = nanogramas por mililitro; Pré-Op = pré-operatório; Pós-Op 3m = pós-operatório 3 meses; n = número amostral.

6.4 Expressão de genes intestinais

O sucesso da coleta de biópsias pareadas (nos períodos pré e pós-operatórios do mesmo paciente) de cada segmento intestinal foi de 85% ($n = 17$) no duodeno, 100% ($n = 20$) no jejuno e de 90% ($n = 18$) no íleo. A partir dessas biópsias obtivemos RNA com qualidade adequada para as análises transcriptômicas globais em 14 amostras pareadas de duodeno, 16 do jejuno e 12 do íleo. Os valores expressos em *fold-change* das análises global e alvo estão descritos na Tabela 4. Oito genes envolvidos na via do folato estiveram alterados em diferentes regiões intestinais, nas análises global (*microarray*) e alvo (RT-qPCR). Na comparação pós-operatório vs. pré-operatório, observou-se validação da expressão de *SLC19A1*, *SLC46A1*, *ABCC5*, *MTHFD1*, *MTHFD2* e

TYMS no duodeno, SLC19A1, SLC46A1, FOLR2 e ABCC5 no jejuno e SLC19A1, SLC46A1, FOLR2, ABCC5 e MTHFD1 no íleo. Os ensaios específicos para os genes de interesse encontram-se descritos no Apêndice 1.

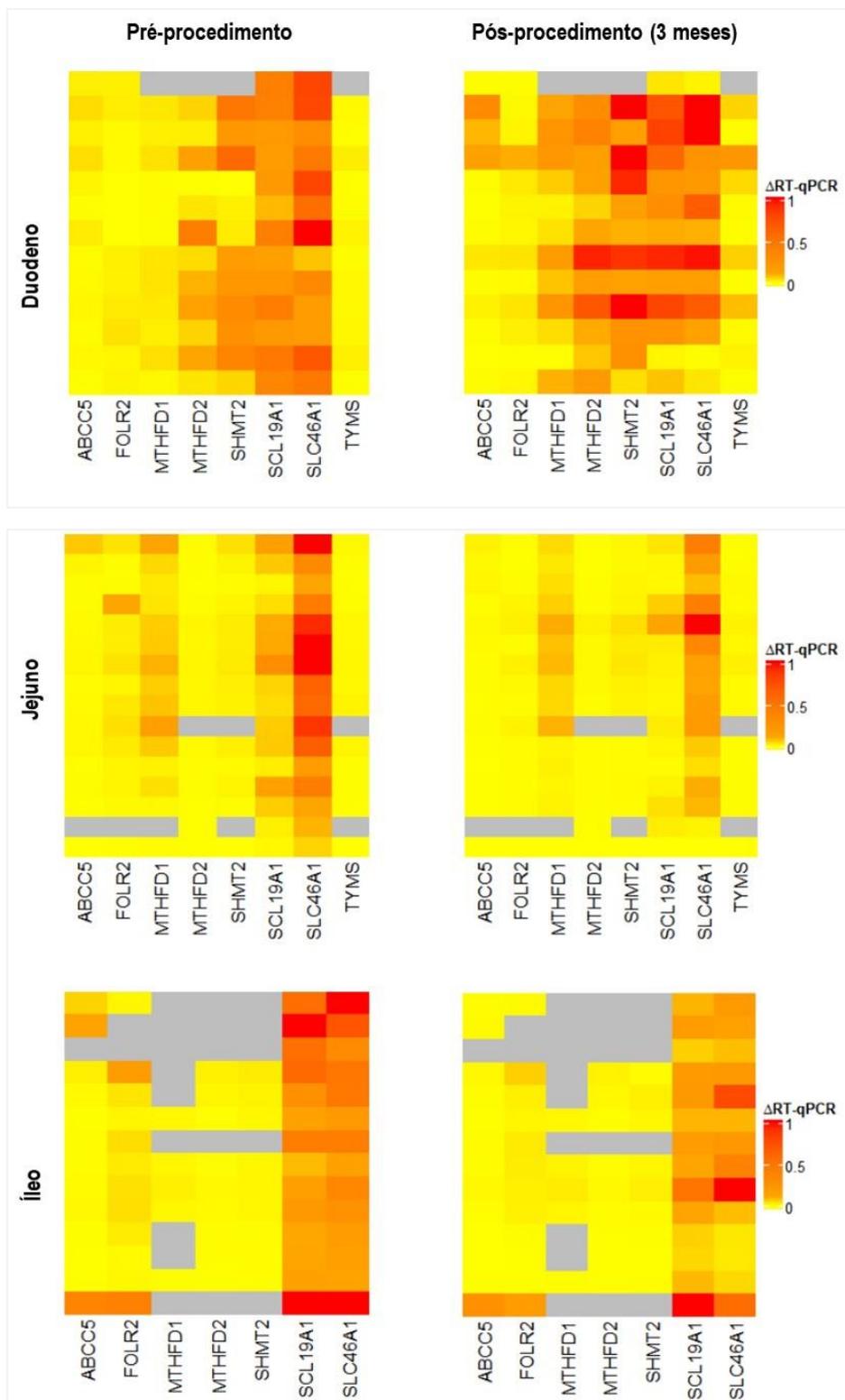
Tabela 4. Expressão global (*microarray*) e alvo (RT-qPCR) de genes envolvidos na via do folato em tecidos intestinais

	Gene	Técnica	Segmentos		
			Duodeno	Jejuno	Íleo
Genes de transporte	SLC19A1	Microarray	-0,42 ^{v1}	-0,66 ^{v1}	-0,22 ^{v1}
		RT-qPCR	-0,30 ^{v1}	-1,96 ^{v1}	-1,12 ^{v1}
	SLC46A1	Microarray	-0,44 ^{v1}	-0,76 ^{v1}	-0,61 ^{v1}
		RT-qPCR	-1,47 ^{v1}	-2,07 ^{v1}	-1,24 ^{v1}
	FOLR2	Microarray	-0,28	-0,41 ^{v1}	-0,16 ^{v1}
		RT-qPCR	1,96	-1,92 ^{v1}	-1,18 ^{v1}
ABCC5	Microarray	-0,27 ^{v1}	-0,18 ^{v1}	-0,14 ^{v1}	
	RT-qPCR	-0,10 ^{v1}	-1,03 ^{v1}	-1,22 ^{v1}	
Genes de biossíntese	MTHFD1	Microarray	0,33 ^{v1}	0,28	0,36 ^{v1}
		RT-qPCR	2,13 ^{v1}	-0,80	0,16 ^{v1}
	MTHFD2	Microarray	0,38 ^{v1}	0,25	0,25
		RT-qPCR	1,98 ^{v1}	-0,63	-0,45
	SHMT2	Microarray	NA	0,20	0,31
		RT-qPCR	1,96	-0,61	-0,32
	TYMS	Microarray	0,33 ^{v1}	0,40	0,43
		RT-qPCR	1,18 ^{v1}	-0,64	NA

Legenda: valores expressos em *fold-change* (pré-operatório vs. pós-operatório 3 meses); em negrito= alterações significativas na análise global e alvo; valor negativo = diminuição da expressão gênica; valor positivo = aumento da expressão gênica; NA = não foi avaliado v1= genes que foram qualitativamente validados

Os valores medianos e intervalo interquartil da expressão alvo (Δ RT-qPCR) de genes envolvidos na via do folato em tecidos intestinais sugerem um aumento significativo na expressão mediana de MTHFD1 no duodeno, acompanhada de reduções significativas de FOLR2, SLC19A1 e SLC46A1 no jejuno, e redução de MTHFD2 e SLC46A1 nas amostras do íleo (Figura 9), os dados completos dos (Δ RT-qPCR) estão disponíveis no Apêndice 2.

Figura 9. Mapas de calor da expressão gênica basal e 3 meses após o procedimento (Δ RT-qPCR)



Legenda: Representação gráfica, através de mapas de calor da expressão de Δ RT-qPCR antes e 3 meses após o procedimento cirúrgico, nas três diferentes porções intestinais estudadas. Amostras em cinza estavam ausentes na referida análise.

As alterações transcriptômicas observadas sugerem que duas vias principais do metabolismo do folato parecem ser afetadas pela DGYR: via do transporte (ABCC5, FOLR2, SLC46A1 e SLC19A1) e via da biossíntese de folato (MTHFD1, MTHFD2, SHMT2 e TYMS).

O *fold-change* dos genes envolvidos na via da biossíntese de folato diferiu significativamente entre os três sítios intestinais estudados. No duodeno, foi possível observar valores médios positivos para todos os genes envolvidos na via de biossíntese de folato, a despeito dos valores de *fold-change* negativos observados nas amostras de jejuno e íleo. Notadamente o *fold-change* observado nas amostras obtidas no duodeno impulsionou o resultado positivo observado para o conjunto de genes relacionados a biossíntese de folato (Tabela 5 e Figura 10).

