

SIMONE VAN DE SANDE LEE

REVERSIBILIDADE PARCIAL DE ALTERAÇÕES NA FUNÇÃO
CEREBRAL APÓS PERDA DE PESO EM HUMANOS OBESOS

CAMPINAS

2011



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

REVERSIBILIDADE PARCIAL DE ALTERAÇÕES NA FUNÇÃO
CEREBRAL APÓS PERDA DE PESO EM HUMANOS OBESOS

Simone van de Sande Lee

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Doutor em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica, sob orientação do Prof. Dr. Lício Augusto Velloso.

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

L51r

Lee, Simone van de Sande, 1979 -
Reversibilidade parcial de alterações na função
cerebral após perda de peso em humanos obesos.
/ Simone van de Sande Lee. -- Campinas, SP :
[s.n.], 2011.

Orientador : Lício Augusto Velloso
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Inflamação. 2. Hipotálamo. 3.
Ressonância magnética. 4. Metabolismo. I.
Velloso, Lício Augusto. II. Universidade Estadual
de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III.
Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Partial reversibility of dysfunctional brain activity following weight loss
in obese humans

Palavra-chave em inglês:

Inflammation

Hypothalamus

Magnetic resonance

Metabolism

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Doutor em Clínica Médica

Banca examinadora:

Lício Augusto Velloso [Orientador]

Mario José Abdalla Saad

Marcos Antonio Tambascia

Maria Cristina Foss de Freitas

Regina Célia Mello Santiago Moises

Data da defesa: 02-12-2011

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

Banca examinadora da tese de Doutorado

Simone Van de Sande Lee

Orientador: Prof. Dr. Licio Augusto Velloso

Membros:

1. Prof. Dr. Mario José Abdalla Saad

2. Prof^a. Dr^a. Maria Cristina Foss de Freitas

3. Prof^a. Dr^a. Regina Célia Mello Santiago Moises

4. Prof. Dr. Marcos Antonio Tambascia

5. Prof. Dr. Licio Augusto Velloso

Curso de pós-graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 02/12/2011

Dedico esta tese aos voluntários de pesquisas clínicas, que nos oferecem o que lhes é mais valioso sem nada receber em troca, na esperança de contribuir para que possamos um dia aplacar a dor de seus semelhantes que, por certo, nunca virão a conhecer.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que estiveram ao meu lado durante a realização deste trabalho, em especial:

A **Deus**, por tudo.

Ao meu orientador, Professor **Lício Augusto Velloso**, pela imensa dedicação, competência, paciência e generosidade. Um exemplo de amor ao seu ofício e de compromisso com seus ideais, que inspira a todos que têm o privilégio de trabalhar sob sua orientação, e faz com que os anos de pós-graduação traduzam-se de fato em aquisição de maturidade e mudança da perspectiva com a qual enxergamos o mundo à nossa volta.

Ao meu marido, **Bruno**, meu amor e meu melhor amigo, pelo companheirismo e apoio incondicional. Obrigada por tornar tudo mais fácil e por fazer meus dias muito mais felizes.

Aos meus pais, **Alphonse e Marianne**, pelo amor e dedicação desde os primeiros momentos da minha vida e pelo apoio aos meus passos até hoje. Eu nunca teria chegado até aqui se não fosse por vocês.

À minha avó, **Catharina**, por todo o seu amor, pelo seu exemplo de vida e pelo suporte nos anos de faculdade.

Aos meus sogros, **Francisco e Albertina**, por terem me acolhido com tanto carinho na sua família.

Aos meus irmãos e amigos, **Juliana e Francisco**, pelo companheirismo, troca de confidências, por compartilhar alegrias e momentos difíceis. Sempre próximos, apesar da distância.

Aos meus cunhados, **Pedro e Tatiane**, meus novos irmãos, pelo carinho e amizade.

Ao amigo **Fabício Pereira**, pela sua ajuda fundamental nas fases mais importantes do estudo, pelos ensinamentos e acima de tudo pela amizade.

A todos os **professores** e **alunos** do **Laboratório de Sinalização Celular**, e ao técnico **Gerson Ferraz**, pela receptividade e agradável convivência, pelas excelentes discussões e pelas animadas festas. Gostaria de agradecer em especial ao Professor **Dennys Cintra**, pela colaboração ao longo de todo o estudo, e à **Erika Roman**, pela dedicação e zelo ao laboratório e a todos os que lá trabalham.

A todos os demais colaboradores do estudo, especialmente ao Professor **Fernando Cendes** por nos receber no seu laboratório e pelas discussões sobre as análises de neuroimagem. Agradeço também aos professores **Eliton Chaim**, **Célia Garlipp**, **Adilson Cardoso**, **Li Li Min**, **José Pareja**, **Bruno Geloneze** e aos colaboradores **Antônio Calixto**, **Paula Fernandes**, **Raquel Leão** e **Priscilla Portel**.

A todos os **professores** e **colegas** que fizeram parte da minha formação como médica, clínica e endocrinologista, e como pessoa.

A todos os meus **amigos**, velhos e novos, próximos e distantes. Obrigada por tornar a vida mais leve.

Ao **CNPq**, **CAPES**, **Fapesp** e **Aché**, pelo apoio financeiro.

RESUMO

A obesidade, definida como o acúmulo excessivo ou anormal de gordura que pode causar dano à saúde do indivíduo, é considerada atualmente um dos principais problemas de saúde pública. Ela resulta de um desequilíbrio entre a ingestão alimentar e o gasto de energia. O controle do balanço energético de animais e seres humanos é realizado pelo sistema nervoso central (SNC) através de um sistema endócrino, em que hormônios periféricos circulantes como a leptina e a insulina sinalizam a neurônios especializados do hipotálamo sobre os estoques de gordura do organismo, e induzem respostas apropriadas para a manutenção da estabilidade destes estoques. A maioria dos casos de obesidade se associa a um quadro de resistência central à ação da leptina e da insulina. Em animais de experimentação, a dieta hiperlipídica é capaz de induzir um processo inflamatório no hipotálamo, que interfere com as vias intracelulares de sinalização por estes hormônios, resultando em hiperfagia, diminuição do gasto de energia e, por fim, obesidade. Até o momento não existem evidências de que mecanismos semelhantes possam contribuir para o desenvolvimento de obesidade em seres humanos. Os objetivos deste estudo foram avaliar o impacto da redução de massa corporal sobre a funcionalidade do sistema nervoso central e sobre marcadores de inflamação no líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes obesos. Para tanto, foram avaliados treze pacientes obesos antes e aproximadamente oito meses após a realização de cirurgia bariátrica, além de oito voluntários com índice de massa corporal normal, através de ressonância magnética funcional e análise do LCR. Os indivíduos obesos apresentaram padrões de atividade funcional distintos em algumas regiões cerebrais, principalmente no hipotálamo, no córtex

orbitofrontal e somatossensorial, em relação aos indivíduos eutróficos. Estas alterações foram parcialmente revertidas após a perda de peso induzida pela cirurgia bariátrica. Além disso, observou-se após a perda de peso um aumento dos níveis de IL-6 e IL-10 no LCR, citocinas que exercem ações anti-inflamatórias no SNC. Conclui-se que humanos obesos apresentam alterações da atividade funcional do cérebro em resposta à glicose, e que a redução da massa corporal induzida pela cirurgia bariátrica acompanha-se de uma restauração parcial da atividade neuronal e de um aumento da atividade anti-inflamatória no líquido cefalorraquidiano.

ABSTRACT

Obesity, defined as abnormal or excessive fat accumulation that may impair life quality, is one of the major public health problems worldwide. It results from an imbalance between food intake and energy expenditure. The control of energy balance in animals and humans is performed by the central nervous system (CNS) through an endocrine system, in which circulating peripheral hormones such as leptin and insulin provide a signal to specialized neurons of the hypothalamus reflecting body fat stores, and induce appropriate responses to maintain the stability of these stores. The majority of obesity cases are associated with central resistance to both leptin and insulin actions. In experimental animals, high-fat diets can induce an inflammatory process in the hypothalamus, which impairs leptin and insulin intracellular signaling pathways and results in hyperphagia, decreased energy expenditure and ultimately obesity. So far, there is no evidence that similar mechanisms may contribute to the development of obesity in humans. The aims of this study were to evaluate the impact of body mass reduction on the functionality of the central nervous system and on markers of inflammation in the cerebrospinal fluid (CSF) of obese patients. To achieve this objective, we evaluated thirteen obese patients before and approximately eight months after bariatric surgery, and eight normal weight volunteers, using functional magnetic resonance imaging and CSF analysis. Obese individuals showed distinct patterns of functional activity in some brain areas, mainly in the hypothalamus, orbitofrontal and somatosensory cortices, as compared to normal weight individuals. These changes were partially reversed after body mass loss following bariatric surgery. Moreover, we observed increases in the CSF levels of IL-6 and IL-10, both known to possess anti-

inflammatory actions in the CNS. In conclusion, obese humans present altered functional brain activity in response to glucose, and body mass reduction following bariatric surgery is accompanied by partial restoration of neuronal activity and an increase in anti-inflammatory activity in the cerebrospinal fluid.

LISTA DE ABREVIATURAS

α -MSH	Hormônio Estimulador de Melanócitos α
AFNI	<i>Analysis of Functional NeuroImages</i>
AgRP	Proteína Relacionada ao “Agouti”
AKT	Proteína Quinase B
BMI	<i>Body Mass Index</i>
BOLD	<i>Blood Oxygenation Level Dependent</i>
CNS	<i>Central Nervous System</i>
CRH	Hormônio Liberador de Corticotrofina
CSF	<i>Cerebrospinal Fluid</i>
D2R	Receptor D2 da Dopamina
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EPI	<i>Echo Planar Image</i>
ERS	Estresse de Retículo Endoplasmático
fMRI	<i>Functional Magnetic Resonance Imaging</i>
fcMRI	<i>Functional Connectivity</i>
Gama-GT	Gama Glutamiltransferase
GLM	Regressão Linear Geral
GLP-1	<i>Glucagon-like peptide 1</i>

ICV	Intracerebroventricular
IκB	Inibidor do NF-κB
IKK	Quinase do Inibidor do NF-κB
IL-1β	Interleucina-1β
IL-6	Interleucina-6
IL-10	Interleucina-10
IMC	Índice de Massa Corporal
IR	Receptor de Insulina
IRS	Substrato do Receptor de Insulina
JAK2	Janus Quinase-2
JNK	Quinase c-jun N-terminal
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
LepR	Receptor de Leptina
LepR-1	Isoforma longa do Receptor de Leptina
MC3R	Receptor 3 da Melanocortina
MC4R	Receptor 4 da Melanocortina
MCH	Hormônio Concentrador de Melanina
MNI	<i>Montreal Neurological Institute</i>
NFκB	Fator Nuclear kappa B
NPY	Neuropeptídeo Y
ObR	Receptor de Leptina

ObRb	Isoforma longa do Receptor de Leptina
PCR	Proteína C-reativa
PDK	Quinase Dependente de Fosfoinosítídeos
PET	Tomografia por Emissão de Pósitrons
PI3K	Fosfatidilinositol-3-OH-quinase
PIP2	Fosfatidilinositol Bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol Trifosfato
PKC- θ	Proteína Quinase C- θ
POMC	Pro-opiomelanocortina
PTP1B	Proteína Tirosina Fosfatase-1B
PVC	Policloreto de Vinila
QFCA	Questionário de Frequência de Consumo Alimentar
R24h	Recordatório de 24 horas
RMf	Ressonância Magnética Funcional
RNA _m	RNA mensageiro
SNC	Sistema Nervoso Central
SOCS-3	Supressor de Sinalização de Citocinas-3
STAT3	Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição 3
TACO	Tabela de Composição de Alimentos
TCA	<i>Temporal Clustering Analysis</i>
TE	Tempo de Eco

TGO	Transaminase Glutâmico Oxalacética
TGP	Transaminase Glutâmico Pirúvica
TLR-4	<i>Toll-like Receptor 4</i>
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral- α
TR	Tempo de Repetição
TRH	Hormônio Liberador de Tireotrofina
UPR	<i>Unfolded Protein Response</i>
VHS	Velocidade de Hemossedimentação

SUMÁRIO

RESUMO	xi
ABSTRACT	xv
LISTA DE ABREVIATURAS	xix
INTRODUÇÃO	25
OBJETIVOS	49
CAPÍTULO	53
Artigo: Partial reversibility of hypothalamic dysfunction and changes in brain activity after body mass reduction in obese subjects. Diabetes . 2011 Jun;60(6):1699-704.	
CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
APÊNDICE 1	79
Métodos	
APÊNDICE 2	89
Tabelas de dados antropométricos e laboratoriais individuais	
APÊNDICE 3	93
Artigo: Dietary fatty acid composition correlates with systemic inflammatory markers in severely obese subjects. Submetido para publicação.	

APÊNDICE 4	113
Artigo: Cerebrospinal fluid xenin levels during body mass reduction – No evidence for obesity-associated defective transport across the blood-brain barrier. Submetido para publicação.	
ANEXO 1	131
Permissão para reprodução do artigo	

INTRODUÇÃO

É muito prejudicial à saúde ingerir mais comida do que a constituição pode suportar, quando, ao mesmo tempo o indivíduo não faz nenhum exercício para eliminar este excesso. (...) Pois como o alimento enche, e o exercício esvazia o corpo, o resultado de um exato equilíbrio entre eles deve ser o de deixar o corpo no mesmo estado em que ele foi encontrado, isto é, em perfeita saúde. (Hipócrates, ~400 a.C.)

O sobrepeso e a obesidade são definidos pela Organização Mundial de Saúde como o acúmulo excessivo ou anormal de gordura, que pode resultar em dano à saúde do indivíduo. Como a quantidade de gordura corporal não é facilmente mensurável na prática, o método mais comumente utilizado para classificar tal condição é o cálculo do índice de massa corporal (IMC), que resulta da divisão do peso em quilogramas pelo quadrado da altura em metros (kg/m^2). Em adultos, um IMC maior ou igual a 25 é definido como sobrepeso, e um IMC maior ou igual a 30, obesidade. Se o índice for menor que 35 a obesidade é classificada como grau I; se maior ou igual a 35, grau II e, se maior ou igual a 40, grau III (1).

A obesidade é considerada atualmente um dos principais problemas de saúde pública. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, em 2008 cerca de 1,5 bilhão de adultos apresentavam sobrepeso e destes, mais de 200 milhões

de homens e aproximadamente 300 milhões de mulheres eram obesos (1). Se compararmos com dados de 1980, o aumento na prevalência de obesidade foi de mais de duas vezes, e as projeções para os próximos anos indicam que em 2030 um número próximo a 3,3 bilhões de pessoas, ou 57,8% da população adulta mundial, terá sobrepeso ou obesidade (2). No Brasil, aproximadamente metade da população adulta apresenta excesso de peso, enquanto 12,5% dos homens e 16,9% das mulheres apresentam obesidade (3). Desde 1974, observou-se um aumento da prevalência de excesso de peso de quase três vezes em homens adultos e de quase duas vezes em mulheres adultas. No mesmo período, a prevalência de obesidade aumentou em mais de quatro vezes no sexo masculino e em mais de duas vezes no sexo feminino (3). Este aumento é observado principalmente nas classes sociais menos favorecidas (4).

Além de impor ao indivíduo um forte estigma social, a obesidade é um fator de risco importante para várias doenças, como *diabetes mellitus* tipo 2, hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia, aterosclerose, doenças respiratórias, osteoartrose e alguns tipos de câncer, trazendo grande impacto à qualidade de vida e à longevidade da população (5). Um grande estudo prospectivo demonstrou uma forte relação entre o excesso de peso aos 50 anos de idade e o risco de morte por qualquer causa, em homens e mulheres que nunca fumaram. Mesmo elevações moderadas no IMC associaram-se a um maior risco em relação aos indivíduos de peso normal. Observou-se um aumento linear do risco a partir do IMC de 25 kg/m², que chegou a mais de três vezes em indivíduos com obesidade grau III (6).

Uma série de estudos de famílias, incluindo estudos com gêmeos e crianças adotivas, demonstrou que fatores genéticos exercem influência significativa sobre a massa corporal (7). No entanto, somente uma pequena fração dos casos de obesidade grave ocorre devido a mutações de um único gene. Para a grande maioria da população, a variação da massa adiposa resulta de complexas interações entre um grande número de variantes genéticas e fatores ambientais (7).

O estilo de vida da sociedade contemporânea é apontado como o principal responsável pelo rápido crescimento da prevalência de obesidade (5). Se a eficiência em acumular energia favoreceu a sobrevivência em períodos de escassez de alimentos, nos dias atuais ocorre o inverso. A partir da revolução industrial, o estilo de vida de grande parte da população mundial vem sofrendo profundas mudanças. Os avanços em higiene, ciências e saúde pública, além da maior oferta de empregos e alimentos possibilitaram um aumento expressivo da expectativa de vida (8). Por outro lado, a facilidade de acesso e o baixo custo de alimentos altamente palatáveis e de grande densidade calórica, aliada ao menor requerimento de atividade física na vida diária fizeram com que a prevalência de obesidade aumentasse em proporções alarmantes, ameaçando contrabalançar os ganhos obtidos (9).

O acúmulo de gordura é causado, invariavelmente, por um desequilíbrio entre a ingestão alimentar e o gasto de energia, um problema de solução aparentemente simples. No entanto, milhares de anos após a sua descrição por

Hipócrates, pouco se tem conseguido fazer para reverter ou mesmo conter a progressão deste problema. As razões para isto podem ser encontradas em evidências recentes que indicam que, apesar do pensamento intuitivo comum de que o ato de comer seja voluntário, o balanço entre a ingestão e o gasto de energia é de fato controlado por um complexo e poderoso sistema biológico, comandado pelo sistema nervoso central (SNC) (10). Falhas neste sistema podem levar ao surgimento e agravamento da obesidade.

O controle homeostático do balanço energético no SNC é exercido por populações específicas de neurônios situados, em sua maior parte, em uma pequena estrutura cerebral que ocupa a porção ventral do diencéfalo, chamada hipotálamo (11,12). Os primeiros indícios de que o hipotálamo pudesse exercer tal função surgiram em 1840, a partir da descrição do caso clínico de uma mulher que havia se tornado extremamente obesa no ano anterior ao seu óbito, cuja autópsia revelou um grande tumor hipofisário que comprimia a base do cérebro (13). Outros casos semelhantes foram reportados até que Fröhlich, em 1901, levantou a hipótese de que a lesão hipofisária seria a causa da obesidade. Esta hipótese foi questionada três anos depois por Erdheim, através da observação de que em alguns casos não havia sido encontrada lesão significativa da hipófise, enquanto a compressão da base do cérebro estava invariavelmente presente (13). A questão permaneceu controversa até que, no final da década de 30 e início da década de 40, Hetherington e Ranson conduziram uma série de experimentos que demonstraram pela primeira vez o desenvolvimento de obesidade hipotalâmica em ratos sem lesão hipofisária, através de um eletrodo introduzido pela parte superior

do crânio (14). Os animais desenvolviam acentuada hiperfagia seguida de ganho progressivo de massa adiposa após lesão da região ventromedial do hipotálamo. Mais tarde, Anand e Brobeck descreveram o desenvolvimento de afagia em ratos e gatos após lesão bilateral de uma pequena área localizada no hipotálamo lateral (15). Com base nestes estudos, propôs-se a existência de um “centro da fome”, localizado no hipotálamo lateral, e de um “centro da saciedade”, localizado no hipotálamo ventromedial (16).

Apesar das flutuações na ingestão alimentar e atividade física, em situações normais, a massa adiposa dos animais mantém-se estável por longos períodos. Animais submetidos a restrição alimentar retornam ao seu peso inicial assim que a oferta é reestabelecida (17), e mudanças no volume através da diluição do alimento em material inerte resultam em adequação da quantidade ingerida à quantidade de calorias, e não ao volume (18). Para equilibrar a ingestão e o gasto calóricos, mantendo constantes as reservas de energia, é necessário que o cérebro seja capaz de obter informações sobre a quantidade destas reservas. Em 1953, Kennedy propôs que isto poderia ocorrer através da detecção pelo hipotálamo de metabólitos presentes na circulação (19). Esta hipótese ganhou força a partir de dados obtidos em experimentos de parabiose, ou circulação cruzada, em que os vasos sanguíneos de dois animais são unidos cirurgicamente para permitir a troca de fatores humorais entre eles (20). A parabiose de um rato normal magro a outro com obesidade provocada por lesão no hipotálamo ventromedial resultou em hipofagia e perda de peso do primeiro, sugerindo que um sinal relacionado à obesidade é capaz de inibir a ingestão

alimentar, e que a integridade do hipotálamo é necessária à sua ação (20). Mais um passo foi dado após a descrição de dois modelos de obesidade em camundongos por mutação espontânea monogênica, de herança autossômica recessiva, o camundongo *ob/ob* (21) e o *db/db* (22). Ambos apresentam obesidade extrema como consequência de hiperfagia e diminuição do gasto energético. A parabiose de camundongos *ob/ob* a controles magros levou à perda de peso apenas nos animais obesos, ao passo que, quando o mesmo experimento foi repetido com camundongos *db/db*, observou-se perda de peso apenas nos controles (23). Concluiu-se que os animais *ob/ob* seriam deficientes em um fator circulante que inibe a ingestão alimentar, enquanto os *db/db* produziam este fator em excesso, mas não seriam capazes de responder a ele. A partir destes resultados, ficou claro que a massa adiposa é regulada por um sistema endócrino. No entanto, foram necessários mais alguns anos até que o desenvolvimento da técnica de clonagem posicional, em que a clonagem de genes mutantes é realizada com base no conhecimento da sua posição em um mapa genético, permitisse a identificação da leptina através da clonagem do gene *ob* (24) e do receptor da leptina através da clonagem do gene *db* (25).