Conforme descrito na Tabela 5, análises de *fold-change* do agrupamento dos genes envolvidos em cada via mostraram uma sub-representação da via de transporte intestinal de folato ($-1,02 \pm 2,47$), consoante com uma super-representação da via de biossíntese intestinal de folato ($0,32 \pm 2,24$) $p < 0,001$. Além disso, a redução da expressão do conjunto de genes envolvidos na via do transporte intestinal de folato ocorreu, principalmente, pela redução na expressão dos genes SLC46A1 e SLC19A1, embora sem significância estatística (Figura 10).

Tabela 5. Fold-change médio da expressão gênica 3 meses após a realização do procedimento

Via	<i>Fold-change</i> Média (DP)
Via Transporte (agrupado)	-1,02 ± 2,47
ABCC5	-0,79 ± 1,89
FOLR2	-0,44 ± 3,39
SLC46A1	-1,62 ± 2,31
SLC19A1	-1,18 ± 1,97
Via Biossíntese (agrupado)	0,32 ± 2,24
MTHFD1	0,45 ± 2,38
MTHFD2	0,28 ± 2,09
SHMT2	0,35 ± 2,36
TYMS	0,20 ± 2,20

Legenda: Dados expressos em média ± desvio-padrão.

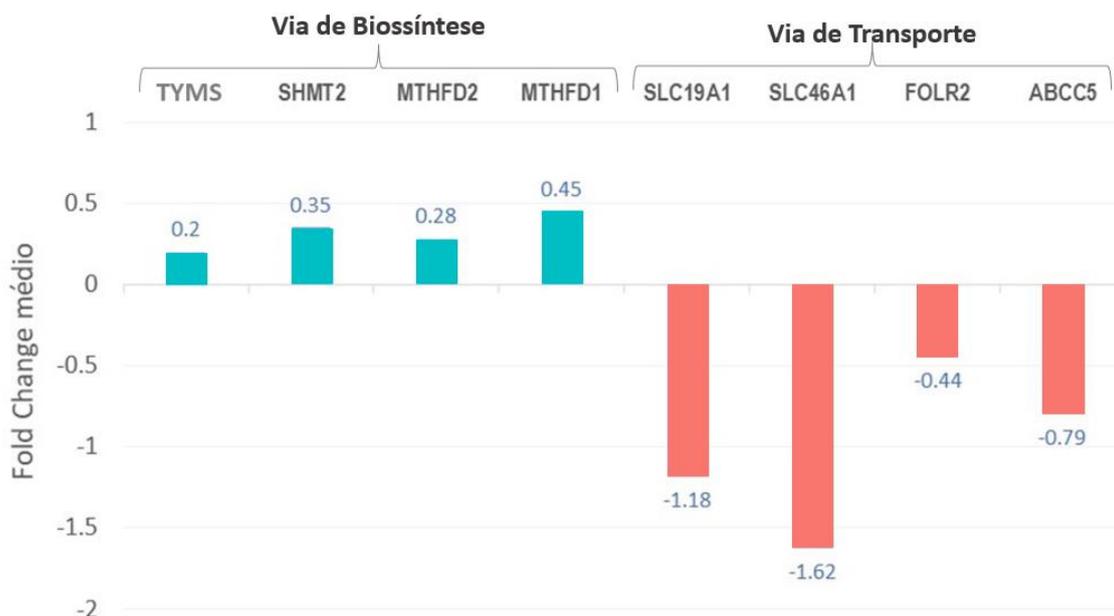


Figura 10. *Fold-change* médio nas três porções intestinais (duodeno, jejuno e íleo), segundo cada gene envolvido nas vias de biossíntese e transporte intestinais de folato

6.5 Correlações

O Quadro 5 apresenta a matriz de correlações entre a concentração plasmática de folato, consumo alimentar de folato e expressão de genes relacionados ao metabolismo intestinal de folato, nos três segmentos intestinais. A concentração plasmática de folato e os genes *FOLR2* e *SHMT2* apresentaram correlação inversamente proporcional nas amostras do duodeno.

Quadro 5. Matriz de correlação entre o *fold-change* nos segmentos intestinais duodeno, jejuno e íleo com a concentração plasmática e consumo alimentar de folato

Segmento	Folato / Gene	ABCC5	FOLR2	SLC46A1	SLC19A1	MTHFD1	MTHFD2	SHMT2	TYMS
	Duodeno	Concentração plasmática	0,02	-0,84#	0,08	-0,35	-0,39	-0,30	-0,65*
Consumo alimentar		-0,01	-0,07	-0,23	-0,11	-0,21	-0,01	-0,08	-0,10
Jejuno	Concentração plasmática	0,50	-0,16	-0,15	-0,27	-0,37	-0,27	-0,38	-0,33

	Consumo alimentar	0,26	0,22	0,31	0,21	0,16	0,14	0,28	0,23
íleo	Concentração plasmática	0,15	-0,42	-0,07	0,42	-	-0,46	0,21	-
	Consumo alimentar	0,12	0,23	0,37	0,25	-	0,27	0,02	-

Legenda: #p<0,01, *p<0,05

O Quadro 6 resume os principais achados do presente estudo.

Quadro 6. Resumo das alterações transcriptômicas envolvidas no metabolismo intestinal do folato, de níveis dietéticos e plasmáticos desse micronutriente e das correlações entre essas variáveis, observadas após 3 meses de derivação gástrica a Y de Roux

Variável	Genes de transporte	Genes de biossíntese	Consumo alimentar	Níveis plasmáticos	Correlações (DEGs)
Folato	↓	↑	↓	↓	FOLR2* SHMT2*

Legenda. ↑, aumento significativo; ↓, diminuição significativa. *Correlação com níveis plasmáticos de folato, moderada (*Sperman*) e inversamente proporcional. DEGs: genes diferencialmente expressos



Discussão

7. DISCUSSÃO

7.1 Da contribuição científica

As mudanças anatômicas do TGI induzidas por DGYR modificam padrões dietéticos (ao menos quantitativamente) e impõem novas condições fisiológicas de digestão e absorção de alimentos. Essas mudanças estão associadas às deficiências nutricionais observadas, que constituem as complicações mais comuns da DGYR ⁶⁷. Resultados parciais do estudo clínico SURMetaGIT revelaram alterações transcriptômicas intestinais como contribuinte mecanicista potencial para as deficiências nutricionais pós DGYR, ao impactar o metabolismo intestinal de nutrientes e, possivelmente, seus níveis sistêmicos ^{12,68,69}. Entretanto, alguns dos resultados transcriptômicos também sugerem importante capacidade plástica do intestino para se adaptar às novas condições fisiológicas a ele impostas e tentar minimizar as depleções nutricionais ⁶⁹.

Como parte do estudo SURMetaGIT ¹², a presente pesquisa identificou diminuição na expressão de genes que codificam transportadores intestinais de folato e aumento na expressão de genes relacionados à sua biossíntese intestinal, após DGYR. Essas mudanças na expressão gênica foram observadas em curto prazo da cirurgia e ocorreram em paralelo com a diminuição da ingestão e dos níveis plasmáticos de folato.

Até onde vai nosso conhecimento, o impacto da DGYR na expressão de genes envolvidos no metabolismo intestinal de folato ainda não havia sido estudado em humanos. Nossos dados sugerem que a diminuição da expressão de genes envolvidos no transporte intestinal de folato pode se somar à menor área intestinal resultante do procedimento cirúrgico e acentuar sua característica mal absorptiva, contribuindo para a depleção sistêmica desse micronutriente. Sugerem ainda um mecanismo transcriptômico de adaptação intestinal à cirurgia, com o objetivo de compensar a menor ingestão dietética de folato imposta por seus procedimentos restritivos. Essa hipótese é apoiada pela correlação inversa observada entre as concentrações plasmáticas de folato e a expressão de *SHMT2*, envolvido na via de biossíntese endógena dessa vitamina

Nesse sentido, nossos dados reforçam a importância da suplementação de folato em indivíduos candidatos à DGYR. Em paralelo, podem estimular o desenho de novas terapias direcionadas ao intestino para evitar ou minimizar a deficiência sistêmica de folato nesses pacientes.

7.2 Dos métodos

Estudos disponíveis em humanos pouco exploram a biologia molecular de tecidos-alvo nas deficiências nutricionais de vitaminas, como a B9, após cirurgias bariátricas. A escassez de dados nesta área de pesquisa é justificada pelo carácter invasivo da coleta de biópsias intestinais. Além disso, as alterações anatômicas decorrentes da DGYR dificultam o acesso ao local anatômico para biópsia. Portanto, um dos principais desafios técnico-científicos enfrentado no presente trabalho foi a coleta de biópsias gastrointestinais. Para ultrapassá-lo, optou-se pelo uso de endoscopia de duplo-balão, por via oral, e desenhou-se um protocolo de anestesia específico para seu desenvolvimento.

A excelente experiência do Serviço de Endoscopia Digestiva do HC-FMUSP, reconhecida internacionalmente, foi decisiva para viabilizar a coleta de biópsias intestinais antes e após DGYR ⁷¹. Nenhuma complicação foi relatada após os procedimentos de endoscopia de duplo-balão. Entretanto, algumas biópsias de duodeno (15%) e íleo (10%), não puderam ser coletadas em algum dos períodos estudados. Além disso, apenas amostras pareadas no pré e pós-operatório do mesmo paciente foram consideradas para as análises de transcriptômica intestinal. O desenho autocontrolado de análise, em que o paciente é controle dele mesmo, é o ponto forte das análises transcriptômicas, mas também limita o número de biópsias analisadas.

Em adição às perdas de biópsias durante sua coleta e pareamento (pré-operatório e pós-operatório do mesmo paciente), a técnica de *microarray* de análise de expressão gênica global exige alto grau de integridade do RNA, o que pode implicar em perda de biópsias. No presente trabalho, o total de biópsias analisadas [duodeno (n=14), jejuno (n=16) e no íleo (n=12)] foi inferior ao número originalmente previsto (n = 20). Entretanto, dada a elevada sensibilidade do método de *microarray*, a análise de uma amostra mínima de 7 biópsias pareadas

foi capaz de identificar *fold-changes* de expressão intestinal com significância de 5%, de acordo com cálculo por teste de Wilcoxon.

As análises de *microarray* permitiram identificar alteração de mais de 4800 genes nos segmentos intestinais: duodeno (n = 1279), jejuno (n = 2126) e íleo (n = 1463) ⁶⁴. Dentre os DEGs identificados, oito se relacionaram com as vias de metabolismo intestinal do folato, o que sugere representatividade dessa via no contexto da resposta transcriptômica global do intestino à DGYR. O agrupamento desses DEGs de acordo com sua função destacou a sub-representação da via de transporte e a super-representação da via de biossíntese intestinal de folato. As informações detalhadas dos oito genes estudados encontram-se descritas na Tabela 6.

O presente estudo logrou validar os oito DEGs envolvidos no metabolismo intestinal de folato, identificados pelo rastreamento transcriptômico intestinal global, por análise alvo. Para isso, empregou a técnica de RT-qPCR, extensamente adotada pela literatura científica em estudos de expressão gênica ⁷². Desacordos entre observações levantadas por *microarray* e RT-qPCR são comuns e alguns autores definem "validação" como um acordo quantitativo (grau semelhante de mudança) ou qualitativo (direção) entre ambas essas técnicas ⁷³. Com efeito, na presente pesquisa, alterações de expressão gênica foram consideradas biologicamente relevantes quando quantitativa ou qualitativamente similares entre as técnicas.

Tabela 6. Características dos oito genes relacionados às vias de metabolismo intestinal do folato diferencialmente expressos no intestino de mulheres obesas após 3 meses de derivação gástrica em Y de Roux

Gene	Função
SLC19A1	Transportador de folato e está envolvido na regulação das concentrações intracelulares de folato ^{64,74}
SLC46A1	Este gene codifica uma proteína transportadora de folato que facilita o movimento de substratos de folato através das membranas celulares, em ambientes de pH ácido. Esta proteína também é expressa no cérebro e no plexo coróide onde transporta folato para o sistema nervoso central. Esta proteína também funciona como transportador em enterócitos duodenais e potencialmente em outros tecidos como fígado e rim. A sua

localização na membrana apical ou no citoplasma das células intestinais é modulada pelos níveis de ferro na dieta ^{64,75}

FOLR2 A proteína codificada por este gene é um membro da família de receptor do folato (FOLR). Os membros desta família de genes têm alta afinidade pelo folato e por vários derivados deste nutriente reduzido e eles medeiam a entrega de 5-metiltetrahidrofolato para o interior das células ^{75,76}

ABCC5 A proteína codificada por este gene é membro da superfamília de transportadores de ligação ATP (ABC). As proteínas ABC transportam várias moléculas através de membranas extra e intracelulares ⁷⁷

MTHFD1 Este gene codifica uma proteína que possui três atividades enzimáticas distintas, 5,10-metilenetetrahidrofolato desidrogenase, 5,10-metentiltetra-hidrofolato ciclo-hidrolase e 10-formiltetra-hidrofolato sintetase ^{39,78,79}

MTHFD2 Este gene codifica uma enzima mitocondrial com atividades de metilenetetrahidrofolato desidrogenase e metentiltetra-hidrofolato ciclo-hidrolase ^{80,81}

SHMT2 Este gene codifica a forma mitocondrial de uma enzima dependente de fosfato de piridoxal (vitamina B6 ativa) que catalisa a reação reversível de serina e tetrahidrofolato em glicina e 5,10-metileno tetrahidrofolato. O produto codificado é principalmente responsável pela síntese de glicina ⁸²

TYMS A timidilato sintase catalisa a metilação de desoxiuridilato em desoxitimidato utilizando 5,10-metilenetetra-hidrofolato (metileno-THF) como cofator. Esta função mantém o pool de dTMP (timidina-5-prime monofosfato) crítico para replicação e reparo de DNA ⁸³

Legenda. em vermelho: genes com expressão significativamente diminuída após DGYR; em verde: genes com expressão significativamente aumentada após DGYR

O presente estudo logrou ainda incluir alguns cuidados adicionais no desenho de seu protocolo, que merecem ser destacados: 1. A interferência de variáveis que reconhecidamente (infecção por *H. pilory*)⁸⁴ ou potencialmente (uso de probióticos) podem influenciar a expressão gênica foi devidamente neutralizada pelos critérios de exclusão; 2. o tamanho das alças biliopancreática e alimentar praticadas no ato cirúrgico foi padronizado, visto que variações em seus tamanhos podem influenciar a perda de peso, absorção de nutrientes e resposta metabólica à DGYR ⁸⁵⁻⁸⁷; 3. as amostras de sangue foram coletadas no

mesmo período que a coleta de biópsias, para realizar o adequado cruzamento de dados; 4. realizou-se marcação com tinta nanquim nas regiões do intestino em que foram praticadas as biópsias pré-operatórias, para que no pós-operatório as novas amostras fossem obtidas a partir de regiões próximas; 5. as análises de ingestão de folato incluíram o método de ajustamento de energia (regressão linear), para eliminar o tamanho corporal, atividade física, eficiência metabólica e balanço energético como fatores de confusão, neutralizando potencialmente sua interferência nas diferenças de ingestão energética entre indivíduos ⁵⁷⁻⁵⁹.

7.3 Dos resultados

Deficiências nutricionais em indivíduos obesos podem acontecer mesmo antes da cirurgia bariátrica ⁸⁸. Cerca de 58% dos indivíduos obesos consomem folato abaixo das recomendações da EAR (320mcg/dia). Relata-se que a deficiência pré-operatória de folato pode ocorrer em 1 a 32% dos indivíduos candidatos à cirurgia bariátrica. Essas observações corroboram com o padrão dietético identificado no presente estudo, de consumo habitual médio de folato de 132,78 mcg/dia no período pré-operatório. No período pós-operatório, a redução de tamanho da câmara gástrica pode agravar déficits prévios ou gerar novos déficits de folato. Em concordância, no presente estudo, a deficiente ingestão de folato observada no pré-operatório foi agravada em curto prazo (3 meses) pós-DGYR, onde se observou ingestão média de 89,21 mcg/dia dessa vitamina.

As observações acima descritas sugerem que concentrações circulantes deficientes de folato, frequentemente observadas após DGYR, advenham, ao menos em parte, de sua baixa ingestão pré- e pós-operatória ^{2,4}. Entretanto, após DGYR, os nutrientes ingeridos são desviados de grande parte do estômago, duodeno e jejuno proximal ⁸⁹. A anastomose da alça biliopancreática com o jejuno permite o escoamento de metabólitos, como ácidos biliares e secreções pancreáticas, que se misturam aos nutrientes ingeridos no jejuno (canal comum). Essas alterações anatômicas reduzem a superfície intestinal que permanece em contato com o alimento e a fisiologia digestiva natural do órgão, o que pode reduzir a absorção de nutrientes e também contribuir para a deficiência pós-operatória de folato.

Resultados preliminares do estudo SURMetaGIT sugerem que, ao lado de alterações restritivas e de mal absorção, alterações transcriptômicas no tecido intestinal induzidas por DGYR também podem influenciar o metabolismo local de nutrientes e, potencialmente, seus níveis sistêmicos. Por exemplo, em um estudo, parte do SURMetaGIT, revelou diminuição da ingestão de ácidos graxos poli-insaturados após DGYR, bem como de níveis plasmáticos dos ácidos graxos alfa-linolênico e eicosapentaenoico, da família ômega-3 ⁶⁸. Curiosamente, essas alterações ocorreram em paralelo com a diminuição da expressão intestinal de *FADS1*, que codifica uma enzima chave da biossíntese endógena de ácidos graxos poli-insaturados, incluindo o ácido eicosapentaenoico.

Em adição, alterações no metabolismo da cobalamina (vitamina B12) também foram identificadas em estudo parte do SURMetaGIT. Observou-se que a DGYR pode afetar diferentes genes envolvidos no metabolismo de cobalamina e impactar suas concentrações circulantes. Observou-se, como potencial contribuinte, a redução do gene *TCN1* (que codifica o transportador intestinal de cobalamina). Em paralelo, a expressão de *CUBN* (que codifica o receptor intestinal de cobalamina) aumentou significativamente, sugerindo uma reprogramação genética adaptativa do tecido intestinal, com o objetivo de compensar o transporte intestinal prejudicado de B12 ⁶⁹.