A leptina (do grego *leptos*, que significa magro) é um polipeptídeo produzido pelo tecido adiposo branco e secretado na circulação, em níveis proporcionais à massa deste tecido (24,26,27). Ela atravessa a barreira hemato-encefálica e se liga ao seu receptor (ObR ou LepR), um receptor de citocinas da classe 1 (25). Embora este receptor seja encontrado em vários tecidos, a isoforma longa (ObRb ou LepR-1), a única que possui todas as partes da proteína necessárias à

sinalização, é expressa principalmente no hipotálamo (27). É interessante notar que somente esta isoforma apresenta-se mutada nos camundongos C57BL/Ks *db/db*, cujo fenótipo é idêntico ao dos animais que apresentam mutações nulas no gene da leptina ou do seu receptor (28). O ObRb é constitutivamente ligado a uma proteína citosólica denominada JAK2 (Janus quinase-2), que possui atividade tirosina quinase (29). A ligação da leptina promove a dimerização do receptor, com fosforilação em tirosina da JAK2, que por sua vez catalisa a fosforilação de resíduos de tirosina na porção intracelular do receptor. Em seguida, há ativação de uma série de proteínas envolvidas na transdução do sinal da leptina, incluindo a STAT3 (transdutor de sinal e ativador de transcrição 3), que é translocada para o núcleo e regula a expressão de genes de neurotransmissores e outras proteínas (30). Simultaneamente, a ativação de JAK e STAT induz a expressão de inibidores da sinalização como a SOCS-3 (supressor de sinalização de citocinas 3) e a PTP1B (proteína tirosina fosfatase-1B), que modulam a resposta biológica à leptina (31,32).

A administração periférica de leptina resulta em diminuição da ingestão alimentar e perda de peso em camundongos *ob/ob* e, em menor magnitude, em controles magros, porém não produz qualquer efeito em camundongos *db/db* (33–35). Resultados semelhantes são observados após administração intracerebroventricular (icv) de leptina em pequenas doses, insuficientes para modificar sua concentração periférica, indicando que estes efeitos resultam da sua ação no sistema nervoso central (35). Estes dados estabeleceram a existência de um sistema homeostático em que a leptina, através de uma alça de

retroalimentação negativa, modula a atividade de circuitos neuronais que controlam a massa de tecido adiposo.

Os principais alvos de ação da leptina no sistema nervoso central são duas subpopulações de neurônios localizadas no núcleo arqueado do hipotálamo. A primeira expressa a proopiomelanocortina (POMC), que é clivada dando origem ao hormônio estimulador dos melanócitos α (α -MSH), que por sua vez age nos receptores 3 e 4 da melanocortina (MC3R e MC4R) em neurônios hipotalâmicos de segunda ordem em outras regiões do cérebro produzindo efeitos catabólicos. Estes neurônios são estimulados pela leptina. A segunda subpopulação de neurônios, cuja atividade é suprimida pela leptina, exerce funções anabólicas, sintetizando dois peptídeos orexigênicos: proteína relacionada ao Agouti (AgRP) e neuropeptídeo Y (NPY). O AgRP é um antagonista do MC3R e MC4R, e o neuropeptídeo Y atua em receptores Y estimulando a ingestão alimentar (36). Os neurônios de segunda ordem que expressam estes receptores estão localizados, principalmente, em dois núcleos hipotalâmicos: o núcleo paraventricular, cujas células produzem o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e o hormônio liberador de tireotrofina (TRH), com funções anorexigênicas e pró-termogênicas, e o hipotálamo lateral, que expressa orexina e o hormônio concentrador de melanina (MCH), com funções orexigênicas e anti-termogênicas (37).

Após a identificação da leptina, o conhecimento acerca dos processos fisiológicos que regulam o balanço de energia cresceu muito. Hoje sabemos que inúmeros fatores circulantes, produzidos principalmente pelo tecido adiposo, trato

gastrointestinal e pâncreas, além dos próprios nutrientes, podem influenciar o comportamento alimentar agindo no hipotálamo e em outras áreas do SNC, como o núcleo do trato solitário (38). Podem-se citar, por exemplo, peptídeos como a colecistoquinina, o *glucagon-like peptide-1* (GLP-1) e o peptídeo YY, produzidos por células especializadas na parede do trato gastrointestinal e secretados de forma fásica em resposta à alimentação (39). Eles atingem o SNC tanto por estimulação de nervos periféricos quanto diretamente através da corrente sanguínea, ou podem ainda ser sintetizados no próprio cérebro (40). Embora estes fatores possam influenciar a quantidade de calorias ingeridas em refeições individuais, agindo como “sinais de saciedade”, eles não possuem ação muito relevante sobre os estoques de gordura corporais. Para que isto ocorra, é necessário que o sinal seja tonicamente ativo e proporcional à quantidade destes estoques, como é o caso da leptina, considerada o principal “sinal de adiposidade” produzido pelo organismo. Além da leptina, apenas um hormônio é capaz de desempenhar este papel: a insulina (41).

A insulina é produzida pelas células beta do pâncreas e secretada tonicamente, com incrementos durante as refeições, sendo que os dois componentes (basal e estimulado) são diretamente proporcionais à quantidade de gordura corporal (40). Como a leptina, a insulina é transportada através da barreira hemato-encefálica e possui receptores no núcleo arqueado do hipotálamo e outras regiões do cérebro. Após a ligação da insulina à subunidade α extracelular do seu receptor (IR), a subunidade β intracelular, que possui atividade tirosina quinase intrínseca, se autofosforila. Em seguida, ela promove o

recrutamento e fosforilação em tirosina dos substratos do receptor de insulina (IRS), sendo que dentre os membros da família das proteínas IRS, o IRS-2 é o que possui maior expressão no núcleo arqueado e está implicado na mediação dos efeitos centrais da insulina (42). O IRS-2 fosforilado se liga à subunidade regulatória (p85) da enzima fosfatidilinositol-3-OH-quinase (PI3K), ativando a subunidade catalítica (p110) que por sua vez fosforila o fosfatidilinositol bifosfato (PIP2) para gerar o fosfatidilinositol trifosfato (PIP3). Algumas proteínas intermediárias da via da insulina, como a Akt e a PDK, são recrutadas para a membrana plasmática pela presença de PIP3, tornando-se assim ativas para transduzir o sinal (43). Além da função clássica na regulação do metabolismo da glicose, a insulina possui ações centrais no controle do balanço energético semelhantes às da leptina, ou seja, em contraste com os seus efeitos anabólicos sobre tecidos periféricos, sua ação hipotalâmica produz efeitos catabólicos (44). Parece haver ainda uma inter-relação entre as vias de sinalização da leptina e da insulina, em que a atividade da leptina no hipotálamo é modulada positivamente pela insulina e vice-versa (45).

Logo após a descoberta da leptina, verificou-se que a grande maioria dos indivíduos obesos não apresentava deficiência de leptina ou insulina, mas sim aumento dos níveis plasmáticos destes hormônios (26), e apesar disto não havia redução da ingestão alimentar. Desta forma, foi levantada a hipótese de que as formas comuns de obesidade estariam associadas a um quadro de resistência à ação central dos sinais de adiposidade (46). De fato, o tratamento com leptina mostrou-se relativamente ineficaz na maioria destes casos (47,48), e a resposta à

administração central de leptina e de insulina é atenuada em modelos animais de obesidade induzida por dieta (49,50). Nos últimos anos, inúmeros estudos experimentais contribuíram para o avanço no conhecimento sobre os mecanismos envolvidos na resistência hipotalâmica à ação destes hormônios. Os principais achados revelaram a indução de um processo inflamatório especificamente no hipotálamo, que resulta na ativação de vias de sinalização intracelular que atenuam os efeitos biológicos locais da leptina e da insulina (45,49–52).

Leptina e insulina devem transpor a barreira hemato-encefálica para atingirem seus receptores no SNC. Ambas dependem de um sistema de transporte saturável, através de receptores presentes tanto no plexo coroide como em capilares cerebrais (37). Foi observado, em roedores com obesidade induzida por dieta, que há uma diminuição na relação entre os níveis centrais e periféricos destes hormônios, sugerindo que seu transporte esteja comprometido (53,54). Este defeito também parece estar presente em humanos, pelo menos para a leptina (55). É importante notar, contudo, que o núcleo arqueado do hipotálamo é adjacente à eminência média, uma área onde a barreira hemato-encefálica é frágil, permitindo a livre difusão de substâncias ao espaço intersticial (56).

Acredita-se que os mecanismos mais importantes de resistência à leptina e à insulina no hipotálamo estejam associados a defeitos pós-receptor (45,49–52). A existência de resistência à ação da insulina em tecidos periféricos, induzida por um estado de inflamação crônica de baixo grau associado à obesidade, já era conhecida há algum tempo (57–59). Hotamisligil e colaboradores demonstraram,

em 1993, a indução da expressão de RNA mensageiro (RNAm) do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) no tecido adiposo de modelos animais de obesidade e diabetes, além de aumento dos níveis locais e sistêmicos da proteína, cuja neutralização provocou um aumento significativo da captação periférica de glicose em resposta à insulina (57). No entanto, apenas em 2005 descreveu-se um fenômeno semelhante no hipotálamo (51). De Souza e colaboradores estudaram o efeito da dieta sobre o padrão de expressão gênica no hipotálamo de ratos, e reportaram um aumento significativo da expressão de proteínas de resposta inflamatória, como TNF- α , interleucina-1 β (IL-1 β) e interleucina-6 (IL-6) após 16 semanas de dieta hiperlipídica (51). Este fenômeno se acompanha da ativação de proteínas quinases sensíveis à inflamação, como a quinase c-Jun N-terminal (JNK) e a quinase do inibidor do NF- κ B (IKK) (51,60,61). A JNK ativada catalisa a fosforilação em serina do IRS, reduzindo a ativação da PI3K/Akt (51), e a inibição farmacológica ou genética da JNK no hipotálamo de roedores restaura a sinalização da insulina (51,60). A proteína IKK é expressa em neurônios do hipotálamo mediobasal, mas normalmente encontra-se inativa. Quando ativada, ela fosforila a I κ B, proteína que sequestra o NF- κ B (fator nuclear- κ B) no citoplasma, mantendo-o inativo. A I κ B fosforilada é degradada, liberando o NF- κ B para exercer suas ações. Este então transloca-se ao núcleo e leva à transcrição de genes inflamatórios (61). A ativação desta via em camundongos leva à redução da sinalização da leptina e insulina no hipotálamo, hiperfagia e ganho de peso, enquanto sua supressão protege contra o desenvolvimento de obesidade (61). Outro mecanismo pelo qual a inflamação hipotalâmica provoca resistência local à

leptina e à insulina é através da indução de proteínas como a SOCS3 (31,62–64) e a PTP1B (32,65,66), que funcionam como inibidores fisiológicos da sinalização por estes hormônios. A SOCS3 pode ligar-se diretamente aos receptores ou suas proteínas sinalizadoras, inibindo-as diretamente ou facilitando sua degradação (63). A expressão de SOCS3 no núcleo arqueado do hipotálamo aumenta em camundongos submetidos a uma dieta rica em gordura (67). Foi demonstrado ainda que a deleção de SOCS3 especificamente em neurônios resulta em proteção contra a obesidade induzida por dieta (62), enquanto a superexpressão de SOCS3 em neurônios POMC induz resistência à leptina, obesidade e intolerância à glicose (64). A PTP1B inibe a sinalização pela leptina e pela insulina por desfosforilar o receptor de insulina, a JAK2 e outras moléculas sinalizadoras de ambas as vias (32). Sua expressão no hipotálamo aumenta em resposta à dieta hiperlipídica e à administração sistêmica de TNF- α (68), e a inibição da PTP1B no SNC resulta em resistência à obesidade induzida por dieta por melhorar a sensibilidade hipotalâmica à leptina e à insulina (65,66). Existe ainda outra proteína, a PKC- θ (proteína quinase C- θ), que pode mediar os efeitos deletérios da dieta rica em gordura sobre a sinalização adipostática central (69). Demonstrou-se que a exposição ao ácido palmítico induz a ativação da PKC- θ , o que reduz a sinalização da insulina no hipotálamo. Já o *knockdown* desta proteína no núcleo arqueado melhora a sinalização da insulina local e a homeostase de glicose na periferia, além de atenuar o ganho de peso induzido pela dieta (69).

De acordo com os estudos apresentados acima, observa-se que a manipulação dos diversos mecanismos envolvidos na resistência à leptina e à

insulina no hipotálamo é capaz de modificar a adiposidade. Isto sugere que as alterações hipotalâmicas não sejam apenas uma extensão da inflamação presente na periferia, mas que estejam envolvidas na gênese da obesidade em modelos animais (11). Outro achado que corrobora esta hipótese é o de que a inflamação associada à resistência aos hormônios adipostáticos no hipotálamo de ratos, em resposta a uma dieta obesogênica, precede o ganho de peso e a indução do processo inflamatório no tecido adiposo (50).

Entre os potenciais mecanismos envolvidos na conexão entre os ácidos graxos e a inflamação hipotalâmica estão a ativação do *Toll-like receptor 4* (TLR4) e o estresse de retículo endoplasmático (ERS) (70–73) . O TLR4 é um receptor de superfície celular que faz parte do sistema imune inato, reconhecendo lipopolissacárides presentes na parede celular de bactérias gram-negativas. No SNC, sua expressão ocorre predominantemente em células da micróglia (74). A sinalização pelo TLR4, com indução de resposta inflamatória local, pode ser ativada pela injeção icv de ácidos graxos saturados de cadeia longa, mas não por ácidos graxos monoinsaturados. Estes foram capazes de induzir apenas as interleucinas IL-6 e IL-10, que apresentam propriedades anti-inflamatórias no SNC (70). A deleção tanto do TLR4 quanto da proteína adaptadora MyD88, essencial à indução de citocinas pró-inflamatórias pelo TLR4, é capaz de proteger contra o desenvolvimento de resistência à insulina e à leptina e de obesidade induzida por dieta (70,71). O excesso de nutrientes, particularmente ácidos graxos saturados, também pode desencadear o ERS, que por sua vez pode ativar vias inflamatórias (70,72). O retículo endoplasmático é responsável pela síntese, maturação e tráfico

de uma série de proteínas. O enovelamento inadequado de proteínas recém-formadas pode ter consequências deletérias à célula, e seu acúmulo leva ao início de uma resposta adaptativa chamada UPR (*unfolded protein response*), durante a qual a tradução global é reduzida, como parte de uma estratégia biológica que tem por objetivo resolver o processo (72). O ERS parece desempenhar um papel fundamental na indução de resistência à leptina no hipotálamo. Inibidores do ERS restauram a sensibilidade à leptina e levam à diminuição do peso em camundongos submetidos a dieta rica em gordura, enquanto a indução de ERS em neurônios resulta em resistência à leptina e obesidade (73). Os mecanismos pelos quais o ERS é induzido na presença de dieta hiperlipídica não são bem compreendidos. Foi sugerido que os lipídios pudessem afetar diretamente a homeostase do retículo endoplasmático, através da alteração da composição da membrana desta organela e depleção de cálcio no seu interior (56,75). No entanto, em estudo realizado por nosso grupo demonstrou-se que a inibição do TLR4 em animais submetidos a uma dieta rica em gordura ou à injeção icv de ácidos graxos saturados é suficiente para melhorar o ESR, sugerindo ser este um evento secundário à ativação do TLR4 (70).

Foi demonstrado recentemente que a dieta hiperlipídica pode estar associada ainda à perda de neurônios hipotalâmicos por apoptose em roedores (76). A ativação de proteínas apoptóticas tem maior relação com a composição da dieta do que com a quantidade de calorias consumidas e com o peso corporal (76). Além disso, há uma diferença nas subpopulações de neurônios afetadas entre animais que apresentam maior ou menor propensão ao desenvolvimento de

obesidade e diabetes. Ratos *Wistar* apresentaram redução semelhante na expressão de neurotransmissores anorexigênicos e orexigênicos, enquanto camundongos *Swiss*, que se tornam obesos com maior facilidade, apresentaram níveis diminuídos apenas do peptídeo anorexigênico POMC (76). Outro nível de regulação que pode ser importante no controle da homeostase de energia é a plasticidade sináptica. Foi reportado que a dieta e hormônios metabólicos periféricos podem influenciar a organização das conexões sinápticas entre os neurônios hipotalâmicos (77–79). Alterações nestas conexões, juntamente com a apoptose neuronal, podem estar relacionadas com a dificuldade em reverter completamente o aumento da adiposidade, mesmo com a cessação do estímulo que originou a inflamação hipotalâmica (11).

Apesar dos crescentes avanços na caracterização das alterações hipotalâmicas em modelos animais de obesidade, até o momento não existem evidências de que os mesmos mecanismos moleculares e celulares também possam contribuir para o desenvolvimento de obesidade em seres humanos (11). Sabe-se que a presença da leptina e a integridade das vias de sinalização por ela ativadas são fundamentais para a homeostase energética também em humanos, visto que mutações nulas no gene da leptina, do receptor da leptina, da POMC ou das suas enzimas de clivagem e do MC4R causam hiperfagia e obesidade graves que, no caso da deficiência de leptina, são revertidas após o tratamento com leptina recombinante humana (80,81). A maioria dos indivíduos obesos apresenta hiperleptinemia e o tratamento com leptina nestes casos é relativamente ineficaz, indicando resistência à ação deste hormônio (26,47,48). Contudo, pelas

dificuldades técnicas em se estudar diretamente o SNC em humanos, não se conhece os mecanismos pelos quais esta resistência se desenvolve.

Como não é possível avaliar o tecido cerebral de seres humanos, uma maneira de se investigar biomarcadores que possam agir no SNC é através da análise do líquido cefalorraquidiano (LCR), que está em contato direto com este tecido. Apenas um estudo até o momento avaliou a presença de um marcador inflamatório no LCR de seres humanos obesos (82). Neste estudo, os níveis de IL-6 no LCR de indivíduos com sobrepeso ou obesos correlacionaram-se negativamente com o peso e a quantidade de gordura corporal (82). Sabe-se que, inversamente, os níveis de IL-6 na circulação periférica encontram-se aumentados na obesidade (83). A IL-6 é uma citocina pleiotrópica, que pode ter ações pró- e anti-inflamatórias, dependendo da concentração e do tecido-alvo (83). Ela é produzida principalmente no tecido adiposo em situações de repouso. Em adipócitos, a IL-6 é capaz de induzir resistência à insulina, e sua expressão é aumentada em células de indivíduos resistentes à insulina (84). A superexpressão de IL-6 no músculo esquelético de camundongos, induzindo níveis circulantes cronicamente elevados da citocina, levou a hiperinsulinemia, resistência à insulina e inflamação hepática, apesar de uma diminuição da adiposidade (85). Por outro lado, a deleção do gene que codifica a IL-6 em camundongos resultou em obesidade e intolerância à glicose na vida adulta, que foi revertida parcialmente com a reposição de IL-6 em baixas doses (86). Este tratamento não produziu qualquer efeito nos animais controles. Adicionalmente, demonstrou-se que a injeção aguda icv de IL-6 em ratos aumentou o gasto energético, o que não

ocorreu após administração periférica, sugerindo que os efeitos anti-obesidade da IL-6 são exercidos principalmente através da sua ação no SNC (86). A IL-6 também pode ser produzida e liberada pelo músculo esquelético durante o exercício, e mediar os efeitos do exercício físico sobre o metabolismo (87). Foi demonstrado que a melhora da sensibilidade à leptina e à insulina induzida pela atividade física no hipotálamo de ratos é dependente da ação central da IL-6 (88), um mecanismo que envolve também a indução da citocina anti-inflamatória IL-10 (89). Um estudo demonstrou ainda um aumento da produção de IL-6 no SNC em humanos após o exercício prolongado, determinado a partir da diferença entre os níveis medidos na veia jugular interna e no sangue arterial (90).

Outra forma de se avaliar o SNC de seres humanos é através de estudos de neuroimagem. Técnicas como a ressonância magnética funcional (RMf) e a tomografia por emissão de pósitrons (PET) permitem detectar alterações dinâmicas no funcionamento de regiões do SNC associadas a processos cognitivos e comportamentais, de forma não invasiva (91–93). Destas técnicas, a RMf traz algumas vantagens em relação à PET: é mais acessível, sua resolução espacial e temporal são superiores, não requer a administração de traçadores exógenos e não envolve exposição à radiação (92). Através da RMf, é possível detectar mudanças no sinal BOLD (*blood oxygenation level dependent*), que reflete a concentração de desoxihemoglobina no sangue circulante. Esta possui propriedades paramagnéticas, funcionando como um agente de contraste endógeno. O aumento da atividade neuronal local resulta em aumento do fluxo sanguíneo para aquela região específica, maior do que o necessário para suprir a

demanda de oxigênio. Isto resulta em uma menor concentração de desoxihemoglobina em relação ao nível basal, que pode ser detectada pela RMf (92). Alguns estudos de neuroimagem, tanto de RMf quanto de PET, demonstraram que existem diferenças significativas na atividade hipotalâmica em resposta à ingestão alimentar entre indivíduos magros e obesos (94–96). No entanto, nenhum deles avaliou a reversibilidade destas alterações após perda de peso.

Estudos de neuroimagem em seres humanos também vêm sendo utilizados para avaliar a ativação de áreas cerebrais em resposta a alimentos palatáveis e estímulos visuais e olfatórios relacionados a estes alimentos. Além do sistema homeostático, cuja função é regular o balanço de energia do organismo, existe ainda outro sistema capaz de influenciar o comportamento alimentar, denominado sistema hedônico ou sistema cerebral de recompensa (97–99). Várias regiões do cérebro, como o córtex orbitofrontal, a ínsula, a amígdala, o núcleo accumbens, o estriado dorsal, a área tegmentar ventral, a substância nigra e o hipotálamo lateral, participam dos processos emocionais e cognitivos que detectam as propriedades dos alimentos como estímulos ao prazer e à recompensa. Desta forma, os alimentos palatáveis muitas vezes são consumidos por suas propriedades hedônicas, independentemente da necessidade calórica, e sua ingestão pode exceder o requerimento de energia do organismo (97–99).

O consumo de alimentos palatáveis é capaz de ativar vias cerebrais e respostas neuroadaptativas nos circuitos de recompensa semelhantes às

observadas em resposta a drogas de abuso, o que pode contribuir para o comportamento compulsivo (97,100). Resultados obtidos com estudos de neuroimagem sugeriram que indivíduos que apresentam hipersensibilidade destes circuitos são predispostos ao ganho de peso (101,102), porém, com o advento da obesidade, surge uma disfunção neste sistema, com diminuição da sensibilidade aos estímulos particularmente no estriado (103). Foi realizado um estudo prospectivo com repetidos exames de ressonância magnética funcional em um grupo de mulheres durante seis meses, e observou-se ao final do estudo uma redução da resposta estriatal ao consumo de alimentos palatáveis apenas naquelas que ganharam peso (103). Isto poderia contribuir para a indução e perpetuação da compulsão alimentar, pois a tendência é que ocorra um aumento do consumo de alimentos palatáveis para compensar o déficit na atividade neural compatível com recompensa (103). Um potencial mecanismo envolvido com esta disfunção seria a diminuição da sinalização pelo D2R (receptor D2 da dopamina) em resposta ao consumo de alimentos palatáveis. Foi demonstrado que indivíduos obesos apresentam menor densidade de D2R estriatal do que magros (104), e a perda de peso parece induzir aumento dos níveis destes receptores (105).

Sabe-se ainda que existem conexões entre os mecanismos hormonais e hedônicos de controle da ingestão alimentar (106). Foi demonstrado que a ativação da amígdala e regiões corticolímbicas em resposta ao estímulo visual de alimentos palatáveis é significativamente maior em indivíduos com fome, em comparação aos saciados (107), ao passo que indivíduos submetidos a um período de superalimentação apresentam uma atenuação da resposta na ínsula e

no hipotálamo (108), sugerindo que reguladores do metabolismo, como a leptina, possam influenciar a atividade dos sistemas hedônicos no cérebro. De fato, pacientes com deficiência congênita de leptina apresentam um aumento marcante da atividade do estriado em resposta visual à comida, que é revertido após tratamento com leptina, mesmo antes de ocorrer mudança no peso corporal (109). Além disso, um estudo demonstrou que existe co-expressão da tirosina hidroxilase (um marcador de neurônios dopaminérgicos) com os receptores da leptina e da insulina na área tegmentar ventral e substância nigra de ratos, indicando que os neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo são alvos diretos destes hormônios (110). A leptina parece exercer ações complexas nos sistemas dopaminérgicos mesencefálicos. A administração aguda direta de leptina à área tegmentar ventral de ratos provoca inibição da transmissão dopaminérgica e diminuição da ingestão alimentar (111). Por outro lado, cronicamente, a sinalização pela leptina parece ser necessária para manter níveis apropriados de sinalização dopaminérgica mesoestriatal. Tanto camundongos *ob/ob* quanto animais obesos com resistência à leptina apresentam menores níveis de tirosina hidroxilase no mesencéfalo, menor liberação de dopamina ao núcleo accumbens e menores níveis de expressão do D2R no estriado (112,113). Nos camundongos *ob/ob*, a administração de leptina periférica ou diretamente no hipotálamo lateral destes animais leva à correção destas disfunções (112,114).

O conhecimento sobre os mecanismos pelos quais o sistema hedônico influencia a ingestão alimentar ainda é escasso, se compararmos ao sistema homeostático. Da mesma forma, não se sabe exatamente se determinados

nutrientes podem influenciar a responsividade dos sistemas cerebrais de recompensa, e se isto pode contribuir para o desenvolvimento de obesidade (97). A elucidação destes mecanismos, aliada à busca de um maior entendimento acerca do controle homeostático do balanço de energia em seres humanos e das interconexões entre os sistemas homeostático e hedônico, poderá levar à identificação de novos alvos terapêuticos para a obesidade e doenças relacionadas.

OBJETIVOS

- Avaliar o impacto da redução de massa corporal sobre a funcionalidade do sistema nervoso central em pacientes obesos, determinada por ressonância eletromagnética funcional.
- Avaliar o impacto da redução de massa corporal sobre marcadores de inflamação no líquido cefalorraquidiano em pacientes obesos.

CAPÍTULO

van de Sande-Lee S, Pereira FR, Cintra DE, Fernandes PT, Cardoso AR, Garlipp CR, Chaim EA, Pareja JC, Geloneze B, Li LM, Cendes F, Velloso LA. Partial reversibility of hypothalamic dysfunction and changes in brain activity after body mass reduction in obese subjects. *Diabetes*. 2011 Jun;60(6):1699-704.

Copyright 2011 American Diabetes Association

From *Diabetes*, Vol.60, 2011; 1699-1704

Reprinted with permission from *The American Diabetes Association*.

Partial Reversibility of Hypothalamic Dysfunction and Changes in Brain Activity After Body Mass Reduction in Obese Subjects

Simone van de Sande-Lee,¹ Fabrício R.S. Pereira,² Dennys E. Cintra,^{1,3} Paula T. Fernandes,² Adilson R. Cardoso,⁴ Célia R. Garlipp,⁵ Eliton A. Chaim,⁶ Jose C. Pareja,⁶ Bruno Geloneze,⁷ Li Min Li,² Fernando Cendes,² and Licio A. Velloso¹

OBJECTIVE—Inflammation and dysfunction of the hypothalamus are common features of experimental obesity. However, it is unknown whether obesity and massive loss of body mass can modify the immunologic status or the functional activity of the human brain. Therefore, the aim of this study was to determine the effect of body mass reduction on brain functionality.

RESEARCH DESIGN AND METHODS—In humans, changes in hypothalamic activity after a meal or glucose intake can be detected by functional magnetic resonance imaging (fMRI). Distinct fMRI analytic methods have been developed to explore changes in the brain's activity in several physiologic and pathologic conditions. We used two analytic methods of fMRI to explore the changes in the brain activity after body mass reduction.

RESULTS—Obese patients present distinct functional activity patterns in selected brain regions compared with lean subjects. On massive loss of body mass, after bariatric surgery, increases in the cerebrospinal fluid (CSF) concentrations of interleukin (IL)-10 and IL-6 are accompanied by changes in fMRI patterns, particularly in the hypothalamus.

CONCLUSIONS—Massive reduction of body mass promotes a partial reversal of hypothalamic dysfunction and increases anti-inflammatory activity in the CSF. *Diabetes* 60:1699–1704, 2011

Obesity affects more than 300 million people worldwide (1). It is the main risk factor for type 2 diabetes, atherosclerosis, and hypertension, and therefore plays an important role in the overall mortality of modern societies (2). Increased adiposity results from the progressive loss of the homeostatic control of caloric intake and energy expenditure. In animal models, dysfunctional activity of specialized neurons of the hypothalamus is regarded as an important determinant for the development of obesity (3–6). In both genetic and diet-induced obese rodents, the malfunction of the hypothalamus is a consequence of the activation of local inflammation and eventually apoptosis of selected neuronal

populations (3,4,7,8). The inhibition of inflammation by genetic or pharmacologic approaches leads to the reduction of the obese phenotype and correction of the metabolic breakdown, placing hypothalamic inflammation as a potential target for the treatment of obesity (3,4,8–10).

We show that obese patients present distinct functional activity patterns in selected brain regions, compared with lean subjects. On massive loss of body mass, increases in the cerebrospinal fluid (CSF) concentrations of interleukin (IL)-10 and IL-6 are accompanied by changes in functional magnetic resonance imaging (fMRI) patterns, particularly in the hypothalamus.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Thirteen obese patients (11 females) were recruited from the Obesity Clinic at the University of Campinas. All patients were selected for bariatric surgery according to the National Institutes of Health Consensus Statement (11). The surgical technique used was always the Roux-in-Y gastric bypass (12). Patients were submitted to fMRI plus blood and CSF collection at the time of the surgery and after reduction of body mass. Inclusion criteria for patient selection were men and women between 18 and 60 years of age who met the above-mentioned criteria for surgery. Exclusion criteria for patient selection were diabetes, inflammatory or infectious disease, use of psychotropic or anti-inflammatory drugs, and history of substance addiction. In addition, eight lean control subjects were selected among students of the university. Control subjects were submitted to blood collection and fMRI. Control CSF was obtained from patients referred to the university for headache. Criteria for selection of both control groups were the same used for patients, except for a BMI <25. The fMRI studies were performed on a 1.5 GE MRI scanner (GE Healthcare, Waukesha, WI) in 12-h fasting subjects. The method for image acquisition was the same as previously described (13) except that a total of 500 images were acquired in 30 min. D-glucose (50 g) was ingested after 5 min. Leptin, insulin, and adiponectin were determined in sera using ELISA kits from Millipore (Billerica, MA). Tumor necrosis factor- α (TNF- α), IL-1 β , IL-10, and IL-6 were determined in sera and CSF using ultra-sensitive ELISA kits from BD Biosciences (Bedford, MA) and Cayman Chemical (Ann Arbor, MI). Biochemical and cellular parameters in the blood and CSF were determined using automated methods from F. Hoffmann-La Roche (Basel, Switzerland) and Beckman Coulter (Brea, CA). Temporal clustering analysis (TCA) and spatial analysis were performed as described (13). The fcMRI analysis was performed as previously described (14,15) except that the seed (virtual label that defines the target area from or toward which connectivity is evaluated) was placed in the hypothalamus. Student *t* test was used for statistical analysis.

RESULTS

Patients were evaluated at the time of the surgery and 238 $\pm$ 11 days later, when body mass was reduced by 29 $\pm$ 4% (P < 0.05). Although most patients enrolled in the study were women, both male patients presented similar outcomes; therefore, we have no reason to suspect the data shown in this article represent female-specific phenomena. The nutritional habits of the patients were assessed according to the International Collaborative Study of

From the ¹Laboratory of Cell Signaling, University of Campinas, Campinas, Brazil; the ²Department of Neurology, University of Campinas, Campinas, Brazil; the ³Faculty of Applied Sciences, University of Campinas, Campinas, Brazil; the ⁴Department of Anesthesiology, University of Campinas, Campinas, Brazil; the ⁵Department of Clinical Pathology, University of Campinas, Campinas, Brazil; the ⁶Department of Surgery, University of Campinas, Campinas, Brazil; and the ⁷Laboratory of Investigation in Metabolism and Diabetes, University of Campinas, Campinas, Brazil.

Corresponding author: Licio A. Velloso, lavelloso.unicamp@gmail.com.

Received 23 November 2010 and accepted 13 March 2011.

DOI: 10.2337/db10-1614

© 2011 by the American Diabetes Association. Readers may use this article as long as the work is properly cited, the use is educational and not for profit, and the work is not altered. See <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/> for details.

Macro- and Micronutrients and Blood Pressure 24-h dietary recall (16). Total caloric intake decreased from $5,602 \pm 3,391$ to 803 ± 355 kCal/day ($P < 0.05$), and the consumption of saturated fats decreased from 33.6 ± 6.1 to $30.3 \pm 11.6\%$ of total caloric intake ($P < 0.05$). Of special interest, the relative consumption of saturated fats by obese patients was greater than that of lean control subjects on enrollment and reduced by 10.5% after surgery, becoming statistically similar to lean subjects. As expected, all the systemic parameters reflecting the metabolic and inflammatory status of the patients improved significantly after massive body mass loss (Table 1), reflecting the known impact of reduction of adiposity and caloric intake on subclinical inflammation and glucose/lipid homeostasis (17).

Body mass loss produced no effect on cellular and biochemical parameters in the CSF (Table 2). Two distinct ultra-sensitive ELISA methods were used to evaluate TNF- α and IL-1 β in CSF, but these rendered no detectable levels in all samples evaluated. However, the CSF levels of IL-10 increased in all patients, and the CSF levels of IL-6 increased in all except one patient, leading to statistically significant increases of both these cytokines after body mass loss (Fig. 1A and B). Both IL-6 and IL-10 levels in the CSF were inversely correlated with BMI (Fig. 1C and D), and IL-6 levels in the CSF were inversely correlated with IL-6 in the blood (Fig. 1E). Compared with lean subjects, IL-10 levels in the CSF of obese subjects were similar before surgery (15.9 ± 8.6 vs. 18.1 ± 7.8 pg/mL for obese and lean subjects, respectively) and significantly higher after body mass loss (29.8 ± 10.4 pg/mL, $P < 0.05$). Conversely, IL-6 levels in the CSF of obese patients were significantly lower than in lean control subjects before surgery (1.6 ± 1.3 vs. 6.4 ± 5.3 pg/mL [$P < 0.05$] for obese and lean subjects, respectively), reaching similar levels after body mass loss (5.7 ± 2.8 pg/mL). In all groups, the CSF levels of IL-10 were similar or higher than the blood levels of this

cytokine, suggesting that, at least in part, IL-10 was produced in the central nervous system (Fig. 1F). No significant differences in blood monocyte counts were detected among obese and lean subjects and in obese patients before and after surgery.

Two distinct analytic methods were used to evaluate the impact of obesity and body mass loss on the activity of the brain: TCA and functional connectivity MRI (fcMRI). TCA allows for the identification of maximal response to a given stimulus in a combination of signal intensity and spatial extent (13), whereas fcMRI defines temporal correlations between remote neurophysiologic events, which are hemodynamic in nature when evaluated by fMRI (14,18).

For TCA, a mathematic model converts a multiple-dimension data space into a relationship between the number of voxels, reaching maximum signal intensity, and the time (13). On a given time frame, the spatial mapping allows for the anatomic localization of the activity. We found that a first peak of activity occurred right after glucose intake (Fig. 2A), as previously reported (13). This peak was similar in lean and obese subjects both before and after surgery (Fig. 2A). After approximately 5 min of the glucose stimulus, lean subjects presented a second peak that was comparable to previously reported data (13). However, obese patients did not present such a peak, either before or after surgery (Fig. 2A). In addition, during the remaining 20 min of analysis, the number of voxels reaching maximum activity became progressively different among the groups. The highest activity was presented by lean subjects, whereas obese subjects before surgery presented the lowest activity and obese subjects after surgery presented intermediate activity (Fig. 2A). Spatial analysis was then performed at three distinct time windows, labeled in yellow in Fig. 2A. In the first window (W1), which included the first peak after glucose intake, maximum activity was detected in the hypothalamus and orbitofrontal cortex in all three conditions (lean subjects,

TABLE 1
Blood metabolic and inflammatory parameters

	Lean 6 females, 2 males	Obese before surgery 11 females, 2 males	Obese after surgery
Age (years)	29.5 $\pm$ 4		34.0 $\pm$ 10
BMI (kg/m ²)	20.9 $\pm$ 2.4	39.1 $\pm$ 1.9*	28.1 $\pm$ 2.8*§
WC (cm)	72.2 $\pm$ 9.2	110.3 $\pm$ 9.9*	89.7 $\pm$ 8.7*§
HC (cm)	91.3 $\pm$ 7.3	127.0 $\pm$ 5.2*	105.0 $\pm$ 7.5*§
Glucose (mg/dL)	80.6 $\pm$ 3.1	84.3 $\pm$ 6.1	77.9 $\pm$ 7.3
HbA _{1c} (%)	4.8 $\pm$ 0.2	5.2 $\pm$ 0.3	5.1 $\pm$ 0.3
Insulin (pmol/L)	25.0 $\pm$ 10.3	68.7 $\pm$ 38.1*	21.5 $\pm$ 10.4§
HOMA-IR	0.7 $\pm$ 0.3	2.1 $\pm$ 1.2*	0.6 $\pm$ 0.2§
Cholesterol (mg/dL)	189 $\pm$ 28	153 $\pm$ 24	141 $\pm$ 16
HDL (mg/dL)	74.5 $\pm$ 25.7	36.9 $\pm$ 5.8*	52.6 $\pm$ 9.1*§
LDL (mg/dL)	99.5 $\pm$ 22.4	97.6 $\pm$ 26.4	73.6 $\pm$ 16.1
Triglycerides (mg/dL)	75.5 $\pm$ 38.9	94.1 $\pm$ 27.1	76.6 $\pm$ 19.9
CRP (mg/dL)	0.13 $\pm$ 0.02	0.91 $\pm$ 0.70*	0.17 $\pm$ 0.02§
ESR (mm/1 h)	14 $\pm$ 12	26 $\pm$ 16*	16 $\pm$ 9§
Adiponectin (μ g/mL)	6.9 $\pm$ 1.7	2.7 $\pm$ 1.8*	7.8 $\pm$ 1.6§
Leptin (ng/mL)	21.4 $\pm$ 6.2	36.8 $\pm$ 12.0*	17.0 $\pm$ 13.9§
TNF- α (pg/mL)	5.8 $\pm$ 5.5	25.6 $\pm$ 10.3*	12.4 $\pm$ 9.8§
IL-1 β (pg/mL)	2.0 $\pm$ 1.8	42.9 $\pm$ 26.7*	13.6 $\pm$ 4.3*§
IL-6 (pg/mL)	4.1 $\pm$ 4.2	26.3 $\pm$ 10.2*	8.5 $\pm$ 6.4§
IL-10 (pg/mL)	14.0 $\pm$ 10.1	15.6 $\pm$ 16.5	15.8 $\pm$ 5.5

CRP, C-reactive protein; ESR, erythrocyte sedimentation rate; HC, hip circumference; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; WC, waist circumference. * $P < 0.05$ vs. lean. § $P < 0.05$ vs. obese before surgery.

TABLE 2
Cerebrospinal fluid cellular and biochemical parameters

	Lean	Obese before surgery	Obese after surgery
Glucose (mg/dL)	59.5 ± 9.6	52.9 ± 8.5	48.5 ± 4.4
Protein (mg/dL)	26.3 ± 6.8	26.6 ± 11.1	23.7 ± 6.8
Leukocytes/mL	1.6 ± 0.8	2.0 ± 1.5	2.5 ± 4.3
Erythrocytes/mL	18 ± 38	37 ± 79	44 ± 57

obese subjects before surgery, and obese subjects after surgery), in the occipital cortex in lean and obese subjects after surgery, and in the somatosensory cortex in obese subjects both before and after surgery (Fig. 2B, W1). Comparisons between the groups revealed that lean and obese subjects before surgery presented different activities in the hypothalamus (*inset graph*, Fig. 2B, W1) and occipital and somatosensory cortices; lean and obese subjects after surgery were mostly similar with discrete differences in the somatosensory cortex; and obese subjects before and after surgery presented different activities in the hypothalamus (*inset graph*, Fig. 2B, W1). In the second window (W2), which included the second peak after glucose intake, lean subjects presented the highest activity in the hypothalamus and somatosensory and occipital cortices; obese subjects before surgery presented the highest activities in the somatosensory and occipital cortices and cerebellum; and obese subjects after surgery presented the highest activity in the somatosensory cortex (Fig. 2B, W2). At W2, the activities in the hypothalamus (*inset graph*, Fig. 2B, W2) and somatosensory cortex were

different between lean and obese subjects before surgery. The comparison between lean and obese subjects after surgery showed a significant difference only in the somatosensory cortex; the comparison between obese subjects before and after surgery showed differences in the hypothalamus (*inset graph*, Fig. 2B, W2) and occipital, somatosensory, and orbitofrontal cortices. In the third window (W3), lean subjects presented the highest activities in the hypothalamus and orbitofrontal and somatosensory cortices; obese subjects before surgery presented the highest activities in the somatosensory and occipital cortices and in the cerebellum; and obese subjects after surgery presented the highest activity only in the somatosensory cortex (Fig. 2B, W3). Somatosensory and orbitofrontal cortices and the hypothalamus (*inset graph*, Fig. 2B, W3) presented different activities when lean subjects were compared with obese subjects before surgery. Only the orbitofrontal cortex was different between lean and obese subjects after surgery, and somatosensory and orbitofrontal cortices were different between obese subjects before and after surgery (Fig. 2B, W3).