Os resultados preliminares do metabolismo de cobalamina observados em desmembramento do SURMetaGIT foram fisiologicamente similares aos encontrados no presente estudo. Observou-se sub-representação de genes envolvidos na via de transporte de folato, ao lado de super-representação de genes envolvidos na sua biossíntese (potencial mecanismo compensatório) após DGYR (vs. período pré-operatório). Ademais, a expressão dos genes *FOLR2* (que codifica receptor de folato) e *SHMT2* (que codifica proteína envolvida na biossíntese de folato) apresentou correlação inversamente proporcional com concentrações plasmáticas de folato.

Distinto do que ocorre para *SMHT2*, a correlação inversa com *FOLR2* por nós observada parece não fazer sentido biológico; contudo, em estudo parte do SURMetaGIT envolvendo a cobalamina, a expressão aumentada de seu

receptor intestinal foi interpretada como um processo adaptativo compensatório: quanto menor a disponibilidade do nutriente, mais o intestino vai tentar captá-lo ao aumentar a expressão de seus receptores. A mesma interpretação poderia ser estendida para as observações do presente estudo. Digno de nota, o metabolismo do folato e de cobalamina são similares e se cruzam, pois a cobalamina é necessária para a conversão do ácido metiltetrahidrofólico (folato inativo) em ácido tetrahidrofólico (folato ativo) ⁹⁰.

A capacidade plástica celular e tecidual do intestino para se adaptar à nova fisiologia que lhe é imposta pela técnica de DGYR é conhecida. Ocorre mudança na morfologia e função intestinal: a presença de nutrientes parcialmente intactos no lúmen estimula o aumento da taxa de proliferação celular, comprimento de vilosidades e profundidade de criptas; enquanto a ausência do contato com nutrientes causa efeito oposto. Assim, os segmentos intestinais que permanecem em contato com o fluxo de nutrientes adaptam-se, e modificam a arquitetura da mucosa entérica; enquanto os segmentos desviados podem se atrofiar ⁹¹. O presente estudo corrobora, sendo o intestino um órgão altamente adaptável, capaz de reprogramar seu fenótipo transcriptômico para compensar potenciais prejuízos na ingestão e transporte de folato, em resposta à alteração anatômica intestinal pela DGYR. Nesse sentido, nossas observações sugerem que a capacidade plástica do intestino pode se estender em nível molecular.

O caráter pioneiro do presente estudo limita a discussão de seus resultados, dada a ausência de estudos similares para confrontar os dados obtidos. Cabe, entretanto, chamar a atenção ao significado clínico imediato de nossos resultados: a possibilidade de existir um mecanismo molecular adicional contribuinte para a deficiência pós-operatória de folato. A deficiência de folato está associada à anemia, sinal comum observado após DGYR. Segundo a Sociedade Americana de Hematologia, 33% a 49% dos pacientes submetidos a cirurgias bariátricas desenvolvem anemia até os 2 anos de pós-operatório. Além disso, a deficiência de folato foi identificada como uma das causas mais comuns de anemia, ao lado da deficiência de vitamina B12 e ferro ²⁴.

Nesse cenário, a suplementação de folato em candidatas à DGYR deve ser incentivada. Vargas-Ruiz et al. (2008)⁴⁶ não identificaram deficiência de folato em nenhum paciente sob suplementação pós-operatória padronizada com 400 mcg de ácido fólico, antes e após diversos períodos de acompanhamento de DGYR. Um outro estudo recente identificou apenas deficiência pontual e temporária de folato (4%) após 6 meses DGYR, durante um período de acompanhamento que abrangeu o pré e pós-operatório de 4 anos ⁹². Nesse estudo, os pacientes receberam a recomendação de utilizar suplemento multivitamínico com 1 mg de ácido fólico, durante o primeiro ano pós-operatório. Essas observações sugerem que a suplementação de folato pode ser eficaz para prevenir sua deficiência.



Conclusão

8. CONCLUSÃO

Nas condições da presente pesquisa, foi possível concluir que a DGYR afetou precocemente a expressão de genes relacionados à via do metabolismo intestinal do folato em mulheres obesas e essa alteração se associou, ao menos parcialmente, com níveis circulantes desse micronutriente. Em conjunto, essas alterações transcriptômicas intestinais sugerem: 1. diminuição do transporte intestinal de folato, como mecanismo adicional para sua deficiência sistêmica; 2. aumento da síntese intestinal de folato, como potencial mecanismo molecular compensatório às depleções de ingestão e transporte de folato induzidas por DGYR.



Anexos

9. ANEXOS

ANEXO A - Aprovação da Comissão de Ética para Análises de Projetos de Pesquisas do Hospital das Clínicas da FMUSP (CAPPesq)



APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 23/02/2011, **APROVOU as alterações** abaixo mencionado(s) no Protocolo de Pesquisa nº **1011/09**, intitulado: **'ALTERAÇÕES NA EXPRESSÃO GÊNICA DO TECIDO INTESTINAL E ADIPOSEO VISCERAL DE PACIENTES DIABÉTICOS TIPO 2 SUBMETIDOS À GASTROPLASTIA REDUTORA A Y-ROUX'** apresentado pelo Departamento de **GASTROENTEROLOGIA**.

Carta datada de 21/01/11:

- Adendo ao protocolo.
- Novo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.
- Mudança de título para: "Alterações na Expressão Gênica do Tecido Gástrico, Intestinal e Adiposo Visceral de Pacientes Diabéticos Tipo 2 Submetidos à Gastroplastia Redutora a Y-Roux"
- Relatório de andamento

Comentários do relator(a) : "Projeto aprovado em 11 de fevereiro de 2010. Os autores encaminham em janeiro relatório de atividades no qual salientam a inclusão, até então, de 6 pacientes no estudo. Informam a alteração do título para inclusão do tecido gástrico na amostra, bem como TCLE com as alterações grifadas."

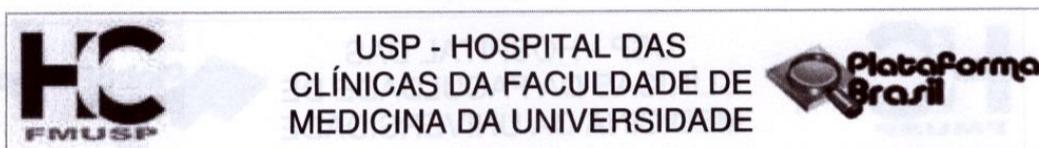
Pesquisador (a) Responsável: **Dan Llnetzky Waltzberg**

Pesquisador (a) Executante: **Priscila Campos Sala**

CAPPesq, 24 de Fevereiro de 2011

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

ANEXO B – Desmembramento do projeto temático



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ALTERAÇÕES NA EXPRESSÃO DE GENES GÁSTRICOS E INTESTINAIS EM PACIENTES DIABÉTICOS TIPO 2 APÓS GASTROPLASTIA REDUTORA A Y-ROUX

Pesquisador: Dan Linetzky Waitzberg

Área Temática: Genética Humana:

(Haverá envio para o exterior de material genético ou qualquer material biológico humano para obtenção de material genético, salvo nos casos em que houver cooperação com o Governo Brasileiro;);

Versão: 5

CAAE: 19339913.0.0000.0068

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P
FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Outros

Detalhe: Desmembramento de projeto para tese de mestrado Beatriz

Justificativa: Ilmo. Sr.

Data do Envio: 26/07/2017

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.315.501

Apresentação da Notificação:

Trata-se de notificação para solicitar desmembramento de projeto já aprovado.

Objetivo da Notificação:

Solicitar que o projeto de pesquisa já aprovado por esta comissão de pesquisa seja desmembrado em subprojeto para fins de tese de mestrado, tendo como orientador responsável: Prof. Dan Linetzky Waitzberg e a pesquisadora executante: Beatriz de Azevedo Muner Ferreira. A nova pesquisa será intitulada "A CONTRIBUIÇÃO DAS MUDANÇAS NA EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NO METABOLISMO DO FOLATO EM ADIÇÃO AO BAIXO CONSUMO ALIMENTAR

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE



Continuação do Parecer: 2.315.501

NA DEFICIÊNCIA DESSE MICRONUTRIENTE APÓS DERIVAÇÃO GÁSTRICA EM Y-ROUX".

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não haverá mudança de riscos e benefícios pois o projeto não será modificado, apenas desmembrado em subprojeto, de acordo com o pesquisador responsável.

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

Não foram apresentadas modificações no projeto.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foi apresentado carta afirmando que TCLE não será modificado e que projeto será desmembrado em subprojeto de pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não pendências ou inadequações.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	CartaDesmembramentoBeatriz.pdf	26/07/2017 21:52:27	Dan Linetzky Waitzberg	Aceito
Outros	ProjetoMestradoBeatriz.pdf	26/07/2017 21:52:42	Dan Linetzky Waitzberg	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 05 de Outubro de 2017

Assinado por:

ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

ANEXO C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M F
- DATA NASCIMENTO:/...../.....
- ENDEREÇO Nº APTO:
- BAIRRO: CIDADE:
- CEP: TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
- NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M F
- DATA NASCIMENTO:/...../.....
- ENDEREÇO: Nº APTO:
- BAIRRO: CIDADE:
- CEP: TELEFONE: DDD (.....)

II - DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA "Alterações na Expressão Gênica do Tecido Gástrico, Intestinal e Adiposo Visceral de Pacientes Diabéticos Tipo 2 submetidos à Gastroplastia Redutora a Y-Roux."
- PESQUISADOR : Priscila Campos Sala
- CARGO/FUNÇÃO: Nutricionista INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº CRN 3-21249
- UNIDADE DO HCFMUSP: CIRURGIA DO APARELHO DIGESTIVO

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

- RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO
- RISCO BAIXO RISCO MAIOR

3. DURAÇÃO DA PESQUISA : Aproximadamente 2 anos

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

1 – justificativa e os objetivos da pesquisa

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa científica que tem como objetivo avaliar se a cirurgia bariátrica melhora seu diabetes, e se essa possível melhora tem relação com a expressão de genes gástricos, intestinais e do tecido adiposo. A resposta a estas perguntas podem contribuir para o tratamento de pacientes diabéticos, a longo prazo. Este documento apresenta informações detalhadas sobre os propósitos, procedimentos, possíveis riscos ou desconfortos nela envolvidos, entre outras, para

que você possa avaliar sua possível participação. Sua participação na pesquisa é voluntária e a não aceitação deste convite não trará nenhum prejuízo a você.

2 – Descrição dos procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são *experimentais*

Para participar desta pesquisa você deverá se encaixar em alguns critérios de seleção, pré-determinados pelos pesquisadores por ela responsáveis. Caso seu médico/nutricionista decida que você preenche esses critérios e você concordar em participar da pesquisa, você deverá assinar o o termo de "consentimento pós-esclarecido" presente no final deste documento e iniciar os procedimentos envolvidos em seu protocolo de estudo: Inicialmente serão realizadas 2 enteroscopias de duplo balão, a primeira será realizada aproximadamente 1 mês antes da gastroplastia e a segunda será realizada depois de 3 meses da cirurgia. Quando realizada por profissional treinado, a enteroscopia de duplo balão é considerada um exame seguro, muitas vezes solicitado para avaliação do padrão da mucosa gastrointestinal. Nesta pesquisa, as 2 enteroscopias serão feitas para coleta de pequenos fragmentos (aproximadamente 3 milímetros) de tecido gástrico e intestinal, para análise da expressão gênica. A possibilidade de ocorrer hemorragia (sangramento) durante esse procedimento é mínima, pois os fragmentos coletados restringem-se à camada mais superficial do tecido, chamada mucosa, onde a vascularização é pequena. O risco de hemorragia é maior quando se faz uso de medicamentos que possam "afinar" o sangue, como, por exemplo, o ácido acetil salicílico. Se você faz uso de algum medicamento com esta finalidade seu médico deverá suspendê-lo 7 dias antes da realização de cada enteroscopia, exceto se esse procedimento representar qualquer prejuízo à sua saúde ou tratamento. Nesse caso, você não participará do estudo. Durante a enteroscopia é necessário que você esteja em jejum e, após ela, você receberá uma fórmula nutricional líquida industrializada com sabor de baunilha. Após cada enteroscopia será realizada uma coleta de sangue (por punção periférica da veia do antebraço) para a dosagem de hormônios. Além das enteroscopias e coletas de sangue, durante sua cirurgia seu médico irá coletar um pequeno fragmento de tecido adiposo (aproximadamente 1 grama) para análise de expressão gênica. No período pré e pós operatório (3 meses) você terá acompanhamento nutricional para avaliação do seu consumo alimentar assim como para avaliação da sua composição corporal. Durante esse acompanhamento nutricional você será orientado(a) a coletar urina de 24 horas e fezes para realização de exames laboratoriais.

3 – Desconfortos e riscos esperados

Considerando-se que os procedimentos descritos serão realizados por profissionais devidamente treinados e com experiência na sua condução, estes oferecem risco médio de trazer algum dano à sua condição clínica. O exame de enteroscopia de duplo balão é realizado frequentemente no Hospital das Clínicas e não é muito demorado. Você poderá sentir desconforto na punção da veia para o processo sedativo intravenoso. Pode acontecer desconforto abdominal, decorrente da distensão do intestino por

injeção de ar. No entanto, este desconforto será diminuído pela própria sedação, por aspiração do ar insuflado e pelo oferecimento de drogas como o "luftal" para romper as bolhas de ar e "buscopan" para eventuais cólicas. Durante a enteroscopia, a sedação utilizada será monitorada por um anestesista que utiliza sedativos e anestésicos de curta ação, que mantém o paciente dormindo em torno de 10 – 15 minutos. As coletas de sangue serão feitas com agulha e seringa descartáveis, eliminando o risco de contaminação. A picada pode causar desconforto e pequenos hematomas que não oferecem risco à saúde. A retirada de fragmento de tecido adiposo não representa risco à saúde nem lhe causará nenhum desconforto, pois será feita durante sua operação e, portanto, você estará sedado e inconsciente. Para avaliação da composição corporal, os exames não são muito demorados, e não causam desconforto ou dor.

4 – Benefícios que poderão ser obtidos

Não há benefício direto para o participante.

5 – Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo

Não há procedimentos alternativos.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

1 – Garantia de acesso

Você tem o direito de acessar seus registros médicos e informações sobre os procedimentos, de acordo com as leis nacionais, a qualquer momento, com o intuito de sanar possíveis dúvidas.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para o esclarecimento de eventuais dúvidas. Caso haja alguma ocorrência decorrente dos procedimentos envolvidos nesta pesquisa, os pacientes deverão entrar em contato com Dr Dan L. Waitzberg, através do telefone: 3061-7459.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

2 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição

Se você decidir participar deste estudo, você poderá sair dele a qualquer momento sem qualquer prejuízo, e isso não afetará de modo algum os cuidados futuros a serem recebidos de seu médico, seu nutricionista ou do hospital.

3 – Direito de confidencialidade

As informações obtidas nesta pesquisa através de sua participação terão acesso exclusivo à profissionais da saúde, e sem jamais revelar seu nome ou identidade.

4 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

Você terá direito de saber os resultados dos seus exames individuais envolvidos na presente pesquisa, bem como seus resultados parciais.

5 – Despesas e compensações

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

6 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa

Todo material coletado será utilizado exclusivamente para esse estudo.

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

Nutricionista: Priscila Campos Sala – 3061-7459/ 9336-3807 ou Dr. Dan L. Waitzberg – 3061-7459.

VI - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Alterações na Expressão Gênica do Tecido Gástrico, Intestinal e Adiposo Visceral de Pacientes Diabéticos Tipo 2 submetidos à Gastroplastia Redutora a Y-Roux".

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

Data ____ / ____ / ____

Assinatura do paciente/representante legal

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do pesquisador

Data ____ / ____ / ____



Referências

10 REFERÊNCIAS

1. SALTZMAN, E.; KARL, P. Nutrient Deficiencies After Gastric Bypass Surgery. *Annu. Rev. Nutr.* 2013. 33:183–203.
2. TOSH, S.Y.; ZARSHENAS, N.; JORGENSEN, J. Prevalence of nutrient deficiencies in bariatric patients. *Nutrition.* 2009. 25:1150-6.
3. Sociedade Brasileira de Cirurgia Bariátrica e Metabólica. Consenso Bariátrico; 2008. [acesso em 2021 Nov]. Disponível em: <https://www.sbcbm.org.br/consenso/>
4. RUBIO, M. A.; MORENO C. Nutritional implications of bariatric surgery on the gastrointestinal tract. *Nutr Hosp.* 2007. 22 (2): 124-34.
5. BLANKENSHIP, A. L. et al. ASMBS Allied Health Nutritional Guidelines for the Surgical Weight Loss Patient. *Surg Obes Relat Dis.* 2008; 4(5):73-108.
6. SILVA, M.M. et al. Efficiency of the 24-hour food recall instrument for assessing nutrient intake before and after Roux-en-Y gastric bypass. *Nutr Hosp.* 2014. 30 (6):1240-1247.
7. Gudzone, K.A.; Huizinga, M.M.; Chang, H.Y.; Asamoah, V.; Gadgil, M.; Clark, J.M. Screening and diagnosis of micronutrient deficiencies before and after bariatric surgery. *Obes Surg.* 2013 Oct;23(10):1581-9.
8. Halverson JD. Micronutrient deficiencies after gastric bypass for morbid obesity. *Am Surg* 1986; 52: 594-8.
9. Tucker ON et al. Nutritional consequences of weight-loss surgery. *Med Clin N Am* 2007; 91:499-514.
10. LAANPERE, M. et al. Folate-mediated one-carbon metabolism and its effect on female fertility and pregnancy viability. *Nutrition Reviews.* 2010. 68 (2): 99-113.
11. ZHAO, R.; MATHERLY, L.H.; GOLDMAN, I.D. Membrane transporters and folate homeostasis: intestinal absorption and transport into systemic compartments and tissues. *Expert Rev. Mol. Med.* 2009. 11:e4.
12. Sala P, Belarmino G, Machado NM, et al. The SURMetaGIT study: Design and rationale for a prospective pan-omics examination of the gastrointestinal response to Roux-en-Y gastric bypass surgery. *J Int Med Res.* 2016 Dec;44(6):1359-1375. doi: 10.1177/0300060516667862. Epub 2016 Nov 11.