At both resting state and after a stimulus, synchronized fluctuations of blood oxygen levels dependent on function in fMRI signals in remote brain areas reflect physiologic or pathologic patterns in a neuronal network (14,15,18). The measurements of such events, which are the basis of fcMRI, provide maps of connectivity that indicate integration and segregation of brain information. Here, a seed was placed on the hypothalamus to explore the connectivity of this anatomic region with other brain areas. In lean subjects, the hypothalamus presented the highest level of functional connectivity with the orbitofrontal and somatosensory cortices (Fig. 3A). In obese subjects before surgery, functional connectivity was detected between

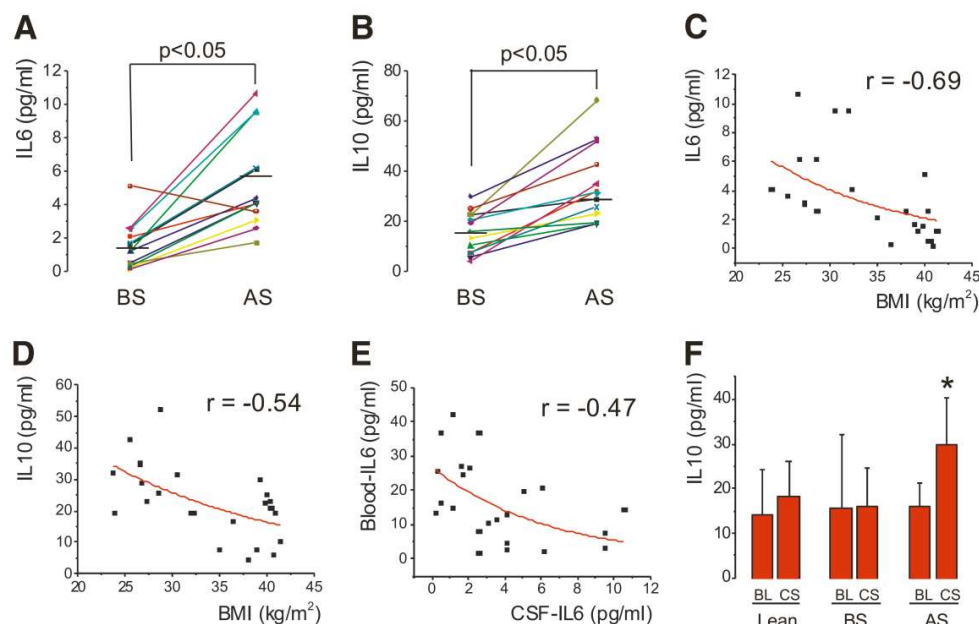


FIG. 1. Inflammatory markers in the CSF. Levels of IL-6 (A) and IL-10 (B) were determined in the CSF of obese patients before and after bariatric surgery. Correlation between IL-6 (C) and IL-10 (D) concentrations in the CSF and BMI, and correlation between IL-6 concentrations in the CSF and blood (E) were obtained. The mean ($\pm$ SD) levels of IL-10 in the blood and CSF were obtained for lean and obese subjects before and after surgery (F). $N = 8$ for lean subjects; $N = 13$ for obese subjects. F: * $P < 0.05$ vs. blood/after surgery. AS, after surgery; BL, blood; BS, before surgery; CS, cerebrospinal fluid.

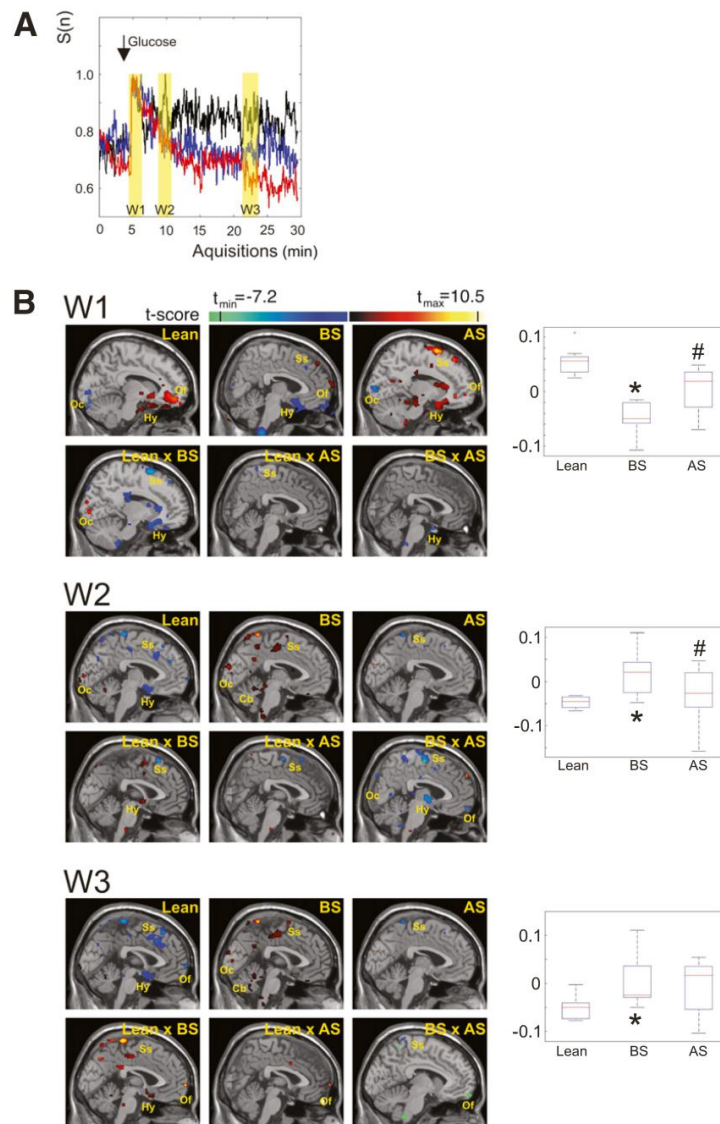


FIG. 2. TCA of the human brain after glucose intake. **A:** Time course of the activation depicted as the means of all analyzed subjects in the respective groups (black, lean; red, obese before surgery; blue, obese after surgery); W1–W3 represent the time windows selected for spatial analysis. **B:** Spatial mapping of the brain activity at each of the time windows (W1–W3); individual group analyses were performed for lean and obese subjects before and after surgery; comparisons were also performed for all pairs of groups. The inset graphs on the right represent the signal intensity in the region of the hypothalamus for each group. $N = 8$ for lean subjects; $N = 13$ for obese subjects. A pixel clustering size of 5 and a t -threshold of $|t| > 2.1$ were chosen to afford a $P < 0.01$ level of statistical significance of the detected signal changes. This is represented by the different colors, as defined by the normalized color bars. Color bars indicate t value for one-sample t test (lean, BS, and AS) and two-sample t test (lean vs. BS, lean vs. AS, and BS vs. AS). In the insets in **B**, $*P < 0.01$ vs. lean and $\#P < 0.01$ vs. before surgery. AS, after surgery; BS, before surgery; Cb, cerebellum; Hy, hypothalamus; Oc, occipital cortex; Of, orbitofrontal cortex; Ss, somatosensory cortex. (A high-quality digital representation of this figure is available in the online issue.)

the hypothalamus and the orbitofrontal cortex and cerebellum (Fig. 3B). After surgery, functional connectivity of obese patients was highest between the hypothalamus and the orbitofrontal, somatosensory, and occipital cortices (Fig. 3C). Intergroup comparisons revealed the greatest difference in functional connectivity between lean and obese subjects before surgery, particularly in the regions of the cerebellum and somatosensory cortex (Fig. 3D). Functional connectivity was mostly similar between lean and obese patients after surgery (not shown). Finally, some differences in functional connectivity between

obese subjects before and after surgery were detected in the cerebellum, somatosensory, and orbitofrontal cortices (Fig. 3E).

DISCUSSION

Both TCA and fMRI analyses showed distinct patterns of functionality between obese and lean subjects. The differences were mostly confined to a few anatomic regions, predominating in the hypothalamus and somatosensory and orbitofrontal cortices. The hypothalamus harbors

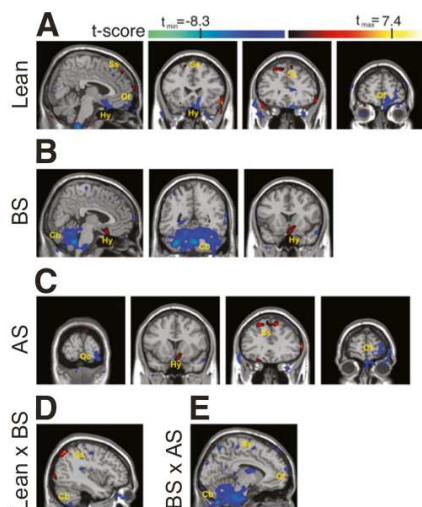


FIG. 3. Functional connectivity maps. A seed was placed in the hypothalamus, and intragroup (A–C) and intergroup (D and E) analyses were performed. **A:** Connectivity maps of lean subjects are depicted. **B:** Connectivity maps of obese patients before surgery are depicted. **C:** Connectivity maps of obese patients after surgery are depicted. **D:** Intergroup analysis between lean subjects and obese patients before surgery (lean $\times$ BS) is depicted. **E:** Intergroup analysis between obese patients before surgery and obese patients after surgery (BS $\times$ AS) is depicted. Color bars represent t values. For intragroup analysis (A–C), hot colors indicate the common level of correlation and cold colors indicate the common level of anticorrelation with the time course provided by the seed within each group. For intergroup analysis (D and E), hot colors indicate the level of differences between two groups toward lean and obese patients before surgery, respectively, and cold colors indicate the level of differences between two groups toward obese patients before and after surgery, respectively. AS, after surgery; BS, before surgery; Cb, cerebellum; Hy, hypothalamus; Oc, occipital cortex; Of, orbitofrontal cortex; Ss, somatosensory cortex. (A high-quality digital representation of this figure is available in the online issue.)

hormone and nutrient-sensing neurons and provides the integration for the energy intake and expenditure responses (19). Defective leptin and insulin signaling in this region provides the basis for experimental obesity (5,19). The somatosensory and orbitofrontal cortices integrate feeding cues with gustatory activity and facial movements, respectively. The activities of these regions have been shown to be modulated after a meal or glucose ingestion (13,20,21), and data obtained from experimental animals reinforce their role in the control of feeding and energy homeostasis (5,19). The massive loss of body mass obtained after surgery produced obvious changes in the functionality of the brain. By either analytic method, it is clear that changes occurred toward the patterns found in lean subjects. This is particularly evident in the TCA spatial analysis, which showed only minor differences when lean subjects were compared with obese subjects after surgery (Fig. 2B, W1, W2, and W3 – Lean $\times$ AS). Another remarkable finding was the increased levels of IL-10 and IL-6 in the CSF of obese subjects after surgery. In a recent study, increased levels of both these cytokines were shown to play a role in the reduction of hypothalamic resistance to leptin after physical activity (22). Although inflammatory cytokines were not detected in the current study, we believe that advancement in measurement methods will allow quantification of these cytokines and a comparison with the findings in animal models, which show reductions in both TNF- α and IL-1 β after body mass loss (3,4).

The human brain activity in response to glucose ingestion is modified by obesity, and body mass loss reestablishes some of the parameters. We cannot be sure if a longer period of time elapsed from the surgery or whether the complete restoration of body mass to levels similar to those of lean control subjects would completely correct the dysfunction. As observed in experimental obesity, neuronal apoptosis in the hypothalamus can affect distinct cellular subpopulations, leading to a defective response to hormonal and nutritional inputs (7). Should a similar phenomenon occur in humans, a complete restoration of the functional activity may not be achieved. Nevertheless, the increase in the anti-inflammatory activity detected in the CSF of obese patients after the loss of body mass is remarkable. In addition to the well-known anti-inflammatory activity of IL-10, the inhibition of neuronal degeneration through the reduction of apoptosis has been reported (23). Thus, we can hypothesize that body mass loss or other conditions that increase IL-10 in the brain may reduce neuronal damage resulting in the restoration of functionality. Moreover, these findings place IL-10 and perhaps IL-6 as attractive therapeutic agents for obesity, as recently suggested (22).

In conclusion, reduction of body mass in obese humans increases the anti-inflammatory activity in the CSF and partially corrects the dysfunctional activity in response to glucose in selected brain areas. These data suggest that obesity and body mass loss affect the human brain in a manner similar to the animal models for this disease.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo. The Laboratory of Cell Signaling belongs to the Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia–Obesidade e Diabetes. F.R.S.P., P.T.F., L.M.L., and F.C. are affiliated with the Cooperação Interinstitucional de Apoio a Pesquisas sobre o Cerebro.

No potential conflicts of interest relevant to this article were reported.

S.v.d.S.-L. performed patient care and collected clinical and nutritional data. F.R.S.P. performed neuroimaging studies. D.E.C. performed patient care and collected clinical and nutritional data. P.T.F. performed neuroimaging studies. A.R.C. and C.R.G. collected and evaluated data. E.A.C., J.C.P., and B.G. performed surgery and the metabolic studies. L.M.L. and F.C. performed neuroimaging studies. L.A.V. conceived, organized, and wrote the article.

The authors thank Dr. N. Conran, University of Campinas, for editing the English grammar.

REFERENCES

- Kelly T, Yang W, Chen CS, Reynolds K, He J. Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. *Int J Obes (Lond)* 2008;32:1431–1437
- Després JP, Lemieux I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* 2006;444:881–887
- De Souza CT, Araújo EP, Bordin S, et al. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology* 2005;146:4192–4199
- Milanski M, Degasperi G, Coope A, et al. Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *J Neurosci* 2009;29:359–370
- Velloso LA, Araújo EP, de Souza CT. Diet-induced inflammation of the hypothalamus in obesity. *Neuroimmunomodulation* 2008;15:189–193
- Yang L, Hotamisligil GS. Stressing the brain, fattening the body. *Cell* 2008;135:20–22

7. Moraes JC, Coope A, Morari J, et al. High-fat diet induces apoptosis of hypothalamic neurons. *PLoS ONE* 2009;4:e5045
8. Thaler JP, Schwartz MW. Minireview: Inflammation and obesity pathogenesis: the hypothalamus heats up. *Endocrinology* 2010;151:4109–4115
9. Ozcan L, Ergin AS, Lu A, et al. Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance. *Cell Metab* 2009;9:35–51
10. Zhang X, Zhang G, Zhang H, Karin M, Bai H, Cai D. Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell* 2008;135:61–73
11. Gastrointestinal surgery for severe obesity: National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement. *Am J Clin Nutr* 1992;55 (Suppl.):615S–619S
12. de Carvalho CP, Marin DM, de Souza AL, et al. GLP-1 and adiponectin: effect of weight loss after dietary restriction and gastric bypass in morbidly obese patients with normal and abnormal glucose metabolism. *Obes Surg* 2009;19:313–320
13. Liu Y, Gao JH, Liu HL, Fox PT. The temporal response of the brain after eating revealed by functional MRI. *Nature* 2000;405:1058–1062
14. Pereira FR, Alessio A, Sercheli MS, et al. Asymmetrical hippocampal connectivity in mesial temporal lobe epilepsy: evidence from resting state fMRI. *BMC Neurosci* 2010;11:66
15. Biswal BB, Van Kylen J, Hyde JS. Simultaneous assessment of flow and BOLD signals in resting-state functional connectivity maps. *NMR Biomed* 1997;10:165–170
16. Robertson C, Conway R, Dennis B, Yarnell J, Stamler J, Elliott P. Attainment of precision in implementation of 24 h dietary recalls: INTERMAP UK. *Br J Nutr* 2005;94:588–594
17. Esposito K, Pontillo A, Di Palo C, et al. Effect of weight loss and lifestyle changes on vascular inflammatory markers in obese women: a randomized trial. *JAMA* 2003;289:1799–1804
18. Colonnese MT, Phillips MA, Constantine-Paton M, Kaila K, Jasanoff A. Development of hemodynamic responses and functional connectivity in rat somatosensory cortex. *Nat Neurosci* 2008;11:72–79
19. Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 2006;443:289–295
20. Matsuda M, Liu Y, Mahankali S, et al. Altered hypothalamic function in response to glucose ingestion in obese humans. *Diabetes* 1999;48:1801–1806
21. Führer D, Zysset S, Stumvoll M. Brain activity in hunger and satiety: an exploratory visually stimulated fMRI study. *Obesity (Silver Spring)* 2008;16:945–950
22. Ropelle ER, Flores MB, Cintra DE, et al. IL-6 and IL-10 anti-inflammatory activity links exercise to hypothalamic insulin and leptin sensitivity through IKKbeta and ER stress inhibition. *PLoS Biol* 2010;8:e1000465
23. Bachis A, Colangelo AM, Vicini S, et al. Interleukin-10 prevents glutamate-mediated cerebellar granule cell death by blocking caspase-3-like activity. *J Neurosci* 2001;21:3104–3112

CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que humanos obesos apresentam alterações da atividade funcional do cérebro em resposta à glicose. Tais alterações foram observadas predominantemente no hipotálamo, e nos córtices somatossensorial e orbitofrontal. A redução da massa corporal induzida pela cirurgia bariátrica foi acompanhada por uma restauração parcial da atividade neuronal e por um aumento da atividade anti-inflamatória no líquido cefalorraquidiano destes pacientes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO | Obesity and overweight [Internet]. [citado 2011 out 2];Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>
2. Kelly T, Yang W, Chen C-S, Reynolds K, He J. Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. *Int J Obes (Lond)*. 2008 set;32(9):1431–7.
3. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009: despesas, rendimento e condições de vida. Rio de Janeiro: IBGE; 2010.
4. Monteiro CA, Conde WL, Popkin BM. Income-specific trends in obesity in Brazil: 1975-2003. *Am J Public Health*. 2007 out;97(10):1808–12.
5. Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature*. 2000 abr 6;404(6778):635–43.
6. Adams KF, Schatzkin A, Harris TB, Kipnis V, Mouw T, Ballard-Barbash R, et al. Overweight, obesity, and mortality in a large prospective cohort of persons 50 to 71 years old. *N. Engl. J. Med*. 2006 ago 24;355(8):763–78.
7. Farooqi S, O'Rahilly S. Genetics of obesity in humans. *Endocr. Rev*. 2006 dez;27(7):710–8.
8. Haslam D. Obesity: a medical history. *Obes Rev*. 2007 mar;8 Suppl 1:31–6.
9. Swinburn BA, Sacks G, Hall KD, McPherson K, Finegood DT, Moodie ML, et al. The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. *Lancet*. 2011 ago 27;378(9793):804–14.
10. Friedman JM. Modern science versus the stigma of obesity. *Nat. Med*. 2004 jun;10(6):563–9.
11. Velloso LA, Schwartz MW. Altered hypothalamic function in diet-induced obesity. *International Journal of Obesity* (2005) [Internet]. 2011 mar 8 [citado 2011 set 30];Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21386802>
12. Williams DL, Schwartz MW. Neuroanatomy of body weight control: lessons learned from leptin. *J. Clin. Invest*. 2011 jun 1;121(6):2152–5.
13. Brobeck JR, Tepperman J, Long CN. Experimental Hypothalamic Hyperphagia in the Albino Rat. *Yale J Biol Med*. 1943 jul;15(6):831–53.
14. Hetherington AW, Ranson SW. Experimental Hypothalamico-Hypophyseal Obesity in the Rat. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.). 1939 jun 1;41(2):465–6.

15. Anand BK, Brobeck JR. Hypothalamic control of food intake in rats and cats. *Yale J Biol Med.* 1951 nov;24(2):123–40.
16. Arees EA, Mayer J. Anatomical connections between medial and lateral regions of the hypothalamus concerned with food intake. *Science.* 1967 set 29;157(796):1574–5.
17. Liebelt RA, Vismara L, Liebelt AG. Autoregulation of adipose tissue mass in the mouse. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1968 fev;127(2):458–62.
18. Adolph EF. Urges to eat and drink in rats. *Am. J. Physiol.* 1947 nov 1;151(1):110–25.
19. Kennedy GC. The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 1953 jan 15;140(901):578–96.
20. Hervey GR. The effects of lesions in the hypothalamus in parabiotic rats. *J. Physiol. (Lond.).* 1959 mar 3;145(2):336–52.
21. Ingalls AM, Dickie MM, Snell GD. Obese, a new mutation in the house mouse. *J. Hered.* 1950 dez;41(12):317–8.
22. Hummel KP, Dickie MM, Coleman DL. Diabetes, a new mutation in the mouse. *Science.* 1966 set 2;153(740):1127–8.
23. Coleman DL. Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice. *Diabetologia.* 1973 ago;9(4):294–8.
24. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 1994 dez 1;372(6505):425–32.
25. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell.* 1995 dez 29;83(7):1263–71.
26. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N. Engl. J. Med.* 1996 fev 1;334(5):292–5.
27. Friedman JM. Leptin at 14 y of age: an ongoing story. *Am. J. Clin. Nutr.* 2009 mar;89(3):973S–979S.
28. Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI, et al. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature.* 1996 fev 15;379(6566):632–5.

29. Bjørbaek C, Uotani S, da Silva B, Flier JS. Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. *J. Biol. Chem.* 1997 dez 19;272(51):32686–95.
30. Bjørbaek C, Kahn BB. Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent Prog. Horm. Res.* 2004;59:305–31.
31. Bjørbaek C, El-Haschimi K, Frantz JD, Flier JS. The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance. *J. Biol. Chem.* 1999 out 15;274(42):30059–65.
32. Zabolotny JM, Bence-Hanulec KK, Stricker-Krongrad A, Haj F, Wang Y, Minokoshi Y, et al. PTP1B regulates leptin signal transduction in vivo. *Dev. Cell.* 2002 abr;2(4):489–95.
33. Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, et al. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science.* 1995 jul 28;269(5223):543–6.
34. Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, et al. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science.* 1995 jul 28;269(5223):540–3.
35. Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science.* 1995 jul 28;269(5223):546–9.
36. Coll AP, Farooqi IS, O'Rahilly S. The hormonal control of food intake. *Cell.* 2007 abr 20;129(2):251–62.
37. Velloso LA. [The hypothalamic control of feeding and thermogenesis: implications on the development of obesity]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2006 abr;50(2):165–76.
38. Sandoval D, Cota D, Seeley RJ. The integrative role of CNS fuel-sensing mechanisms in energy balance and glucose regulation. *Annu. Rev. Physiol.* 2008;70:513–35.
39. Field BCT, Chaudhri OB, Bloom SR. Bowels control brain: gut hormones and obesity. *Nat Rev Endocrinol.* 2010 ago;6(8):444–53.
40. Woods SC, D'Alessio DA. Central control of body weight and appetite. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2008 nov;93(11 Suppl 1):S37–50.
41. Benoit SC, Clegg DJ, Seeley RJ, Woods SC. Insulin and leptin as adiposity signals. *Recent Prog. Horm. Res.* 2004;59:267–85.

42. Lin X, Taguchi A, Park S, Kushner JA, Li F, Li Y, et al. Dysregulation of insulin receptor substrate 2 in beta cells and brain causes obesity and diabetes. *J. Clin. Invest.* 2004 out;114(7):908–16.
43. Niswender KD, Morrison CD, Clegg DJ, Olson R, Baskin DG, Myers MG Jr, et al. Insulin activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the hypothalamic arcuate nucleus: a key mediator of insulin-induced anorexia. *Diabetes.* 2003 fev;52(2):227–31.
44. Porte D Jr, Baskin DG, Schwartz MW. Insulin signaling in the central nervous system: a critical role in metabolic homeostasis and disease from *C. elegans* to humans. *Diabetes.* 2005 maio;54(5):1264–76.
45. Carvalheira JB, Siloto RM, Ignacchitti I, Brenelli SL, Carvalho CR, Leite A, et al. Insulin modulates leptin-induced STAT3 activation in rat hypothalamus. *FEBS Lett.* 2001 jul 6;500(3):119–24.
46. Schwartz MW. Central nervous system regulation of food intake. *Obesity (Silver Spring).* 2006 fev;14 Suppl 1:1S-8S.
47. Heymsfield SB, Greenberg AS, Fujioka K, Dixon RM, Kushner R, Hunt T, et al. Recombinant leptin for weight loss in obese and lean adults: a randomized, controlled, dose-escalation trial. *JAMA.* 1999 out 27;282(16):1568–75.
48. Hukshorn CJ, Saris WH, Westerterp-Plantenga MS, Farid AR, Smith FJ, Campfield LA. Weekly subcutaneous pegylated recombinant native human leptin (PEG-OB) administration in obese men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2000 nov;85(11):4003–9.
49. El-Haschimi K, Pierroz DD, Hileman SM, Bjørbaek C, Flier JS. Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. *J. Clin. Invest.* 2000 jun;105(12):1827–32.
50. Prada PO, Zecchin HG, Gasparetti AL, Torsoni MA, Ueno M, Hirata AE, et al. Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. *Endocrinology.* 2005 mar;146(3):1576–87.
51. De Souza CT, Araujo EP, Bordin S, Ashimine R, Zollner RL, Boschero AC, et al. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology.* 2005 out;146(10):4192–9.
52. Thaler JP, Schwartz MW. Minireview: Inflammation and obesity pathogenesis: the hypothalamus heats up. *Endocrinology.* 2010 set;151(9):4109–15.

53. Hileman SM, Pierroz DD, Masuzaki H, Bjørbaek C, El-Haschimi K, Banks WA, et al. Characterization of short isoforms of the leptin receptor in rat cerebral microvessels and of brain uptake of leptin in mouse models of obesity. *Endocrinology*. 2002 mar;143(3):775–83.
54. Stein LJ, Dorsa DM, Baskin DG, Figlewicz DP, Porte D Jr, Woods SC. Reduced effect of experimental peripheral hyperinsulinemia to elevate cerebrospinal fluid insulin concentrations of obese Zucker rats. *Endocrinology*. 1987 nov;121(5):1611–5.
55. Caro JF, Kolaczynski JW, Nyce MR, Ohannesian JP, Opentanova I, Goldman WH, et al. Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet*. 1996 jul 20;348(9021):159–61.
56. Belgardt BF, Brüning JC. CNS leptin and insulin action in the control of energy homeostasis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2010 nov;1212:97–113.
57. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 1993 jan 1;259(5091):87–91.
58. Hotamisligil GS, Budavari A, Murray D, Spiegelman BM. Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor- α . *J. Clin. Invest*. 1994 out;94(4):1543–9.
59. Schenk S, Saberi M, Olefsky JM. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J. Clin. Invest*. 2008 set;118(9):2992–3002.
60. Unger EK, Piper ML, Olofsson LE, Xu AW. Functional role of c-Jun-N-terminal kinase in feeding regulation. *Endocrinology*. 2010 fev;151(2):671–82.
61. Zhang X, Zhang G, Zhang H, Karin M, Bai H, Cai D. Hypothalamic IKK β /NF- κ B and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell*. 2008 out 3;135(1):61–73.
62. Mori H, Hanada R, Hanada T, Aki D, Mashima R, Nishinakamura H, et al. Socs3 deficiency in the brain elevates leptin sensitivity and confers resistance to diet-induced obesity. *Nat. Med*. 2004 jul;10(7):739–43.
63. Howard JK, Flier JS. Attenuation of leptin and insulin signaling by SOCS proteins. *Trends Endocrinol. Metab*. 2006 nov;17(9):365–71.
64. Reed AS, Unger EK, Olofsson LE, Piper ML, Myers MG Jr, Xu AW. Functional role of suppressor of cytokine signaling 3 upregulation in

hypothalamic leptin resistance and long-term energy homeostasis. *Diabetes*. 2010 abr;59(4):894–906.

65. Bence KK, Delibegovic M, Xue B, Gorgun CZ, Hotamisligil GS, Neel BG, et al. Neuronal PTP1B regulates body weight, adiposity and leptin action. *Nat. Med*. 2006 ago;12(8):917–24.
66. Picardi PK, Calegari VC, Prada P de O, Moraes JC, Araújo E, Marcondes MCGG, et al. Reduction of hypothalamic protein tyrosine phosphatase improves insulin and leptin resistance in diet-induced obese rats. *Endocrinology*. 2008 ago;149(8):3870–80.
67. Münzberg H, Flier JS, Bjørbaek C. Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice. *Endocrinology*. 2004 nov;145(11):4880–9.
68. Zabolotny JM, Kim Y-B, Welsh LA, Kershaw EE, Neel BG, Kahn BB. Protein-tyrosine phosphatase 1B expression is induced by inflammation in vivo. *J. Biol. Chem*. 2008 maio 23;283(21):14230–41.
69. Benoit SC, Kemp CJ, Elias CF, Abplanalp W, Herman JP, Migrenne S, et al. Palmitic acid mediates hypothalamic insulin resistance by altering PKC-theta subcellular localization in rodents. *J. Clin. Invest*. 2009 set;119(9):2577–89.
70. Milanski M, Degasperi G, Coope A, Morari J, Denis R, Cintra DE, et al. Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *J. Neurosci*. 2009 jan 14;29(2):359–70.
71. Kleinridders A, Schenten D, Könnner AC, Belgardt BF, Mauer J, Okamura T, et al. MyD88 signaling in the CNS is required for development of fatty acid-induced leptin resistance and diet-induced obesity. *Cell Metab*. 2009 out;10(4):249–59.
72. Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell*. 2010 mar 19;140(6):900–17.
73. Ozcan L, Ergin AS, Lu A, Chung J, Sarkar S, Nie D, et al. Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance. *Cell Metab*. 2009 jan 7;9(1):35–51.
74. Lehnardt S, Massillon L, Follett P, Jensen FE, Ratan R, Rosenberg PA, et al. Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 2003 jul 8;100(14):8514–9.

75. Feng B, Yao PM, Li Y, Devlin CM, Zhang D, Harding HP, et al. The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages. *Nat. Cell Biol.* 2003 set;5(9):781–92.
76. Moraes JC, Coope A, Morari J, Cintra DE, Roman EA, Pauli JR, et al. High-fat diet induces apoptosis of hypothalamic neurons. *PLoS ONE.* 2009;4(4):e5045.
77. Pinto S, Roseberry AG, Liu H, Diano S, Shanabrough M, Cai X, et al. Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin. *Science.* 2004 abr 2;304(5667):110–5.
78. Horvath TL. Synaptic plasticity in energy balance regulation. *Obesity (Silver Spring).* 2006 ago;14 Suppl 5:228S-233S.
79. Horvath TL, Sarman B, García-Cáceres C, Enriori PJ, Sotonyi P, Shanabrough M, et al. Synaptic input organization of the melanocortin system predicts diet-induced hypothalamic reactive gliosis and obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010 ago 17;107(33):14875–80.
80. Ramachandrapa S, Farooqi IS. Genetic approaches to understanding human obesity. *J. Clin. Invest.* 2011 jun 1;121(6):2080–6.
81. Coll AP, Farooqi IS, Challis BG, Yeo GSH, O’Rahilly S. Proopiomelanocortin and energy balance: insights from human and murine genetics. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004 jun;89(6):2557–62.
82. Stenlöf K, Wernstedt I, Fjällman T, Wallenius V, Wallenius K, Jansson J-O. Interleukin-6 levels in the central nervous system are negatively correlated with fat mass in overweight/obese subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003 set;88(9):4379–83.
83. Allen TL, Febbraio MA. IL6 as a mediator of insulin resistance: fat or fiction? *Diabetologia.* 2010 mar;53(3):399–402.
84. Rotter V, Nagaev I, Smith U. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J. Biol. Chem.* 2003 nov 14;278(46):45777–84.
85. Franckhauser S, Elias I, Rotter Sopasakis V, Ferré T, Nagaev I, Andersson CX, et al. Overexpression of Il6 leads to hyperinsulinaemia, liver inflammation and reduced body weight in mice. *Diabetologia.* 2008 jul;51(7):1306–16.

86. Wallenius V, Wallenius K, Ahrén B, Rudling M, Carlsten H, Dickson SL, et al. Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. *Nat. Med.* 2002 jan;8(1):75–9.
87. Pedersen BK, Steensberg A, Fischer C, Keller C, Keller P, Plomgaard P, et al. The metabolic role of IL-6 produced during exercise: is IL-6 an exercise factor? *Proc Nutr Soc.* 2004 maio;63(2):263–7.
88. Flores MBS, Fernandes MFA, Ropelle ER, Faria MC, Ueno M, Velloso LA, et al. Exercise improves insulin and leptin sensitivity in hypothalamus of Wistar rats. *Diabetes.* 2006 set;55(9):2554–61.
89. Ropelle ER, Flores MB, Cintra DE, Rocha GZ, Pauli JR, Morari J, et al. IL-6 and IL-10 anti-inflammatory activity links exercise to hypothalamic insulin and leptin sensitivity through IKKbeta and ER stress inhibition. *PLoS Biol.* [Internet]. 2010 [citado 2011 out 2];8(8). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20808781>
90. Nybo L, Nielsen B, Pedersen BK, Møller K, Secher NH. Interleukin-6 release from the human brain during prolonged exercise. *J. Physiol. (Lond.).* 2002 ago 1;542(Pt 3):991–5.
91. Gao JH. Neuroimaging and obesity. *Obes. Res.* 2001 nov;9(11):729–30.
92. Tataranni PA, DelParigi A. Functional neuroimaging: a new generation of human brain studies in obesity research. *Obes Rev.* 2003 nov;4(4):229–38.
93. Carnell S, Gibson C, Benson L, Ochner CN, Geliebter A. Neuroimaging and obesity: current knowledge and future directions. *Obesity Reviews: An Official Journal of the International Association for the Study of Obesity* [Internet]. 2011 set 8 [citado 2011 out 18];Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21902800>
94. Matsuda M, Liu Y, Mahankali S, Pu Y, Mahankali A, Wang J, et al. Altered hypothalamic function in response to glucose ingestion in obese humans. *Diabetes.* 1999 set;48(9):1801–6.
95. Gautier JF, Chen K, Salbe AD, Bandy D, Pratley RE, Heiman M, et al. Differential brain responses to satiation in obese and lean men. *Diabetes.* 2000 maio;49(5):838–46.
96. Gautier JF, Del Parigi A, Chen K, Salbe AD, Bandy D, Pratley RE, et al. Effect of satiation on brain activity in obese and lean women. *Obes. Res.* 2001 nov;9(11):676–84.
97. Kenny PJ. Reward mechanisms in obesity: new insights and future directions. *Neuron.* 2011 fev 24;69(4):664–79.

98. Shin AC, Zheng H, Berthoud H-R. An expanded view of energy homeostasis: neural integration of metabolic, cognitive, and emotional drives to eat. *Physiol. Behav.* 2009 jul 14;97(5):572–80.
99. Grill HJ, Skibicka KP, Hayes MR. Imaging obesity: fMRI, food reward, and feeding. *Cell Metab.* 2007 dez;6(6):423–5.
100. Johnson PM, Kenny PJ. Dopamine D2 receptors in addiction-like reward dysfunction and compulsive eating in obese rats. *Nat. Neurosci.* 2010 maio;13(5):635–41.
101. Stice E, Yokum S, Bohon C, Marti N, Smolen A. Reward circuitry responsivity to food predicts future increases in body mass: moderating effects of DRD2 and DRD4. *Neuroimage.* 2010 maio 1;50(4):1618–25.
102. Stice E, Yokum S, Burger KS, Epstein LH, Small DM. Youth at risk for obesity show greater activation of striatal and somatosensory regions to food. *J. Neurosci.* 2011 mar 23;31(12):4360–6.
103. Stice E, Yokum S, Blum K, Bohon C. Weight gain is associated with reduced striatal response to palatable food. *J. Neurosci.* 2010 set 29;30(39):13105–9.
104. Wang GJ, Volkow ND, Logan J, Pappas NR, Wong CT, Zhu W, et al. Brain dopamine and obesity. *Lancet.* 2001 fev 3;357(9253):354–7.
105. Steele KE, Prokopowicz GP, Schweitzer MA, Magunson TH, Lidor AO, Kuwabawa H, et al. Alterations of central dopamine receptors before and after gastric bypass surgery. *Obes Surg.* 2010 mar;20(3):369–74.
106. Lutter M, Nestler EJ. Homeostatic and hedonic signals interact in the regulation of food intake. *J. Nutr.* 2009 mar;139(3):629–32.
107. LaBar KS, Gitelman DR, Parrish TB, Kim YH, Nobre AC, Mesulam MM. Hunger selectively modulates corticolimbic activation to food stimuli in humans. *Behav. Neurosci.* 2001 abr;115(2):493–500.
108. Cornier M-A, Salzberg AK, Endly DC, Bessesen DH, Rojas DC, Tregellas JR. The effects of overfeeding on the neuronal response to visual food cues in thin and reduced-obese individuals. *PLoS ONE.* 2009;4(7):e6310.
109. Farooqi IS, Bullmore E, Keogh J, Gillard J, O’Rahilly S, Fletcher PC. Leptin regulates striatal regions and human eating behavior. *Science.* 2007 set 7;317(5843):1355.
110. Figlewicz DP, Evans SB, Murphy J, Hoen M, Baskin DG. Expression of receptors for insulin and leptin in the ventral tegmental area/substantia nigra (VTA/SN) of the rat. *Brain Res.* 2003 fev 21;964(1):107–15.

111. Hommel JD, Trinko R, Sears RM, Georgescu D, Liu Z-W, Gao X-B, et al. Leptin receptor signaling in midbrain dopamine neurons regulates feeding. *Neuron*. 2006 set 21;51(6):801–10.
112. Fulton S, Pissios P, Manchon RP, Stiles L, Frank L, Pothos EN, et al. Leptin regulation of the mesoaccumbens dopamine pathway. *Neuron*. 2006 set 21;51(6):811–22.
113. Geiger BM, Behr GG, Frank LE, Caldera-Siu AD, Beinfeld MC, Kokkotou EG, et al. Evidence for defective mesolimbic dopamine exocytosis in obesity-prone rats. *FASEB J*. 2008 ago;22(8):2740–6.
114. Pfaffly J, Michaelides M, Wang G-J, Pessin JE, Volkow ND, Thanos PK. Leptin increases striatal dopamine D2 receptor binding in leptin-deficient obese (ob/ob) mice. *Synapse*. 2010 jul;64(7):503–10.

APÊNDICE 1

MÉTODOS

1. Sujeitos da pesquisa

Foram selecionados treze pacientes (onze mulheres e dois homens) do ambulatório de obesidade da disciplina de gastrocirurgia do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas, com idade entre 18 e 60 anos que preenchiam critérios para realização de cirurgia bariátrica de acordo com o *NIH Consensus Statement* (1). Os critérios de exclusão foram diabetes mellitus (glicemia de jejum maior ou igual a 126 mg/dl e/ou hemoglobina glicada acima de 6,5%), doença inflamatória ou infecciosa aguda ou crônica, doença neurológica, doença psiquiátrica, tabagismo, consumo de álcool maior ou igual a 30 g por dia para homens e 15 g por dia para mulheres, uso de drogas ilícitas, uso de anti-inflamatórios não hormonais ou corticoides nos últimos três meses, neoplasias, gestação, níveis de enzimas hepáticas maiores do que três vezes o limite superior da normalidade, insuficiência renal crônica, massa corporal maior ou igual a 150 kg e presença de implantes metálicos não-removíveis (os dois últimos critérios de exclusão se devem a questões técnicas referentes à ressonância magnética).

Foram selecionados ainda, para o grupo controle, oito indivíduos (seis mulheres e dois homens) entre os estudantes de pós-graduação da universidade, com índice de massa corporal inferior a 25 kg/m² e circunferência abdominal menor do que 94 cm (homens) ou 80 cm (mulheres). Os critérios de exclusão foram os mesmos utilizados para o grupo de pacientes obesos.

Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, e o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

2. Procedimentos

Os indivíduos obesos foram avaliados antes e aproximadamente oito meses após realização de cirurgia bariátrica, enquanto o grupo controle foi submetido a apenas uma avaliação. Os procedimentos do estudo consistiram de antropometria, interrogatório nutricional, ressonância magnética funcional, análise de amostras de sangue e líquido cefalorraquidiano (LCR). Apenas para o LCR, as amostras para controle (em número de oito) foram obtidas de pacientes atendidos no serviço de emergência do Hospital das Clínicas por cefaléia, cuja análise celular e bioquímica mostrou-se normal. Estes pacientes satisfaziam a todos os critérios anteriormente citados para o grupo controle.

2.1. Técnica cirúrgica

Todos os pacientes foram operados pela equipe de cirurgia bariátrica do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas. Foi realizado *bypass* gástrico em Y de Roux com anel inelástico, por laparotomia – técnica de Fobi-Capella (2). Sucintamente, o volume gástrico é reduzido através da criação de uma pequena bolsa (30 ml) junto à curvatura menor do estômago. O jejuno é seccionado a 150 cm do ângulo de Treitz e anastomosado à bolsa gástrica, para onde o alimento é redirecionado (alça alimentar ou eferente). Um anel inelástico de silicone na anastomose gastrojejunal limita o esvaziamento gástrico. A maior parte do estômago, o duodeno e o jejuno proximal ficam excluídos da passagem dos alimentos (alça biliar ou aferente). A anastomose da alça excluída é feita a 150 cm da união gastrojejunal, em Y de Roux.

2.2. Interrogatório nutricional

Pacientes e controles foram avaliados quanto às características de suas dietas para determinação do consumo médio dos macronutrientes. Foram

aplicadas as técnicas do Recordatório de 24 horas (3) e do Questionário de Frequência de Consumo Alimentar (4).

2.2.1. Recordatório de 24 horas (R24h)

A técnica consistiu na arguição sobre o consumo alimentar detalhado das últimas 24 horas, realizada por profissional especializado. Os inquéritos foram realizados evitando-se os dias pós-finais de semana ou feriados, quando o hábito alimentar tende a ser alterado. Foram avaliados os tipos de alimentos consumidos e a quantidade. Para auxiliar os pacientes em relação às quantidades, um álbum fotográfico eletrônico de medidas caseiras foi utilizado.

2.2.2. Questionário de Frequência de Consumo Alimentar (QFCA)

Os alimentos foram ordenados em sete grupos alimentares: cereais e leguminosas, óleos e gorduras, sobremesas e petiscos, carnes e ovos, leites e derivados, hortaliças e frutas e bebidas. Este último incluiu refrigerante e sucos industrializados. O suco *in natura* integrou o grupo das frutas. Cada grupo alimentar possuía entre 8 e 10 itens, exceto o grupo do leite e derivados, com 3 itens. O instrumento constou, ao todo, de 52 itens. As categorias de frequência de consumo incluíram: a) uma vez ao dia; b) duas ou mais vezes ao dia; c) quatro a seis vezes na semana; d) duas a três vezes na semana; e) uma vez na semana; f) uma vez ao mês; g) duas ou mais vezes ao mês; h) raramente ou nunca.