13. Dobbs R, Sawers C, Thompson F, Manyika J, Woetzel J, Child P, et al. Overcoming obesity: An initial economic analysis. London: McKinsey Global Institute; 2014.
14. World Health Organization (WHO) [Internet]. Obesity and Overweight; 2021. [acesso em 2021 Nov]. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
15. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e Síndrome Metabólica (ABESO) [Internet]. Mapa da obesidade; 2021 [acesso em 2021 Nov]. Disponível em: <https://abeso.org.br/obesidade-e-sindrome-metabolica/mapa-da-obesidade/>
16. WHO Consultation on Obesity (1999: Geneva, Switzerland) & World Health Organization (2000). Obesity : preventing and managing the global epidemic: report of a WHO consultation. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42330>
17. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise em Saúde e Vigilância de Doenças Não Transmissíveis. Vigitel Brasil 2019 : vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico: estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2019 [recurso eletrônico]. Brasília: Ministério da Saúde, 2020. Disponível em: https://abeso.org.br/wp-content/uploads/2021/07/vigitel_brasil_2019_vigilancia_fatores_risco-1-2.pdf
18. Flores-Ortiz R, Malta DC, Velasquez-Melendez G (2019) Adult body weight trends in 27 urban populations of Brazil from 2006 to 2016: A population-based study. PLoS ONE 14(3): e0213254. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213254>
19. National Heart, Lung and Blood Institute and North American Association for the Study of Obesity (NAASO). Practical guide to the identification, evaluation and treatment of overweight and obesity in adult. Bethesda, MD: National Institute of Health, 2000. Disponível em: <http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/obesitypractgde.htm>

20. Ryan DH, Johnson WD, Myers VH, Prather TL, McGlone MM, Rood J et al. Nonsurgical weight loss for extreme obesity in primary care settings – results of the Louisiana obese subjects study. *Arch Intern Med*, 2010; 170(2): 146-154.
21. Buchwald H, Avidor Y, Braunwald E, Jensen MD, Pories W, Fahrbach K et al. Bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*, 2004; 292(14): 1724-37.
22. Manual Cirurgia Bariátrica. Luiz Alberto De Carli. Apoio Sociedade Brasileira de Cirurgia Bariátrica e Metabólica. Congresso 2021.
23. Zeve, J.L.M.; Novais, P.O.; Júnior, N.O. Técnicas em cirurgia bariátrica: uma revisão da literatura. *Revista Ciência & Saúde*, 2012; 5 (2): 132-140.
24. Lupoli, R.; Lembo, E.; Saldalamacchia, G.; Avola, C.K.; Angrisani, L.; Capaldo, B. Bariatric surgery and long-term nutritional issues. *World J Diabetes*. 2017 Nov 15;8(11):464-474.
25. Ceneviva R. Duodenum inclusion in alimentary transit for preventing or correcting nutritional deficiencies resulting from Roux-en-y gastric bypass in obesity treatment. *Rev. Col. Bras. Cir.* 2016; 43(2):136-38.
26. Koch TR, Finelli FC. Postoperative metabolic and nutritional complications of bariatric surgery. *Gastroenterol Clin N Am* 2010; 39: 109-124.
27. Fujioka K. Follow-up of nutritional and metabolic problems after bariatric surgery. *Diabetes Care* 2005; 28: 481-84.
28. Halverson JD. Micronutrient deficiencies after gastric bypass for morbid obesity. *Am Surg* 1986; 52: 594-8.
29. Nutrição: Acompanhamento nutricional nos diversos pós-operatórios. In: Segal, A.; Franques, A.M. Atuação multidisciplinar na cirurgia bariátrica: a visão da COESAS-SBCBM. São Paulo: Miró Editorial, 2012.
30. Aills, L. Blankenship, J., Buffington, C., Furtado, M. Bariatric Nutrition: Suggestions for the Surgical Weight Loss Patient. *Surgery for Obesity and related diases*, 2008, 4 (5 Suppl), S73-108.
31. SILVA, M.M. et al. Efficiency of the 24-hour food recall instrument for assessing nutrient intake before and after Roux-en-Y gastric bypass. *Nutr Hosp*. 2014. 30 (6):1240-1247.
32. Prevedello CF, Colpo E, Mayer ET, et al. Análise quantitativa e qualitativa da dieta de pacientes no pré e pós-operatório de cirurgia bariátrica. *Rev Bras Nutr Clin* 2009; 24(3):159-65.

33. Shankar P, Boylan M, Sriram K. Micronutrient deficiencies after bariatric surgery. *Nutrition* 2010; 26: 1031-1037.
34. Scaglione, F.; Panzavolta, G. Folate, folic acid and 5-methyltetrahydrofolate are not the same thing. *Xenobiotica*. 2014;44(5):480-8.
35. Naderi, N.; House, J.D. Recent Developments in Folate Nutrition. *Adv Food Nutr Res*. 2018;83:195-213.
36. CRIDER, K.S.; BAILEY, L.B.; BERRY, R.J. Folic acid food fortification-its history, effect, concerns, and future directions. *Nutrients*. 2011; 3 (3): 370-84.
37. SAINI, R.K.; NILE, S.H.; KEUM, Y. Folates: Chemistry, analysis, occurrence, biofortifications and bioavailability. *Food Research International*. 2016; 89:1-13.
38. LUCIA, Ceres Mattos Della et al. Otimização de método para análise de folatos em hortaliças folhosas por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência. *Quím. Nova* [online]. 2011; 34 (2): 335-340. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422011000200029&lng=en&nrm=iso>.
39. Litwack G. Vitamins and Hormones: Folic Acid and Folates. In: Thomas P, Fenech M. Methylene tetrahydrofolate reductase, common polymorphisms, and relation to disease. 2008; 79:375-92.
40. Liu, H.Y.; Liu, S.M.; Zhang, Y.Z. Maternal Folic Acid Supplementation Mediates Offspring Health via DNA Methylation. *Reprod Sci*. 2020 Apr;27(4):963-976.
41. Balashova, O.A.; Visina, O.; Borodinsky, L.N. Folate action in nervous system development and disease. *Dev Neurobiol*. 2018;78(4):391-402.
42. Ebara, S. Nutritional role of folate. *Congenital Anomalies*. 2017; 57(5):138-141.
43. PARLE-MCDERMOTT, A., et al. A polymorphism in the MTHFD1 gene increases a mother's risk of having an unexplained second trimester pregnancy loss. *Mol Hum Reprod*. 2005. 11 (7): 477-80.
44. van Dijk, S.J.; Molloy, P.L.; Varinli, H.; Morrison, J.L.; Muhlhausler, B.S. Epigenetics and human obesity. *Int J Obes (Lond)*. 2015;39(1):85-97.
45. Antoniewicz A, Kalinowski P, Kotulecka KJ, Kocoń P, Paluszkiewicz R, Remiszewski P., et al. Nutritional Deficiencies in Patients after Roux-en-Y Gastric

Bypass and Sleeve Gastrectomy during 12-Month Follow-Up. *Obes Surg*. 2019 Oct;29(10):3277-3284.

46. Vargas-Ruiz, A.G., Hernández-Rivera, G. & Herrera, M.F. Prevalence of Iron, Folate, and Vitamin B12 Deficiency Anemia After Laparoscopic Roux-en-Y Gastric Bypass. *OBES SURG* 18, 288–293 (2008).
47. Amaral JF, Thompson WR, Caldwell MD et al. Prospective hematologic evaluation of gastric exclusion surgery for morbid obesity. *Ann Surg* 1985; 201 (2): 186-93.
48. SHANE, B. Folate status assessment history: implications for measurement of biomarkers in NHANES. *Am J Clin Nutr*. 2011. 94 (1): 337S-342S.
49. PIYATHILAKE, C.J.; ROBINSON, C.B.; CORNWELL, P.A. A practical approach to red blood cell folate analysis. *Anal Chem Insights*. 2007. 2:107-10.
50. Jen M, Yan AC. Syndromes associated with nutritional deficiency and excess. *Clin Dermatol* 2010; 28: 669-85.
51. Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia: Projeto Diretrizes Obesidade: Tratamento Dietético. Disponível em: http://www.projetodiretrizes.org.br/4_volume/24-Obesidade.pdf
52. Mechanick JI, Apovian C, Brethauer S, Timothy Garvey W, Joffe AM, Kim J, et al Clinical Practice Guidelines for the Perioperative Nutrition, Metabolic, and Nonsurgical Support of Patients Undergoing Bariatric Procedures - 2019 Update: Cosponsored by American Association of Clinical Endocrinologists/American College of Endocrinology, The Obesity Society, American Society for Metabolic and Bariatric Surgery, Obesity Medicine Association, and American Society of Anesthesiologists. *Obesity (Silver Spring)*. 2020 Apr;28(4):O1-O58.
53. Machado, N. M. Impacto da derivação gástrica em Y de Roux no perfil metabólico global de mulheres obesas portadoras de diabetes tipo 2. São Paulo, 2018. Tese(doutorado)-Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
54. Monteiro, J.P. et al. Consumo Alimentar: Visualizando Porções. Editora Guanabara Koogan, 2007.
55. Silva MM, Sala PC, Cardinelli CS, Torrinhas RS, Waitzberg DL. Comparison of Virtual Nutri Plus® and Dietpro 5i® software systems for the

assessment of nutrient intake before and after Roux-en-Y gastric bypass. *Clinics (Sao Paulo)*. 2014;69(11):714-22.