Com o auxílio de uma tabela de medidas caseiras e da tabela de composição de alimentos (TACO) (5), foi realizado o cálculo do consumo diário de cada item, tanto no R24h quanto no QFCA. No caso do QFCA, relacionou-se também a frequência de consumo de cada alimento, transformando-o para a base-dia. Médias e desvios-padrão foram obtidos para o R24h e para o QFCA. Foram registradas a frequência média usual de consumo de cada componente do QFCA e a respectiva unidade de tempo (por dia, semana ou mês). O levantamento também incluiu outras questões sobre práticas e preferências alimentares usuais, tais como: ingestão habitual de gordura visível das carnes, tipo de óleo utilizado

em saladas e no preparo das refeições, outros alimentos não listados de consumo habitual. Foi determinado o consumo calórico médio diário total e a quantidade absoluta e relativa de cada macronutriente, sendo que a gordura foi subdividida em seus constituintes fundamentais, ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados.

2.3. Estudo de imagem por ressonância magnética

As imagens de ressonância magnética foram adquiridas em um aparelho de 1,5 T GE (GE Healthcare, Waukesha, WI) no período da manhã, após os sujeitos terem permanecido em jejum por 12 horas. Dois tipos de sequências de pulso foram utilizados. O primeiro teve por objetivo a aquisição de dados estruturais do cérebro dos participantes utilizando-se imagens com alta resolução espacial, ponderadas por T1 em cortes sagitais de 5 mm com intervalo de 6 mm entre cortes consecutivos e matriz de 512 x 512. Os parâmetros das imagens estruturais foram definidos com o tempo de eco (TE) de 9 ms e tempo de repetição (TR) de 383 ms. A segunda sequência de pulso, denominada EPI (*echo planar image*), foi empregada para se observar aspectos da dinâmica cerebral. Nestas imagens, relações funcionais puderam ser impressas e associadas a eventos específicos. As imagens funcionais foram ponderadas por T2* com TR de 3 s e TE de 60 ms. O total de 600 volumes, correspondente a 30 minutos, foi obtido de forma contínua e ininterrupta. Cada volume foi composto por 20 cortes sagitais e matriz de 64 x 64. A espessura de cada corte funcional foi de 5 mm com intervalo de 1 mm entre os cortes consecutivos. O tamanho do voxel em cada volume foi de 3,75 x 3,75 x 6 mm.

Durante o exame, os participantes permaneceram em posição supina com imobilização da cabeça. Cinco minutos após o início da aquisição das imagens funcionais, os sujeitos iniciaram a ingestão de 50 g de D-glicose diluídos em 200 ml de água. A extremidade de um canudo de PVC de 1,2 m foi posicionada na cavidade oral antes do início do exame para permitir a ingestão da solução. A

aquisição das imagens continuou durante e após o término da ingestão da glicose. A partir do início da ingestão, as imagens funcionais foram adquiridas por mais 25 minutos que, somados aos 5 minutos iniciais, totalizaram 30 minutos de exame.

2.3.1. Pré-processamento das imagens

Todas as etapas do pré-processamento foram realizadas utilizando-se ferramentas específicas do programa AFNI (*Analysis of Functional NeuroImages*). As imagens funcionais, originalmente em arquivos de duas dimensões no formato DICOM, foram convertidas em séries temporais de três dimensões no formato BRIK com a ferramenta “to3d” e reorientadas. Os dez primeiros volumes, correspondentes aos 30 segundos iniciais, foram removidos das etapas seguintes a fim de se eliminar das análises efeitos de saturação magnética. A seguir, os parâmetros de rotação e translação foram extraídos para se realizar as correções de movimento (*motion correction*). Estes parâmetros foram obtidos tomando-se o primeiro volume como referência. Em seguida, foi realizada a correção de deslocamento temporal de cada corte no volume (*slice timing correction*). Devido à pequena diferença no tempo de aquisição entre os cortes de um mesmo volume, pequenas alterações de sinal foram corrigidas considerando-se o tempo real de aquisição do corte. Esta etapa foi realizada tomando-se o corte de número dez como referência, ou seja, um corte no meio da aquisição. Posteriormente, as imagens foram registradas no espaço padrão (*normalization*) do modelo MNI (*Montreal Neurological Institute*) para que os dados de todos os sujeitos pudessem ser comparados. Por fim, as imagens remanescentes foram suavizadas com FWHM (largura de uma gaussiana na metade de sua altura) de 6 mm para minimizar ruídos de bordas.

As imagens estruturais foram convertidas do formato DICOM para BRIK e, posteriormente, foi extraída a calota craniana. A seguir, as imagens foram registradas no espaço padrão.

2.3.2. Análise das imagens funcionais

2.3.2.1. *Temporal Cluster Analysis* (TCA)

A técnica de TCA tem como objetivo detectar um paradigma para ser correlacionado com as séries temporais. O TCA pode ser dividido em três fases. A primeira é caracterizada pela detecção do valor máximo da intensidade do voxel em cada série temporal. A segunda é definida por uma nova representação das séries temporais, anulando-se os voxels que não possuem valor máximo. A terceira é expressa pela soma dos valores das intensidades dos voxels remanescentes em cada ponto no tempo. A curva originada após a terceira etapa constitui-se como modelo de paradigma a ser empregado na regressão linear com as imagens pré-processadas. A primeira e a segunda fases são realizadas voxel-a-voxel enquanto a terceira é desenvolvida volume-a-volume.

O algoritmo para extração da curva de TCA foi desenvolvido utilizando-se rotinas em Matlab e, a seguir, foi empregado nas imagens pré-processadas de cada participante. A curva de TCA de cada sujeito foi normalizada e, posteriormente, foi feita a média desta curva em cada grupo (controle, paciente antes e depois da cirurgia). Foram dispostas no mesmo gráfico as curvas de TCA dos grupos onde se evidenciaram três situações distintas. A primeira, representada por uma janela de tempo imediatamente após a ingestão de glicose. A segunda, caracterizada pela diferenciação entre controles e pacientes. E a terceira, definida pela diferenciação entre os três grupos. Estas três janelas temporais constituíram os paradigmas para a modelagem de regressão linear geral (GLM) empregada nas imagens pré-processadas para a obtenção dos mapas estatísticos de TCA de cada sujeito.

Os mapas estatísticos de TCA foram utilizados em análises de segundo nível intra- e intergrupos empregando-se o teste t de Student para, respectivamente, uma e duas amostras (grupos). O valor p foi corrigido para múltiplas comparações utilizando-se simulações de Monte-Carlo e o resultado da análise de TCA limitou-se a valores de significância com t superiores a 2,1 e p

inferiores a 0,01. Toda a estatística de segundo nível foi realizada utilizando-se o programa AFNI.

2.3.2.2. Conectividade Funcional (fcMRI)

As imagens pré-processadas foram filtradas removendo-se as frequências superiores a 0,08 Hz e inferiores a 0,01 Hz. Esta etapa foi desenvolvida com a ferramenta “3dBandpass” do programa AFNI. Duas esferas de 5 mm foram definidas utilizando-se as coordenadas do espaço padrão do MNI. Cada esfera foi posicionada sobre o hipotálamo à direita e à esquerda. As séries temporais encerradas pelas esferas foram extraídas e calcularam-se as médias destas séries temporais. A curva resultante da média foi correlacionada com todas as séries temporais do respectivo sujeito. Os mapas de conectividade individuais que resultaram desta correlação foram utilizados na análise de segundo nível intra- e intergrupo, empregando-se o teste *t* de Student. O valor *p* foi corrigido utilizando-se simulações de Monte-Carlo com a ferramenta “AlphaSim” do AFNI. Os parâmetros de conectividade para a análise de grupo, por fim, ficaram limitados valores de *p* inferiores a 0,05. Todas as etapas da análise de conectividade funcional foram desenvolvidas no programa AFNI.

2.4. Exames laboratoriais (sangue e LCR)

A coleta de amostras de sangue foi realizada por punção venosa antecubital, e a coleta de LCR, por punção lombar, após jejum de 12 horas. Foram realizados os seguintes exames pelo Laboratório de Patologia Clínica da Universidade Estadual de Campinas, utilizando-se sistemas automatizados e kits comercialmente disponíveis, no sangue: glicose, hemoglobina glicada (método HPLC), colesterol total e frações, triglicérides, creatinina, TGO, TGP, fosfatase alcalina, gama-GT, proteína C-reativa ultrasensível (PCR), velocidade de hemossedimentação (VHS); e no LCR: glicose, proteínas e contagens de hemácias e leucócitos. Foram realizadas ainda dosagens séricas de insulina,

leptina e adiponectina, pelo método de ELISA (Millipore – Billerica, MA), além de dosagens no soro e LCR de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10, utilizando-se kits ultrasensíveis de ELISA (BD Biosciences – Bedford, MA e Cayman Chemical – Ann Arbor, MI).

3. Análise estatística

Foram obtidas as médias e desvio padrão das médias de todos os parâmetros clínicos e laboratoriais analisados para os grupos: pacientes obesos antes da cirurgia, pacientes obesos após a cirurgia e controles. Foi utilizado o teste *t* de Student para comparação entre as médias dos grupos e o coeficiente de Pearson para análise de correlação entre as variáveis, sendo consideradas diferenças significativas aquelas com $p < 0.05$.

Referências

1. Gastrointestinal surgery for severe obesity: National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement. Am J Clin Nutr. 1992 Feb;55(2 Suppl):615S-619S.
2. de Carvalho CP, Marin DM, de Souza AL, Pareja JC, Chaim EA, de Barros Mazon S, da Silva CA, Geloneze B, Muscelli E, Alegre SM. GLP-1 and adiponectin: effect of weight loss after dietary restriction and gastric bypass in morbidly obese patients with normal and abnormal glucose metabolism. Obes Surg. 2009 Mar;19(3):313-20.
3. Robertson C, Conway R, Dennis B, Yarnell J, Stamler J, Elliott P. Attainment of precision in implementation of 24 h dietary recalls: INTERMAP UK. Br J Nutr. 2005 Oct;94(4):588-94.
4. Ribeiro AC, Sávio KEO, Rodrigues MLCF, Costa THM, Schmitz BAS. Validação de um questionário de frequência de consumo alimentar para população adulta. Rev Nutr Campinas 2006 set/out; 19(5):553-562.
5. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação. Universidade Estadual de Campinas [NEPA/Unicamp]. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos [TACO]: versão 1. São Paulo: NEPA/Unicamp; 2004.

APÊNDICE 2

Tabelas de dados antropométricos e laboratoriais individuais

Pacientes antes da cirurgia													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Peso (kg)	108,4	101	111,2	102,8	98,2	106	93,4	120,6	125,8	100,6	81,8	98,8	99,6
IMC (kg/m ²)	39,8	34,9	41,3	40,7	40,4	38	37,4	40,3	39,3	40,8	40	36,3	38,9
CA (cm)	105	97	115	111	105	112	99	131	125	116	111	106	101
CQ (cm)	126	122	128	128	135	133	120	138	127	127	119	123	125
Glicose (mg/dL)	82	89	89	90	82	83	93	91	78	72	77	85	86
HbA1c (%)	5,7	5,5	5,7	5,9	5,2	5,3	5,4	4,9	5,1	4,7	5	4,7	5,5
Insulina (μUI/mL)	12	4,7	20,9	13,6	4,3	17,1	3	11,4	8,9	8,7	2	10	12
HOMA IR	2,43	1,03	4,59	3,02	0,87	3,5	0,69	2,56	1,71	1,55	0,38	2,1	2,55
Col (mg/dL)	173	183	136	122	118	142	164	165	122	170	139	172	190
HDL (mg/dL)	34	52	34	38	42	30	36	29	38	34	36	41	36
LDL (mg/dL)	116	119	79	74	66	92	108	116	62	118	76	115	129
Trigl (mg/dL)	117	59	113	52	51	99	100	100	110	89	137	80	124
VHS (mm - 1 hora)	21	24	31	16	17	5	27	52	21		58	5	43
PCR (mg/dL)	0,95	0,74	0,83	0,69	2,52	0,18	0,68	2,4	0,23	0,87	1,29	0,18	0,16
Adipo (μg/mL)	1,08	5,99	1,58	5,20	3,85	2,43	0,20	2,45	3,24	0,65	0,98	4,33	4,36
Leptina (ng/mL)	37,34	24,62	47,22	55,45	32,22	48,31	38,76	29,44	26,34	33,78	23,99	23,28	58,39
TNF-α (pg/mL)	20,2	22,3	31,6	15,4	19,5	26,2	21,2	30,7	33,3	52,5	10,2	23,4	27,5
IL-1β (pg/mL)	22,4	76,9	104,9	14,3	32,1	62	25,3	44,9	54,7	46,1	38,7	21,2	14,4
IL-6 (pg/mL)	27,1	26,6	14,9	16,3	8,1	36,9	15,4	36,9	41,9	13,4	19,5	25,7	24,5
IL-10 (pg/mL)	6,3	4,8	9,5	7,7	6,6	4,3	9,8	31,3	14,5	65,1	16,3	17,6	9,1
LCR-gli (mg/dL)	33	56	48	52	67	57	58	56	63	46	55	47	50
LCR-prot (mg/dL)	54	21	13	28	19	17	29	22	37	25	17	39	26
LCR-leuco (/mm ³)	3	1	4	1	1	1	2	1	6	3	1	1	1
LCR-hem (/mm ³)	7	4	278	2	5	0	9	1	5376	119	2	2	6
LCR-IL-6 (pg/mL)	1,6	2,1	1,2	0,5	2,6	2,6	0,2	0,5	1,2	0,2	5,1	0,3	1,7
LCR-IL-10 (pg/mL)	22,5	7,4	10,2	5,8	20,7	4,1	13,4	22,8	29,8	19,4	25,1	16,3	7,4

Pacientes após a cirurgia													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Peso (kg)	73	68,4	85,8	81,7	74,1	73,9	67,8	91,8	94,7	70,4	52,1	65,2	73
IMC (kg/m ²)	26,8	23,7	31,9	32,3	30,4	26,5	27,2	30,7	29,6	28,6	25,5	23,9	28,5
CA (cm)	94	79	97	99	88	94	80	107	90	95	80	82	82
CQ (cm)	102	100	111	117	109	109	101	116	106	104	89	99	102
Glicose (mg/dL)	76	85	76	82	73	85	92	72	71	81	70	67	83
HbA1c (%)	5	5,3	5	5,8	5,1	5,3	5,4	5,3	5,1	4,6	4,7	4,4	5,3
Insulina (μUI/mL)	2,9	2,9	2	4,6	2	5,1	2,36	6,9	2,12	2,79	2	2	3,54
HOMA IR	0,54	0,61	0,38	0,93	0,36	1,07	0,54	1,23	0,37	0,56	0,35	0,33	0,72
Col (mg/dL)	161	152	117	137	136	129	154	144	131	147	134	121	178
HDL (mg/dL)	45	62	39	61	59	43	65	45	67	52	51	48	48
LDL (mg/dL)	95	74	62	63	67	71	79	75	50	80	68	61	113
Trigl (mg/dL)	106	79	80	64	51	77	51	121	70	77	76	59	86
VHS (mm - 1 hora)	5	6	31	12	20	2	16	17	16	8	30	19	32
PCR (mg/dL)	0,05	0,02	0,65	0,16	0,41	0,02	0,07	0,64	0,07	0,08	0,04	0,02	0,02
Adipo (μg/mL)	4,55	9,93	6,57	7,63	9,81	7,88	8,17	8,82	9,06	5,72	6,19	8,45	9,1
Leptina (ng/mL)	11	4,5	36,54	44,97	16,78	20,66	6,44	25,15	4,59	8,49	5,73	3,58	33,06
TNF-α (pg/mL)	4,7	15,6	25,5	5,9	5,2	11,1	5,2	18,3	14,4	32,3	1,1	12,6	10,2
IL-1β (pg/mL)	11,1	53,4	31,6	4,5	4,6	10,2	17,7	11,1	8,8	10,5	3,5	10,7	1,5
IL-6 (pg/mL)	20,8	12,9	7,6	2,6	3,1	14,4	10,5	17,3	2,7	1,7	11,4	4,6	1,9
IL-10 (pg/mL)	12,4	18,9	12,1	19,2	12,9	12,1	21,8	20,5	10	22,8	7,2	11,9	24,4
LCR-gli (mg/dL)	51	46	47	50	44	46	54	58		51	44	43	49
LCR-prot (mg/dL)	40	20	18	23	21	20	24	20		21	16	32	30
LCR-leuco (/mm ³)	2	1	2	2	1	1	2	16		1	0	0	2
LCR-hem (/mm ³)	2	0	75	22	9	170	24	103		2	117	1	3
LCR-IL-6 (pg/mL)	6,1	4,1	9,5	4,1	9,5	10,6	3,1	1,7	4,4	2,6	3,6	4,1	6,2
LCR-IL-10 (pg/mL)	28,8	31,9	19,2	19,2	31,3	34,9	23,1	68,3	52,8	52,3	42,6	19,4	25,6

Controles								
	1	2	3	4	5	6	7	8
Peso (kg)	50,2	61	69	43	75,4	53,5	39	53
IMC (kg/m ²)	20,4	23,5	23,9	19,1	23,5	20,9	17,3	19
CA (cm)	68	78	85	65	83	73	58	68
CQ (cm)	90	95	94	86	104	94	79	89
Glicose (mg/dL)	79	83	83	82	78	85	76	79
HbA1c (%)	4,9	4,9	4,6	5,2	4,8	5	4,5	5
Insulina (μUI/mL)	5,76	4,35	2,44	2,19	2,33	5,29	4,91	2
HOMA IR	1,12	0,89	0,5	0,44	0,45	1,11	0,92	0,39
Col (mg/dL)	192	166	184	132	216	203	218	203
HDL (mg/dL)	58	61	42	60	119	67	101	88
LDL (mg/dL)	119	92	121	63	82	127	86	106
Trigl (mg/dL)	74	63	106	43	74	43	156	45
VHS (mm - 1 hora)	22	10	11	29	8	2	35	2
PCR (mg/dL)	0,04	0,04	0,06	0,12	0,02	0,05	0,46	0,31
Adipo (μg/mL)	7,41	7,44	3,81	9,12	8,88	6,25	6,09	6,21
Leptina (ng/mL)	25,71	44,58	2,01	14,11	9,41	40,36	30,72	4,88
TNF-α (pg/mL)	12,4	1,2	1,7	13,7	2,9	0,6	3,3	11,1
IL-1β (pg/mL)	1,2	1,8	0,9	1,6	1,5	2,8	0,2	6,1
IL-6 (pg/mL)	7,1	1,9	1,5	5,1	1,6	1,8	1,2	13,2
IL-10 (pg/mL)	5,3	0,6	32,4	22	12,1	12,6	18,6	8,5
LCR-gli (mg/dL)	50	45	63	60	60	79	51	67
LCR-prot (mg/dL)	14	23	18	26	26	38	30	32
LCR-leuco (/mm ³)	2	2	1	1	1	3	3	1
LCR-hem (/mm ³)	0	1	124	1	1	2	14	30
LCR-IL-6 (pg/mL)	1,6	3,6	14,9	6,5	13,9	7,1	3,6	0,7
LCR-IL-10 (pg/mL)	19,9	6,6	6,9	24,1	17,9	23,3	18,6	28,2

IMC, índice de massa corporal; CA, circunferência abdominal, CQ, circunferência do quadril; HbA1c, hemoglobina glicada; Col, colesterol total; HDL, colesterol HDL; LDL, colesterol LDL; Trigl, triglicérides; VHS, velocidade de hemossedimentação; PCR, proteína C-reativa (ultrassensível); Adipo, adiponectina; TNF-α, fator de necrose tumoral-α; IL-1β, interleucina-1β; IL-6, interleucina-6; IL-10, interleucina-10; LCR, líquido cefalorraquidiano; gli, glicose; prot, proteínas; leuco, leucócitos; hem, hemácias.

APÊNDICE 3

Dietary fatty acid composition correlates with systemic inflammatory markers in severely obese subjects

Running title: Dietary fat consumption and inflammation

Key words: obesity, leptin, insulin, inflammation, blood sedimentation rate, C-reactive protein

Simone van de Sande-Lee¹, Lício A. Velloso¹, José C. Pareja², Bruno Geloneze³, Eliton A. Chaim², Denny E. Cintra^{1,4}

¹Laboratory of Cell Signaling, ²Department of Surgery, ³Laboratory of Investigation in Metabolism and Diabetes and ⁴Faculty of Applied Sciences, University of Campinas, Brazil

Corresponding Author: Licio A. Velloso, DCM – FCM, UNICAMP 13084-970, Campinas-SP, Brazil lavelloso.unicamp@gmail.com, Phone +55 19 35218022

Abstract

Sub-clinical inflammation is present in obese subjects and is regarded as one of the most important factors connecting obesity to insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. As recent genome-wide screening studies failed to provide a strong link between genetic factors and inflammation in obesity and type 2 diabetes, increased attention was turned to the search for the main environmental factors activating inflammation in the context of these diseases. Here we evaluated the correlations between a number of anthropometric, nutritional and metabolic factors and markers of inflammation in a selected group of obese patients undergoing bariatric surgery. We found that only the mean relative amounts of saturated, mono-, and polyunsaturated fatty acids consumed before surgery were correlated with markers of inflammation, such as erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein. After reduction of food intake and improvement of anthropometric and metabolic parameters provided by the surgery, the correlations no longer persisted. Thus, in severely obese patients, the relative amounts of distinct fatty acids consumed provide the most significant link with inflammatory markers, which reinforce the role of dietary fatty acids as determinants of obesity-associated inflammation.

Introduction

Chronic-, sub-clinical inflammation is a hallmark of obesity and is regarded as one of the most important factors contributing to the installation of insulin resistance and type 2 diabetes mellitus ¹. Systemic inflammation in obese subjects results from the production of inflammatory molecules in metabolically-active tissues, particularly the adipose tissue and the liver ^{2,3}. Both genetic and environmental factors play important roles in the induction of obesity-associated inflammation. However, a number of recent studies using a genome-wide screening technique failed to identify genes with a major role in the genesis of obesity and metabolic related diseases ^{4,5}. This fact has increased the interest in the involvement of environmental factors as the main determinants of disease initiation and progression ⁶.

In this respect, there is a considerable amount of data suggesting that a secular trend in the increased consumption of saturated fats may act as an important environmental factor, leading to the rise of obesity and metabolic diseases in human populations ⁷⁻¹¹.

Experimental data provide strong support for this concept since obesity and diabetes mellitus, in the presence of sub-clinical inflammation, can be easily induced in several rodent strains by the simple increase of saturated fatty acid content in the diet ¹². In addition, a number of population studies have reported positive correlations between the consumption of saturated fats and markers of inflammation ¹³⁻¹⁵ and, at least one study has shown that increased consumption of saturated fats is associated with increased inflammatory gene expression in the adipose tissue ¹⁶.

Since most of these population-based studies evaluated large cohorts with heterogeneous phenotypic characteristics, the impact of dietary composition as an isolated factor in the induction of inflammation in obesity is virtually unknown. Here, we evaluated a selected group of non-diabetic, severely obese patients, which were matched for a number of

factors known to influence or to be associated with sub-clinical inflammation. Nutritional habits were assessed upon enrollment according to the International Collaborative Study of Macro- and Micronutrients and Blood Pressure (INTERMAP) 24-h dietary recall ¹⁷. Significant positive association was found only for the consumption of saturated fats with the blood levels of C-reactive protein (CRP) and erythrocyte sedimentation rate, while the consumption of unsaturated fatty acids was inversely correlated only with the blood levels of CRP, and the consumption of polyunsaturated fats was inversely correlated only with erythrocyte sedimentation rate.

Methods and Procedures

Subjects (11 females, 2 males) were selected amongst the patients evaluated for bariatric surgery at the Clinics Hospital of the University of Campinas. Inclusion followed the National Institutes of Health criteria. Patients were considered eligible for the study if they were 18 to 60 years of age. Exclusion criteria were diabetes mellitus, inflammatory or infectious disease, neurologic or psychiatric disease, smoking, alcohol consumption of more than 30 g per day for men and 15 g per day for women and use of psychotropic or anti-inflammatory drugs. Subjects were evaluated before and eight months after a Roux-in-Y gastric bypass. Anthropometric data were obtained at every visit. Energy intake and dietary composition were estimated using the International Collaborative Study of Macro- and Micronutrients and Blood Pressure (INTERMAP) 24-h dietary recall ¹⁷.

Blood samples were collected by venipuncture after an overnight fast. Erythrocyte sedimentation rate was measured by an automated system (MicroTEST1X, Alifax S.P.A., Italy) and ultra-sensitive CRP was determined using a nephelometric method on a BN ProSpec Analyzer (Siemens, Germany). Insulin, leptin, and adiponectin were evaluated in

sera using ELISA kits from Millipore (Billerica, MA, USA). Interleukin-1 beta (IL-1 β , IL-10, IL-6 and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α , were evaluated in sera using ultra-sensitive ELISA kits from BD Biosciences (Bedford, MA, USA) and from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA). Blood biochemical parameters were determined using automated methods from F. Hoffmann-La Roche (Basel, Switzerland) and Beckman Coulter (Brea, CA, USA).

The study was approved by the University of Campinas Ethics Committee, and written informed consent was obtained from all subjects. Data were analyzed using the Pearson's correlation coefficient and a $p < 0.05$ was accepted as significant. Data are presented as means $\pm$ SD.

Results

Body mass index dropped from 39.1 ± 1.9 , before surgery, to 28.1 ± 2.8 kg/m² ($p < 0.05$), approximately eight months after surgery. This was accompanied by significant reductions in serum insulin (68.7 ± 38.1 vs. 21.5 ± 10.4 pmol/L, $p < 0.05$) and leptin (36.8 ± 12.0 vs. 17.0 ± 13.9 ng/ml, $p < 0.05$) levels, and by a significant increase in serum adiponectin (2.7 ± 1.8 vs. 7.8 ± 1.6 μ g/ml, $p < 0.05$) levels.

The correlations between a number of anthropometric and metabolic parameters known to be associated with inflammation in obese subjects were evaluated before surgery. As shown in Table 1, body mass index, waist circumference, fasting serum glucose, insulin, HOMA IR, and leptin were not correlated with inflammatory/anti-inflammatory markers such as blood leucocyte count, erythrocyte sedimentation rate (ESR), CRP, TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10. The anti-inflammatory and insulin-sensitizing protein, adiponectin, was

inversely associated with blood leucocyte counts (Table 1), but not with the remaining parameters.

Total caloric intake was $5,602 \pm 3,391$ kCal/day, before surgery. Relative fat consumption was $33.6 \pm 6.1\%$ of total caloric intake, which represented 223 ± 17 g of fat per day, or, $3,390 \pm 660$ kCal/day of fat. No correlation was found between the amount of fat consumed per day (g) or the relative amount of fat calories per day (%kCal) and the inflammatory/anti-inflammatory markers (Table 2).

Next, we evaluated the correlation of fat type consumption and inflammatory/anti-inflammatory markers. Although no correlation was detected between the consumption of saturated (SAT), monounsaturated (MUFA) or polyunsaturated (PUFA) fatty acids and cytokines and blood leukocyte counts (Table 3), the relative amounts of SAT (Fig. 1A) and PUFA (Fig. 1B) consumption were directly and inversely correlated with ESR, respectively. In addition, relative MUFA consumption was inversely correlated with CRP (Fig. 1C).

All the statistical analyses were repeated after body mass reduction, when total caloric intake had dropped to 803 ± 355 kCal/day and relative fat consumption was reduced to $30.3 \pm 11.6\%$. At this point, no correlation was detected between metabolic and nutritional parameters and inflammatory/anti-inflammatory markers (not shown).

Discussion

The progressive increase of body adiposity is rapidly accompanied by the infiltration of the adipose tissue by activated macrophages³. These cells produce inflammatory mediators such as TNF- α , IL-1 β and IL-6 that act in insulin-sensitive tissues, inducing the serine/threonine kinase activity of JNK and IKK, which will ultimately target and inhibit proteins of the insulin signaling pathway¹.

Because genetic factors are believed to play a role in up to 70% of the cases of type 2 diabetes ¹⁸, a tremendous effort has been made to identify genes that may play a decisive role in the connections between obesity, insulin-resistance and diabetes. However, as a result of genome wide screening studies, it seems now that instead of a few genes with a powerful effect, the most common forms of obesity and diabetes are due to the association of many different genes with a weak effect ^{4,5}. Most strikingly, no gene related to immune function has been identified by these studies, which reinforced the role of environmental factors as inducers of inflammation in the context of these diseases.

Accordingly, recent data obtained from experimental studies have revealed that saturated fats present in the diet can activate an inflammatory response in insulin and leptin sensitive tissues, acting through the innate immune system toll-like receptor 4 (TLR4) ^{19,20}, while unsaturated fatty acids exert an anti-inflammatory activity through the activation of GPR120 ²¹. These studies provided a strong molecular basis for the direct effect of dietary fats in the modulation of the inflammatory response and strengthen the role of these environmental factors as the determinants of obesity-associated inflammation.

In the present study, we evaluated the impact of dietary composition on systemic inflammatory and metabolic markers in a selected group of severely-obese patients undergoing bariatric surgery. Due to the major dietary, metabolic and anthropometric changes imposed by the surgery, we could reevaluate the same subjects after a short period of time, to estimate how changes in these parameters affected inflammation.

To our surprise, except for an inverse correlation between blood adiponectin levels and leucocyte counts, only the relative amounts of saturated and unsaturated fats in the diet of obese patients before surgery correlated with systemic markers of inflammation.

The association of dietary factors with inflammation in humans has been addressed by observational studies ¹³⁻¹⁵, and also by some dietary intervention studies ²²⁻³⁴. Fung and coworkers found that overall dietary patterns are predictors of plasma biomarkers of cardiovascular disease, and obesity risk, when evaluating the differences between men consuming a high- versus a low-fat diet ¹³. Analysis of data obtained from 4,900 adults in the 1999 to 2000 National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES 99-00) showed an association between saturated fat consumption and elevated CRP ¹⁴. Moreover, a cross-sectional study of 732 women from the Nurses' Health Study I cohort revealed a positive association between CRP and markers of endothelial dysfunction and a western dietary pattern; in addition, levels of CRP were higher in the highest quintile of saturated fat intake ¹⁵. On the other hand, intake of (n-3) fatty acids was inversely associated with biomarkers of inflammation ¹⁵. These data support an association between dietary patterns, particularly concerning different types of fat content, and systemic inflammation. However, results from intervention studies have been somewhat conflicting. Pirro and coworkers showed a decrease in CRP levels that was induced by a low-saturated-fat diet in subjects with hypercholesterolemia ²², but experimental diets with substitution of saturated and trans fatty acids in a standard-fat diet did not produce any significant effect on CRP levels ²³. Some randomized trials have reported anti-inflammatory effects of the consumption of a Mediterranean-style diet ²⁴ and with alpha-linolenic acid supplementation ^{25, 26}. In contrast, while a few studies with eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) supplementation have demonstrated an improvement in inflammatory status ^{27, 28}, most reported null effects ²⁹⁻³⁴. However, none of these studies evaluated severely-obese subjects. Interestingly, one recent study reported that consumption of a saturated fatty acid rich diet resulted in the increased expression of

genes involved in inflammation processes in adipose tissue, while a monounsaturated fatty acid rich diet led to a more anti-inflammatory gene expression profile ¹⁶.

ESR and CRP are sensitive, non-specific markers of inflammation, and have long been employed for clinical purposes. Both have been reported to increase in obesity and insulin resistance, suggesting an association of these conditions with chronic systemic inflammation ³⁵⁻³⁸. CRP is an acute phase protein, and has been the most studied biomarker of inflammation. Large prospective studies showed that it is an independent predictor of cardiovascular events ^{39, 40}. The rise in CRP levels in obesity is probably related to the infiltration of macrophages into the adipose tissue and release of inflammatory cytokines, including IL-6, which leads to increased production of CRP by the liver ⁴¹. Weight loss results in concomitant reduction of ESR and CRP ⁴², but the mechanisms that connect body mass loss with decreased inflammation are not clear. Although we observed a reduction in both of these biomarkers after body mass loss, their levels before surgery were better correlated with the relative amounts of saturated and unsaturated fats consumed than to the body mass itself.

In summary, this study evaluated the role of dietary composition in severe obesity. Even with a small number of patients, a strong correlation was found with two widely used markers of systemic inflammation, which reinforces the usefulness of these markers for population screening. Although we tested many other factors that could impact on inflammation, only dietary factors were significantly correlated, strengthening the role of diet as the main environmental cue contributing to obesity-linked subclinical inflammation.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Sao Paulo. The Laboratory of Cell Signaling belongs to the Instituto Nacional de

Ciência e Tecnologia – Obesidade e Diabetes. The authors have no conflict of interest to declare.

References

- 1 Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol* 2011;29:415-45.
- 2 Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol* 2011;11:85-97.
- 3 Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol* 2010;72:219-46.
- 4 Billings LK, Florez JC. The genetics of type 2 diabetes: what have we learned from GWAS? *Ann N Y Acad Sci* 2010;1212:59-77.
- 5 Lyssenko V, Groop L. Genome-wide association study for type 2 diabetes: clinical applications. *Curr Opin Lipidol* 2009;20:87-91.
- 6 Jacobs DR, Jr. Fast food and sedentary lifestyle: a combination that leads to obesity. *Am J Clin Nutr* 2006;83:189-90.
- 7 Riccardi G, Giacco R, Rivellese AA. Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome. *Clin Nutr* 2004;23:447-56.
- 8 Johnson L, Mander AP, Jones LR, Emmett PM, Jebb SA. Energy-dense, low-fiber, high-fat dietary pattern is associated with increased fatness in childhood. *Am J Clin Nutr* 2008;87:846-54.
- 9 Rivellese AA, Maffettone A, Vessby B, et al. Effects of dietary saturated, monounsaturated and n-3 fatty acids on fasting lipoproteins, LDL size and post-prandial lipid metabolism in healthy subjects. *Atherosclerosis* 2003;167:149-58.
- 10 Vessby B, Uusitupa M, Hermansen K, et al. Substituting dietary saturated for monounsaturated fat impairs insulin sensitivity in healthy men and women: The KANWU Study. *Diabetologia* 2001;44:312-9.
- 11 Kien CL, Bunn JY, Ugrasbul F. Increasing dietary palmitic acid decreases fat oxidation and daily energy expenditure. *Am J Clin Nutr* 2005;82:320-6.
- 12 Buettner R, Scholmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring)* 2007;15:798-808.
- 13 Fung TT, Rimm EB, Spiegelman D, et al. Association between dietary patterns and plasma biomarkers of obesity and cardiovascular disease risk. *Am J Clin Nutr* 2001;73:61-7.
- 14 King DE, Egan BM, Geesey ME. Relation of dietary fat and fiber to elevation of C-reactive protein. *Am J Cardiol* 2003;92:1335-9.
- 15 Lopez-Garcia E, Schulze MB, Fung TT, et al. Major dietary patterns are related to plasma concentrations of markers of inflammation and endothelial dysfunction. *Am J Clin Nutr* 2004;80:1029-35.

- 16 van Dijk SJ, Feskens EJ, Bos MB, et al. A saturated fatty acid-rich diet induces an obesity-linked proinflammatory gene expression profile in adipose tissue of subjects at risk of metabolic syndrome. *Am J Clin Nutr* 2009;90:1656-64.
- 17 Robertson C, Conway R, Dennis B, Yarnell J, Stamler J, Elliott P. Attainment of precision in implementation of 24 h dietary recalls: INTERMAP UK. *Br J Nutr* 2005;94:588-94.
- 18 Poulsen P, Kyvik KO, Vaag A, Beck-Nielsen H. Heritability of type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and abnormal glucose tolerance--a population-based twin study. *Diabetologia* 1999;42:139-45.
- 19 Milanski M, Degasperi G, Coope A, et al. Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *J Neurosci* 2009;29:359-70.
- 20 Tsukumo DM, Carvalho-Filho MA, Carvalheira JB, et al. Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2007;56:1986-98.
- 21 Oh DY, Talukdar S, Bae EJ, et al. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell* 2010;142:687-98.
- 22 Pirro M, Schillaci G, Savarese G, et al. Attenuation of inflammation with short-term dietary intervention is associated with a reduction of arterial stiffness in subjects with hypercholesterolaemia. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2004;11:497-502.
- 23 Lichtenstein AH, Erkkila AT, Lamarche B, Schwab US, Jalbert SM, Ausman LM. Influence of hydrogenated fat and butter on CVD risk factors: remnant-like particles, glucose and insulin, blood pressure and C-reactive protein. *Atherosclerosis* 2003;171:97-107.
- 24 Esposito K, Marfella R, Ciotola M, et al. Effect of a mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome: a randomized trial. *JAMA* 2004;292:1440-6.
- 25 Rallidis LS, Paschos G, Liakos GK, Velissaridou AH, Anastasiadis G, Zampelas A. Dietary alpha-linolenic acid decreases C-reactive protein, serum amyloid A and interleukin-6 in dyslipidaemic patients. *Atherosclerosis* 2003;167:237-42.
- 26 Bemelmans WJ, Lefrandt JD, Feskens EJ, et al. Increased alpha-linolenic acid intake lowers C-reactive protein, but has no effect on markers of atherosclerosis. *Eur J Clin Nutr* 2004;58:1083-9.
- 27 Bloomer RJ, Larson DE, Fisher-Wellman KH, Galpin AJ, Schilling BK. Effect of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid on resting and exercise-induced inflammatory and oxidative stress biomarkers: a randomized, placebo controlled, cross-over study. *Lipids Health Dis* 2009;8:36.
- 28 Kelley DS, Siegel D, Fedor DM, Adkins Y, Mackey BE. DHA supplementation decreases serum C-reactive protein and other markers of inflammation in hypertriglyceridemic men. *J Nutr* 2009;139:495-501.
- 29 Skulas-Ray AC, Kris-Etherton PM, Harris WS, Vanden Heuvel JP, Wagner PR, West SG. Dose-response effects of omega-3 fatty acids on triglycerides,

- inflammation, and endothelial function in healthy persons with moderate hypertriglyceridemia. *Am J Clin Nutr* 2011;93:243-52.
- 30 Wong CY, Yiu KH, Li SW, et al. Fish-oil supplement has neutral effects on vascular and metabolic function but improves renal function in patients with Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med* 2010;27:54-60.
- 31 Damsgaard CT, Frokiaer H, Andersen AD, Lauritzen L. Fish oil in combination with high or low intakes of linoleic acid lowers plasma triacylglycerols but does not affect other cardiovascular risk markers in healthy men. *J Nutr* 2008;138:1061-6.
- 32 Plat J, Jellema A, Ramakers J, Mensink RP. Weight loss, but not fish oil consumption, improves fasting and postprandial serum lipids, markers of endothelial function, and inflammatory signatures in moderately obese men. *J Nutr* 2007;137:2635-40.
- 33 Vega-Lopez S, Kaul N, Devaraj S, Cai RY, German B, Jialal I. Supplementation with omega3 polyunsaturated fatty acids and all-rac alpha-tocopherol alone and in combination failed to exert an anti-inflammatory effect in human volunteers. *Metabolism* 2004;53:236-40.
- 34 Geelen A, Brouwer IA, Schouten EG, Klufft C, Katan MB, Zock PL. Intake of n-3 fatty acids from fish does not lower serum concentrations of C-reactive protein in healthy subjects. *Eur J Clin Nutr* 2004;58:1440-2.
- 35 Leff RD, Akre SP. Obesity and the erythrocyte sedimentation rate. *Ann Intern Med* 1986;105:143.
- 36 Visser M, Bouter LM, McQuillan GM, Wener MH, Harris TB. Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. *JAMA* 1999;282:2131-5.
- 37 Ford ES. Body mass index, diabetes, and C-reactive protein among U.S. adults. *Diabetes Care* 1999;22:1971-7.
- 38 Lopez-Bermejo A, Hernandez-Aguado I, Vera IJ, et al. Sex-specific, independent associations of insulin resistance with erythrocyte sedimentation rate in apparently healthy subjects. *Thromb Haemost* 2007;97:240-4.
- 39 Danesh J, Collins R, Appleby P, Peto R. Association of fibrinogen, C-reactive protein, albumin, or leukocyte count with coronary heart disease: meta-analyses of prospective studies. *JAMA* 1998;279:1477-82.
- 40 Ridker PM, Buring JE, Cook NR, Rifai N. C-reactive protein, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular events: an 8-year follow-up of 14 719 initially healthy American women. *Circulation* 2003;107:391-7.
- 41 Tzotzas T, Evangelou P, Kiortsis DN. Obesity, weight loss and conditional cardiovascular risk factors. *Obes Rev* 2011;12:e282-9.
- 42 Madsen EL, Rissanen A, Bruun JM, et al. Weight loss larger than 10% is needed for general improvement of levels of circulating adiponectin and markers of inflammation in obese subjects: a 3-year weight loss study. *Eur J Endocrinol* 2008;158:179-87.

Table 1. Comparison between anthropometric and inflammatory parameters.
*p<0.05.