56. Harttig U, Haubrock J, Knüppel S, Boeing H. The MSM program: web-based statistics package for estimating usual dietary intake using the Multiple Source Method. *Eur J Clin Nutr*. 2011;65 Suppl 1:S87–91.

57. Willett W, Stampfer MJ. Total energy intake: implications for epidemiologic analyses. *Am J Epidemiol*. 1986;124(1):17-27.

58. Willett WC, Home G, Kushi L. Adjustment for total energy intake in epidemiological studies. *Am J Clin Nutr*. 1997;65(4):1220S-28S.

59. Willett WC, Lenart E. Reproducibility and validity of food-frequency questionnaire. In: Willett WC. *Nutritional epidemiology*. 2a ed. New York: Oxford University Press; 1998. p.101-147.

60. International Life Sciences Institute do Brasil. Usos e aplicações das “Dietary Reference Intakes” DRIs, São Paulo, 2001.

61. Padovani, R.M. Dietary reference intakes: aplicabilidade das tabelas em estudos nutricionais. *Rev. Nutr.*, 2006; 19(6):741-760.

62. Jie G, Qin Y, Meng Q, Wang J. Autocatalytic amplified detection of DNA based on a CdSe quantum dot/folic acid electrochemiluminescence energy transfer system. *Analyst*. 2015 Jan 7;140(1):79-82.

63. Cui LH, Quan ZY, Piao JM, Zhang TT, Jiang MH, Shin MH, Choi JS. Plasma Folate and Vitamin B12 Levels in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Int. J. of Mol. Sci*. 2016 Jun 23;17(1032):1-10.

64. Kobal, P. S. Alterações na expressão gênica do tecido gástrico e intestinal de pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 2 submetidos à derivação gástrica em Y de Roux. São Paulo, 2017. Tese(doutorado)-Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

65. Mariani TJ, Budhraj V, Mecham BH, Gu CC, Watson MA, Sadovsky Y. A variable fold change threshold determines significance for expression microarrays. *FASEB J*. 2003 Feb;17(2):321-3.

66. Rodrigues, Lígia Henriques (18 de maio de 2015). «Regressão Linear Simples» IMEUSP. p. 7. Consultado em 03 de junho de 2019.

67. Gasmi A, Bjørklund G, Mujawdiya PK, Semenova Y, Peana M, Dosa A, et al. Micronutrients deficiencies in patients after bariatric surgery. *Eur J Nutr*. 2021 Jul 23.

68. Garla P, Sala P, Torrinhas RSM, Machado NM, Fonseca DC, da Silva MM, et al. Reduced intestinal FADS1 gene expression and plasma omega-3 fatty acids following Roux-en-Y gastric bypass. *Clin Nutr.* 2019 Jun;38(3):1280-1288.
69. Sala P, Belarmino G, Torrinhas RS, Machado NM, Fonseca DC, Ravacci GR, et al. Gastrointestinal Transcriptomic Response of Metabolic Vitamin B12 Pathways in Roux-en-Y Gastric Bypass. *Clin Transl Gastroenterol.* 2017 Jan 5;8(1):e212.
70. Anderson DD, Stover PJ. SHMT1 and SHMT2 are functionally redundant in nuclear de novo thymidylate biosynthesis. *PLoS One.* 2009;4(6):e5839.
71. Kuga R, Safatle-Ribeiro AV, Ishida RK, Retes F, Uemura RS, Retes F, et al. Small bowel endoscopy using the double-balloon technique: four-year results in a tertiary referral hospital in Brazil. *Dig Dis.* 2008;26:318-23.
72. Ness SA. Basic microarray analysis. strategies for successful experiments. In: *Methods in molecular biology*, vol. 316: Bioinformatics and Drug Discovery Edited by: RS. Larson Humana Press Inc., Totowa, NJ.
73. Morey JS, Ryan JC, Van Dolah FM. Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. *Biol Proced Online.* 2006;8:175-93.
74. Hou Z, Matherly LH. Biology of the major facilitative folate transporters SLC19A1 and SLC46A1. *Curr Top Membr.* 2014;73:175-204. doi: 10.1016/B978-0-12-800223-0.00004-9.
75. Cho Y, Kim JO, Lee JH, Park HM, Jeon YJ, Oh SH, Bae J, Park YS, Kim OJ, Kim NK. Association of reduced folate carrier-1 (RFC-1) polymorphisms with ischemic stroke and silent brain infarction. *PLoS One.* 2015 Feb 6;10(2):e0115295.
76. VanderMeer JE, Carter TC, Pangilinan F, Mitchell A, Kurnat-Thoma E, Kirke PN, et al. Evaluation of proton-coupled folate transporter (SLC46A1) polymorphisms as risk factors for neural tube defects and oral clefts. *Am J Med Genet A.* 2016 Apr;170A(4):1007-16.
77. ABCC5 Transporter is a Novel Type 2 Diabetes Susceptibility Gene in European and African American Populations. *Annals of human genetics.* 2014. 78 (5): 333-344.

78. Perna AF, Lanza D, Sepe I, Conzo G, Altucci L, Ingrosso D. Altered folate receptor 2 expression in uraemic patients on haemodialysis: implications for folate resistance. *Nephrol Dial Transplant*. 2013 May;28(5):1214-24.
79. Burda P, Kuster A, Hjalmarson O, Suormala T, Bürer C, Lutz S, et al. Characterization and review of MTHFD1 deficiency: four new patients, cellular delineation and response to folic and folinic acid treatment. *J Inherit Metab Dis*. 2015 Sep;38(5):863-72.
80. Field MS, Kamynina E, Stover PJ. MTHFD1 regulates nuclear de novo thymidylate biosynthesis and genome stability. *Biochimie*. 2016 Jul;126:27-30.
81. Gustafsson Sheppard N, Jarl L, Mahadessian D, Strittmatter L, Schmidt A, Madhusudan N, et al. The folate-coupled enzyme MTHFD2 is a nuclear protein and promotes cell proliferation. *Sci Rep*. 2015 Oct 13;5:15029.
82. Nilsson R, Jain M, Madhusudhan N, Sheppard NG, Strittmatter L, Kampf C, et al. Metabolic enzyme expression highlights a key role for MTHFD2 and the mitochondrial folate pathway in cancer. *Nat Commun*. 2014;5:3128.
83. Snell K, Baumann U, Byrne PC, Chave KJ, Renwick SB, Sanders PG, et al. The genetic organization and protein crystallographic structure of human serine hydroxymethyltransferase. *Adv Enzyme Regul*. 2000;40:353-403.
84. Chiou CC, Chan CC, Sheu DL, Chen KT, Li YS, Chan EC. Helicobacter pylori infection induced alteration of gene expression in human gastric cells. *Gut*. 2001 May;48(5):598-604.
85. Mahawar KK, Kumar P, Parmar C, Graham Y, Carr WR, et al. Small bowel limb lengths and roux-en-y gastric bypass: a systematic review. *Obes Surg*. 2016 Mar;26(3):660-71.
86. Valezi AC, Marson AC, Merguizo RA, Costa FL. Roux-en-Y gastric bypass: limb length and weight loss. *Arq Bras Cir Dig*. 2014;27 Suppl 1:56-8.
87. Nergaard BJ, Leifsson BG, Hedenbro J, Gislason H. Gastric bypass with long alimentary limb or long pancreato-biliary limb--long-term results on weight loss, resolution of co-morbidities and metabolic parameters. *Obes Surg*. 2014 Oct;24(10):1595-602
88. Roust LR, DiBaise JK. Nutrient deficiencies prior to bariatric surgery. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2017 Mar;20(2):138-144.

89. Li JV, Ashrafian H, Bueter M, Kinross J, Sands C, le Roux CW, et al. Metabolic surgery profoundly influences gut microbial-host metabolic cross-talk. *Gut*. 2011 Sep;60(9):1214-23.
90. Mahmood L. The metabolic processes of folic acid and Vitamin B12 deficiency. *J. Health Res. Rev.* 2014; 1(1):5
91. Dailey MJ. Nutrient-induced intestinal adaptation and its effect in obesity. *Physiol Behav.* 2014;136:74-8.
92. Arias PM, Domeniconi EA, García M, Esquivel CM, Martínez Lascano F, Foscarini JM. Micronutrient Deficiencies After Roux-en-Y Gastric Bypass: Long-Term Results. *Obes Surg.* 2020 Jan;30(1):169-173.



Apêndices

11. APÊNDICES

Apêndice 1. Descrição da identificação e localização do ensaio dos genes de interesse relacionados à via do metabolismo intestinal do folato

Ensaio (ID) – ThermoFisher	Símbolo	Nome	Código	Localização do ensaio
Hs00953344_m1	SLC19A1	Solute Carrier 87amily 19 member 1	6573	1302
Hs00611081_m1	SLC46A1	Solute Carrier 87amily 46 member 1	113235	1180
Hs01044732_g1	FOLR2	Folate receptor beta	2350	649
Hs00981089_m1	ABCC5	ATP binding cassette subfamily C member 5	10057	632
Hs01068263	MTHFD1	Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase, cyclohydrolase and formyltetrahydrofolate synthetase 1	4522	1880
Hs00759197_s1	MTHFD2	Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 2, methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase	10797	1419
Hs01059263_g1	SHMT2	Serine hydroxymethyltransferase 2	6472	1300
Hs00426586_m1	TYMS	Thymidylate synthetase	7298	342

Fonte: Thermo Fisher Scientific

Apêndice 2. Valores medianos e intervalo interquartil (IQR) da expressão gênica Δ RT-qPCR nas três porções intestinais estudadas

	n	pré-operatório	pós-operatório	P
Duodeno				
ABCC5	13	0,90 (0,35-1,80)	0,39 (0,34-2,69)	0,177
FOLR2	13	1,22 (0,59-1,69)	1,13 (0,65-2,40)	0,381
MTHFD1	12	2,11 (0,64-2,96)	7,57 (3,72-19,1)	0,004
MTHFD2	12	4,88 (2,94-11,0)	15,6 (9,91-32,9)	0,072
SHMT2	12	21,3 (4,01-33,3)	26,8 (14,7-111)	0,114
SLC19A1	13	22,6 (19,0-41,2)	25,6 (9,39-72,3)	0,390
SLC46A1	13	46,8 (29,2-78,7)	20,7 (8,87-67,7)	0,355
TYMS	12	0,60 (0,35-1,05)	0,99 (0,35-4,85)	0,095
Jejuno				
ABCC5	15	0,58 (0,30-0,81)	0,40 (0,13-0,63)	0,167
FOLR2	15	1,98 (0,88-2,79)	0,35 (0,25-0,93)	0,014
MTHFD1	15	5,53 (2,69-6,30)	4,09 (1,49-6,15)	0,166
MTHFD2	15	0,47 (0,22-0,85)	0,27 (0,22-0,59)	0,156
SHMT2	14	1,38 (0,74-1,96)	0,99 (0,49-1,54)	0,501
SLC19A1	16	5,71 (3,27-9,41)	1,50 (0,92-2,29)	0,016
SLC46A1	16	51,6 (16,4-88,9)	12,4 (6,86-23,4)	0,018
TYMS	12	0,56 (0,39-0,78)	0,43 (0,25-0,64)	0,733
Íleo				
ABCC5	13	0,59 (0,25-1,82)	0,38 (0,13-0,58)	0,076
FOLR2	12	2,62 (1,02-3,67)	1,63 (0,53-2,17)	0,088
MTHFD1	5	0,95 (0,81-1,07)	1,00 (0,85-1,30)	0,158
MTHFD2	9	0,47 (0,26-0,79)	0,31 (0,15-0,69)	0,010
SHMT2	9	0,92 (0,45-0,99)	0,62 (0,28-0,99)	0,756
SLC19A1	14	24,2 (12,7-54,9)	10,7 (7,89-19,6)	0,037
SLC46A1	14	33,4 (18,6-48,0)	15,4 (7,24-34,6)	0,155

Nota: valores multiplicados por 10^2 (log2); Legenda: Em negrito= valor significativo ($p \leq 0,05$); n = número amostral.

Apêndice 3. Produção científica do mestrado

Artigos publicados

- **BAM Ferreira**, P Sala, DC Fonseca, SB Heymsfield, DL Waitzberg. Gut morphology and gene expression in obesity: Short review and perspectives. *Clinical Nutrition Experimental* 20, 49-54
- DC Fonseca, P Sala, **BAM Ferreira**, J Reis, RS Torrinhas, I Bendavid. Body weight control and energy expenditure. *Clinical Nutrition Experimental* 20, 55-59
- P Sala, RSM de Miranda Torrinhas, DC Fonseca, [...] **BAM Ferreira** [...] et al. Intestinal expression of toll-like receptor gene changes early after gastric bypass surgery and association with type 2 diabetes remission. *Nutrition* 79, 110885

Participação em congressos internacionais

- **ESPEN CONGRESS 2021: B.D.A.M. Ferreira**, D. Fonseca, P. Sala, N. Machado, C. Cardinelli, A. Prudêncio, et al. Folate intake and the gut folate transport gene are decreased after roux-en-y gastric bypass (RYGB) in severely obese women. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2021.09.066>
- **ESPEN CONGRESS 2021:** AP Prudencio, NM Machado, C Cardinelli, **BAM Ferreira**, DC Fonseca, et al. Changes in tryptophan metabolism after bariatric surgery. *Clinical Nutrition ESPEN* 46, S584-S585; 2021.
- **ESPEN CONGRESS 2021:** AP Prudencio, NM Machado, DC Fonseca, **BAM Ferreira**, P Sala, et al. Indole-3-acetate is associated with improvements of glycemic control biomarkers after bariatric surgery. *Clinical Nutrition ESPEN* 46, S552

Participação em congressos nacionais

- **GANEPÃO 2017 (19º Fórum Paulista de Pesquisa em nutrição clínica e experimental) – Tema livre:** **B.D.A.M. Ferreira**, D. Fonseca, P. Sala. A contribuição da reduzida expressão de genes de transportadores de folato (SLC19A1 e SLC46A1) em adição ao baixo consumo alimentar na deficiência desse micronutriente após DGYR.

- **CONGRESSO BRASILEIRO DE CIRURGIA BARIÁTRICA E METABÓLICA (2021):** Trabalho premiado em 1º lugar como melhor apresentação oral



Apêndice 4. Artigo submetido referente aos dados do mestrado

06/12/2021 19:18

International Journal of Obesity

[manuscript tracking system](#)

[tracking system home](#) | [author instructions](#) | [reviewer instructions](#) | [help](#) | [tips](#) | [logout](#) | [journal home](#)

Detailed Status Information

Manuscript #	202110001420
Current Revision #	0
Submission Date	8th Dec 21
Current Stage	Initial QC Started
Title	Roux-en-Y Gastric Bypass affects the expression of genes related to the intestinal folate metabolism pathway in obese women
Manuscript Type	Brief Communication
Special Section	N/A
Category	* Bariatric Surgery (This option must be selected for ALL bariatric articles)
Word Count	1.197
Corresponding Author	Ms Beatriz Ferreira (beatriz_ufpe@hotmail.com) (Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, SP, BR.)
Contributing Authors	Ms Danielle Fonseca , Dr Priscila Sala , Ms Ana Prudência , Dr Raquel Susana Tominhas , Dr Dan Waitzberg
Abstract	<p>Roux-en-Y Gastric Bypass (RYGB) promotes sustained weight loss. Nevertheless, the resulting new gastrointestinal anatomy can contribute to nutritional depletions. Particularly, folate deficiency is frequently observed after RYGB. We assessed whether RYGB affects the expression of genes related to the intestinal folate metabolism pathway as an additional molecular mechanism contributing to its postoperative deficiency. Biopsies from duodenum, jejunum, and ileum of obese women (n=20) were collected before and 3 months after RYGB. Expression of genes involved in intestinal folate metabolism were assessed by microarray and RT-PCR. Folate intake (7-day food record) and plasma levels (electrochemiluminescence) also were measured. Transcriptomic alterations were observed in all intestinal segments studied after RYGB (vs. preoperative), marked by decreased expression of genes encoding folate transporters/receptors and increased expression of genes involved in folate biosynthesis (p<0.05). These changes occurred in parallel with decreased folate intake and plasma levels (p<0.05). Plasma folate concentrations correlated inversely with the intestinal FOLR2 and SHMT2 genes (p<0.001). Our findings suggest that impaired expression of genes related to the intestinal folate metabolism may contribute to its systemic deficiency early after RYGB and highlight a potential transcriptomic reprogramming of the intestine in response to RYGB to compensate folate depletions induced by this surgical technique.</p> <p>Keywords: bariatric surgery, gastric bypass, folic acid, gene expression.</p>
Associate Editor	Not Assigned
Techniques	Life sciences techniques [Gene expression analysis]; Life sciences techniques, Gene expression analysis [Gene expression profiling];
Subject Terms	Biological sciences/Genetics Health sciences/Medical research
Research Square author dashboard	I understand that my manuscript and associated personal data will be shared with Research Square for the delivery of the author dashboard.
Conflict of Interest Statement	There is NO conflict of interest to disclose

Stage	Start Date
Reviewer Assignment	8th Dec 21
Author Approved Converted Files	8th Dec 21
Preliminary Manuscript Data Submitted	7th Dec 21


[tracking system home](#) | [author instructions](#) | [reviewer instructions](#) | [help](#) | [tips](#) | [logout](#) | [journal home](#) | [terms of use](#)
[privacy policy](#) | [cookie policy](#) | [manage cookies](#)