Parameter 1	Parameter 2	R	p
Body mass index vs.	Blood leucocyte	0.17	0.59
	ESR	0.35	0.27
	CRP	0.43	0.15
	TNF-a	0.21	0.48
	IL-1b	0.002	0.99
	IL-6	-0.29	0.33
	IL-10	0.32	0.29
Waist circumference vs.	Blood leucocyte	-0.15	0.63
	ESR	0.26	0.41
	CRP	0.28	0.36
	TNF-a	0.43	0.14
	IL-1b	0.26	0.40
	IL-6	0.46	0.11
	IL-10	0.46	0.12
Fasting glucose vs.	Blood leucocyte	-0.003	0.99
	ESR	0.003	0.99
	CRP	0.05	0.87
	TNF-a	-0.37	0.21
	IL-1b	0.02	0.94
	IL-6	0.004	0.99
	IL-10	-0.51	0.07
Insulin vs.	Blood leucocyte	0.20	0.51
	ESR	-0.25	0.44
	CRP	-0.29	0.33
	TNF-a	0.29	0.34
	IL-1b	0.36	0.23
	IL-6	0.23	0.45
	IL-10	-0.09	0.76
HOMA IR vs.	Blood leucocyte	0.19	0.52
	ESR	-0.21	0.51
	CRP	-0.26	0.39
	TNF-a	0.23	0.46
	IL-1b	0.36	0.23
	IL-6	0.21	0.50
	IL-10	-0.14	0.64
Leptin vs.	Blood leucocyte	0.27	0.37
	ESR	-0.09	0.78
	CRP	-0.30	0.31
	TNF-a	0.004	0.99
	IL-1b	-0.13	0.68
	IL-6	-0.18	0.56
	IL-10	-0.26	0.40
Adiponectin vs.	Blood leucocyte	-0.73*	0.005
	ESR	-0.32	0.31
	CRP	-0.13	0.68
	TNF-a	-0.24	0.42
	IL-1b	-0.08	0.80
	IL-6	0.15	0.63
	IL-10	-0.38	0.20

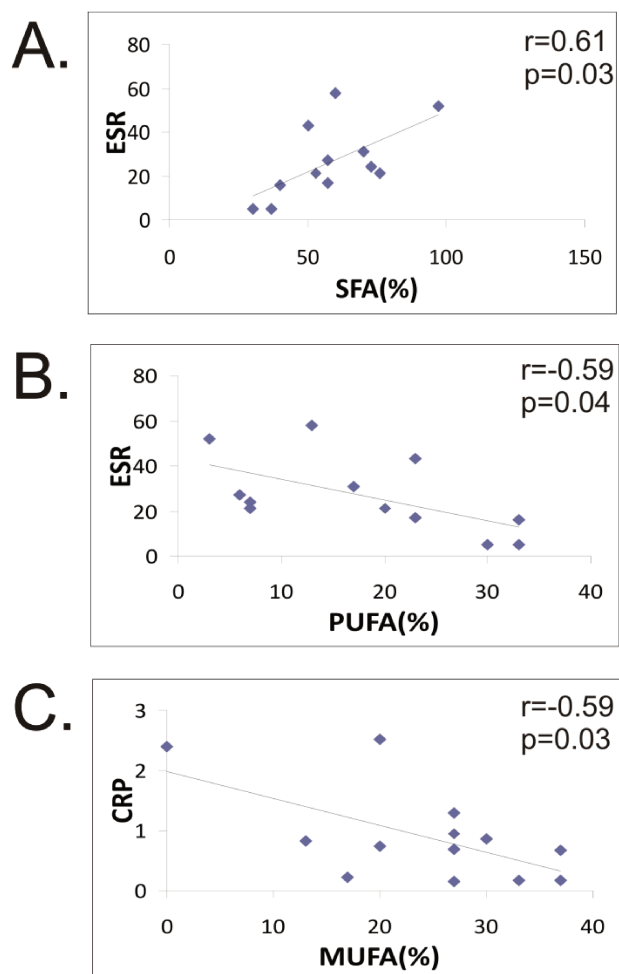
Table 2. Comparison between fat intake and inflammatory parameters.

Parameter 1	Parameter 2	R	p
Amount fat/day (g) vs.	Blood leucocyte	0.32	0.28
	ESR	0.02	0.94
	CRP	0.03	0.93
	TNF-a	-0.05	0.88
	IL-1b	0.15	0.63
	IL-6	-0.37	0.21
	IL-10	-0.16	0.60
Amount fat/day (%kCal) vs.	Blood leucocyte	0.13	0.68
	ESR	0.08	0.81
	CRP	0.43	0.15
	TNF-a	-0.18	0.55
	IL-1b	0.24	0.42
	IL-6	-0.15	0.62
	IL-10	-0.24	0.43

Table 3. Comparison between type of fat consumed and inflammatory parameters.
*p<0.05.

Parameter 1	Parameter 2	R	p
Saturated fat (%) vs.	Blood leucocyte	-0.15	0.62
	ESR	0.61*	0.03
	CRP	0.51	0.07
	TNF-a	0.05	0.88
	IL-1b	0.43	0.14
	IL-6	0.33	0.27
	IL-10	-0.03	0.93
Monounsaturated fat (%) vs.	Blood leucocyte	0.29	0.34
	ESR	-0.48	0.11
	CRP	-0.59*	0.03
	TNF-a	-0.17	0.58
	IL-1b	-0.45	0.12
	IL-6	-0.27	0.37
	IL-10	-0.07	0.82
Polyunsaturated fat (%) vs.	Blood leucocyte	-0.01	0.97
	ESR	-0.59*	0.04
	CRP	-0.31	0.30
	TNF-a	0.08	0.80
	IL-1b	-0.31	0.30
	IL-6	-0.31	0.31
	IL-10	0.11	0.72

Figure 1. Graphic representation of the correlations between erythrocyte sedimentation rate (ESR) and relative intake of saturated fat (SAT) (A), ESR and relative intake of polyunsaturated fat (PUFA) (B) and c-reactive protein and relative intake of monounsaturated fat (C) in all patients before surgery.



APÊNDICE 4

Cerebrospinal fluid xenin levels during body mass reduction – No evidence for obesity-associated defective transport across the blood-brain barrier

Simone van de Sande-Lee¹, Adilson R. Cardoso², Célia R. Garlipp³, Eliton A. Chaim⁴, Jose C. Pareja⁴, Bruno Geloneze⁵, Licio A. Velloso¹

¹Laboratory of Cell Signaling, ²Department of Anesthesiology, ³Department of Clinical Pathology, ⁴Department of Surgery, and ⁵Laboratory of Investigation in Metabolism and Diabetes, University of Campinas, Brazil

Abbreviated title: Xenin in the cerebrospinal fluid

Key terms: leptin, hypothalamus, brain, diabetes, bariatric surgery

Corresponding Author: Licio A. Velloso, DCM – FCM, UNICAMP 13084-970, Campinas-SP, Brazil lavelloso.unicamp@gmail.com, Phone +55 19 35218022

Grants for this work were provided by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo

Authors declare no conflicts of interest

Abstract

Context: Recent studies have shown that xenin can act in the hypothalamus reducing food intake through a leptin-, and melanocortin system-independent mechanism.

Objective: Evaluate the impact of body mass reduction on the blood and cerebrospinal fluid levels of xenin. **Design and setting:** Thirteen obese patients (11 women) selected for roux-in-Y gastric bypass surgery were evaluated before and approximately eight months after surgery. Xenin was determined in serum and cerebrospinal fluid by radioimmunoassay. **Results:** As compared with lean subjects, obese patients have increased blood levels of xenin, which reduce after surgery. There are significant correlations between blood xenin and blood leptin and insulin levels. Cerebrospinal fluid concentration of xenin is approximately 10-fold lower than blood levels, and is significantly higher in obese, as compared with lean subjects, returning to normal levels after body mass reduction. There is a significant linear correlation between cerebrospinal fluid and blood levels of xenin. **Conclusion:** Xenin is present in the human cerebrospinal fluid in a concentration approximately 10-fold lower than the blood. Both, blood and cerebrospinal fluid xenin, are correlated with blood levels of important markers of adiposity, leptin and insulin. The levels of cerebrospinal fluid xenin are linearly correlated with blood xenin, independently of patient body mass, suggesting that its transport across the blood brain barrier is not saturated in the concentration range detected in this study.

Introduction

The neurotensin-like hormone, xenin, is produced by the gastric mucosa, and secreted predominantly after meals (1). Initial reports provide evidence for a role of xenin in the control of exocrine pancreatic function (1). However, recent studies have shown that xenin produces a potent anorexigenic effect (2–5) by acting in the hypothalamus independently of leptin and of the AgRP/melanocortin system (4).

Leptin provides the most robust adipostatic signal to the hypothalamus (6). It acts predominantly in the arcuate nucleus inhibiting NPY/AgRP, while stimulating POMC neurons (6). Studies performed right after leptin identification frustrated the initial expectations regarding its potential therapeutic use in obesity (7,8). In fact, obese patients present a defective transport of leptin through the blood-brain barrier (BBB) (9) and animal models of obesity are leptin resistant due to an impaired signal transduction (10). Thus, it is expected that mechanisms capable of bypassing the leptin signal in the hypothalamus may be useful for treating obesity.

As xenin exerts a leptin-independent, central nervous system (CNS) – dependent anorexigenic action, we decided to evaluate the blood and cerebrospinal fluid (CSF) levels of this hormone in massively-obese patients before and after body mass reduction provided by bariatric surgery. Our results suggest that, in contrast to leptin, xenin transport across the BBB is preserved in obesity.

Patients and methods

Patients (13, 11 females) were selected at the Clinics Hospital of the University of Campinas. Bariatric surgery was recommended according to the National Institutes of

Health criteria (11). Patients from 18 to 60 years of age were considered eligible for the study. Exclusion criteria were inflammatory or infectious diseases, diabetes mellitus, neurologic or psychiatric illnesses, alcohol consumption of more than 30/15 g per day for men and women, respectively, smoking, and use of psychotropic or anti-inflammatory drugs. Patients were evaluated before and approximately eight months after a Roux-in-Y gastric bypass, performed as previously described (12). Anthropometric evaluation was performed at every visit. Lean subjects were selected among students of the University of Campinas, while cerebrospinal fluid (CSF) samples were obtained from lean subjects undergoing routine examinations, who revealed no illness after completion of the investigation.

Blood and CSF samples were collected after an overnight fast on the day of the surgery and on the final visit, approximately 8 months later. Insulin, leptin, and adiponectin were evaluated in sera using ELISA kits from Millipore (Billerica, MA, USA). Xenin levels in both serum and CSF were determined using a RIA kit from Phoenix Pharmaceuticals (Burlingame, CA, USA). CSF and blood biochemical parameters were measured using automated methods from Beckman Coulter (Brea, CA, USA) and F. Hoffmann-La Roche (Basel, Switzerland).

The study was approved by the University of Campinas Ethics Committee, and written informed consent was obtained from all patients. A two-tailed, paired *t* test was used to evaluate changes from baseline conditions to those at 8 months. Xenin data in blood and CSF were analyzed using the Pearson's correlation coefficient. A $p < 0.05$ was accepted as significant.

Results

Approximately eight months after surgery, significant reductions in body mass index and waist/hip ratio were accompanied by the reductions of the systemic markers of inflammation, C-reactive protein and erythrocyte sedimentation rate (Table 1).

Obese patients had a significantly higher mean serum xenin level than lean subjects and, after body mass reduction, the levels were normalized (Fig. 1A); however, there were no significant correlations between these parameters. Nevertheless, significant correlations were observed between serum xenin and serum leptin and serum insulin, two important markers of adiposity (Table 2). No correlations were detected between serum xenin and serum adiponectin, serum IL10 and serum IL6 (Table 2).

Similarly to serum xenin, in the CSF, the levels of the hormone, which are approximately 10-fold lower than serum levels, were significantly higher in obese subjects before surgery, returning to levels similar to those of lean subjects after body mass reduction (Fig. 1B). Although CSF xenin was not correlated with BMI, it correlated significantly with other markers of adiposity, leptin (Fig. 1C) and insulin (Fig. 1D), and inversely correlated with adiponectin (Fig. 1E). Interestingly, there was a significant linear correlation between serum and CSF xenin (Fig. 1F). Finally, as in serum, CSF xenin was not correlated with CSF levels of the cytokines IL10 and IL6 (Table 3).

Discussion

A number of peptides are produced by the gastrointestinal tract in response to the presence or, eventually, the absence of food (13). Most of these peptides are known to produce modulatory effects on food intake, and by several means, have been tested for

their potential use in obesity. Unfortunately, on most occasions, pharmacological or genetic manipulation of these systems result only in immediate changes in food intake, producing no long-term changes in body adiposity (14). One exception is GLP1; both in experimental models and humans, the increased activity of this peptide results in some change in body mass. However, in patients using drugs that either reduce the activity of the GLP1 degrading enzyme, DPP-IV, or mimic the peptide's action, the resulting body mass variation is, at most, 5% (15).

In general terms, by far the most robust result in body mass is obtained by modulation of the leptin signaling system (6). Increases of more than 100% in adiposity are achieved in both humans and animals lacking leptin or a functional leptin receptor (16). Most of the adipostatic effect of leptin in the hypothalamus depends on a functional melanocortin system (14,16). This is supported by the fact that the most prevalent human monogenic defects leading to massive obesity are the mutations of the MC4R, one of the receptors for POMC (16). Since, in most cases of obesity, there is a resistance to the action of leptin, which results in insufficient activation of the melanocortin system, it is suspected that only approaches bypassing the leptin/melanocortin system will be efficient to treat obesity.

The recent demonstration of the leptin/melanocortin bypassing properties of xenin boosted the interest in this peptide as a candidate approach to deal with obesity (4). One important issue when dealing with CNS acting peptides is their capacity to cross the BBB. As for leptin, defective transport across the BBB is regarded as one of the components of the resistance to this hormone in obesity (9). Thus, we decided to evaluate the capacity of xenin to reach the CNS. For this, we evaluated a group of 13 massively-obese patients undergoing bariatric surgery. Unlike leptin, xenin transport across the BBB seems to be preserved in obesity, suggesting that this peptide enters the brain either by a non-saturable transport system, or, the threshold for saturation is higher than the blood

concentration achieved in obesity. Recent studies have demonstrated that both central and peripheral administration of xenin to rodents (2,4,5) or chicks (3), results in reduction of food intake in a dose-dependent manner. Peripheral administration of xenin stimulates c-Fos expression in the hypothalamus (3,4) and nucleus of the solitary tract of the brainstem (17), indicating that the peripherally-produced hormone exerts its effects, at least in part, by a direct action on the central nervous system. The observation of a similar anorectic effect after xenin administration in animal models of obesity, including *ob/ob* and *agouti* mice (4), suggested that xenin can alter feeding independently of leptin and the melanocortin signaling pathway, and that obesity in these models is not associated with resistance to xenin actions, raising the interest in xenin as a therapeutic option for obesity. However, one study demonstrated that chronic peripheral administration of xenin to mice had no significant effect on daily food intake or body weight (5). The authors pointed out that this may be due to the relatively low doses used, and further studies are required to address the therapeutic potential of xenin.

Our results show that xenin levels are significantly correlated with systemic levels of known markers of adiposity, but not with BMI. The possible reasons for this are the relatively small size of the sample, or the fact that BMI does not reflect body adiposity accurately in all subjects.

Fasting xenin levels, both in serum and CSF, were significantly higher in obese subjects and decreased after surgery, reaching levels similar to those of lean subjects. Conversely, fasting serum levels of other satiety factors, including peptide YY (PYY) and GLP-1, are reduced in obesity and increase after surgery, in line with their action in promoting satiety (18–20). The reasons for this discrepancy are unclear. These studies have also shown that postprandial release of these peptides is lower in obese than in lean subjects (18–20).

We did not evaluate xenin response after food ingestion, and it is possible that this response is blunted in obesity, despite higher fasting levels.

In the present study, we have demonstrated for the first time the presence of xenin in the CSF of humans, and that fasting serum and CSF levels of this peptide are increased in obesity and decrease after bariatric surgery-induced body mass loss. Importantly, xenin transport across the BBB seems preserved in obesity. Although xenin properties point to an interesting option for therapeutic purposes, its precise role in obesity and related diseases remains to be determined.

References

1. Feurle GE, Hamscher G, Kusiek R, Meyer HE, Metzger JW. 1992 Identification of xenin, a xenopsin-related peptide, in the human gastric mucosa and its effect on exocrine pancreatic secretion. *J. Biol. Chem.* 267:22305–9.
2. Alexiou C, Zimmermann JP, Schick RR, Schusdziarra V. 1998 Xenin--a novel suppressor of food intake in rats. *Brain Res.* 800:294–9.
3. Cline MA, Nandar W, Rogers JO. 2007 Xenin reduces feed intake by activating the ventromedial hypothalamus and influences gastrointestinal transit rate in chicks. *Behav. Brain Res.* 179:28–32.
4. Leckstrom A, Kim ER, Wong D, Mizuno TM. 2009 Xenin, a gastrointestinal peptide, regulates feeding independent of the melanocortin signaling pathway. *Diabetes.* 58:87–94.
5. Cooke JH, Patterson M, Patel SR, Smith KL, Ghatei MA, Bloom SR, et al. 2009 Peripheral and central administration of xenin and neurotensin suppress food intake in rodents. *Obesity (Silver Spring).* 17:1135–43.
6. Velloso LA, Schwartz MW. 2011 Altered hypothalamic function in diet-induced obesity. *Int J Obesity*, in press
7. Heymsfield SB, Greenberg AS, Fujioka K, Dixon RM, Kushner R, Hunt T, et al. 1999 Recombinant leptin for weight loss in obese and lean adults: a randomized, controlled, dose-escalation trial. *JAMA.* 282:1568–75.

8. Hukshorn CJ, Saris WH, Westerterp-Plantenga MS, Farid AR, Smith FJ, 2000 Campfield LA. Weekly subcutaneous pegylated recombinant native human leptin (PEG-OB) administration in obese men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85:4003–9.
9. Caro JF, Kolaczynski JW, Nyce MR, Ohannesian JP, Opentanova I, Goldman WH, et al. 1996 Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet.* 348:159–61.
10. El-Haschimi K, Pierroz DD, Hileman SM, Bjørbaek C, Flier JS. 2000 Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. *J. Clin. Invest.* 105:1827–32.
11. National Institutes of Health. 1992 Gastrointestinal surgery for severe obesity: National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement. *Am. J. Clin. Nutr.* 55(2 Suppl):615S-619S.
12. de Carvalho CP, Marin DM, de Souza AL, Pareja JC, Chaim EA, de Barros Mazon S, et al. 2009 GLP-1 and adiponectin: effect of weight loss after dietary restriction and gastric bypass in morbidly obese patients with normal and abnormal glucose metabolism. *Obes Surg.* 19:313–20.
13. Field BCT, Chaudhri OB, Bloom SR. 2010 Bowels control brain: gut hormones and obesity. *Nat Rev Endocrinol.* 6:444–53.
14. Woods SC, D'Alessio DA. 2008 Central control of body weight and appetite. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93(11 Suppl 1):S37–50.
15. Neumiller JJ. 2011 Clinical pharmacology of incretin therapies for type 2 diabetes mellitus: implications for treatment. *Clin Ther.* 33:528–76.
16. Coll AP, Farooqi IS, Challis BG, Yeo GSH, O'Rahilly S. 2004 Proopiomelanocortin and energy balance: insights from human and murine genetics. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89:2557–62.
17. Kim ER, Mizuno TM. 2010 Xenin delays gastric emptying rate and activates the brainstem in mice. *Neurosci. Lett.* 481:59–63.
18. Batterham RL, Cohen MA, Ellis SM, Le Roux CW, Withers DJ, Frost GS, et al 2003. Inhibition of food intake in obese subjects by peptide YY3-36. *N. Engl. J. Med.* 349:941–8.
19. Adam TCM, Westerterp-Plantenga MS. 2005 Glucagon-like peptide-1 release and satiety after a nutrient challenge in normal-weight and obese subjects. *Br. J. Nutr.* 93:845–51.
20. le Roux CW, Aylwin SJB, Batterham RL, Borg CM, Coyle F, Prasad V, et al. 2006 Gut hormone profiles following bariatric surgery favor an anorectic state, facilitate weight loss, and improve metabolic parameters. *Ann. Surg.* 243:108–14.

Table 1. General parameters of the subjects.

	Obese BS	Obese AS	Lean
<i>Gender (F/M)</i>	11/2	11/2	6/2
<i>Age (y)</i>	34±10	35±10	29±4
<i>BMI (kg/m²)</i>	39±2	28±3*	21±2*
<i>Waist/Hip</i>	0.86±0.18	0.83±0.12*	0.79±0.09*
<i>CRP (mg/dL)</i>	0.91±0.70	0.17±0.02*	0.13±0.02*
<i>ESR (mm/1h)</i>	26±16	16±9*	14±12*

Obese BS, obese before surgery; Obese AS, obese after surgery; F, female; M, male; y, years; BMI, body mass index; CRP, C-reactive protein; ESR, erythrocyte sedimentation rate. *p≤0.05 vs. obese BS.

Table 2. Correlation of serum xenin with BMI and serum hormones and cytokines.

	<i>r</i>	<i>p</i>
BMI (Kg/m²) x Serum Xenin (pg/mL)		
<i>Lean</i>	-0.15	0.71
<i>Obese BS</i>	0.29	0.32
<i>Obese AS</i>	0.47	0.11
<i>Lean+Obese BS+Obese AS</i>	0.12	0.47
Serum Xenin (pg/mL) x Serum Leptin (ng/mL)		
<i>Lean</i>	0.25	0.55
<i>Obese BS</i>	0.13	0.65
<i>Obese AS</i>	0.31	0.17
<i>Lean+Obese BS+Obese AS</i>	0.41	0.05 *
Serum Xenin (pg/mL) x Serum Insulin (pmol/L)		
<i>Lean</i>	0.71	0.04*
<i>Obese BS</i>	0.49	0.08
<i>Obese AS</i>	0.09	0.76
<i>Lean+Obese BS+Obese AS</i>	0.43	0.01*
Serum Xenin (pg/mL) x Serum Adiponectin (μg/mL)		
<i>Lean</i>	-0.18	0.66
<i>Obese BS</i>	-0.03	0.91
<i>Obese AS</i>	0.09	0.76
<i>Lean+Obese BS+Obese AS</i>	-0.18	0.29
Serum Xenin (pg/mL) x Serum IL10 (pg/mL)		
<i>Lean</i>	-0.05	0.88
<i>Obese BS</i>	0.09	0.75
<i>Obese AS</i>	-0.18	0.54
<i>Lean+Obese BS+Obese AS</i>	0.01	0.93
Serum Xenin (pg/mL) x Serum IL6 (pg/mL)		
<i>Lean</i>	-0.08	0.83
<i>Obese BS</i>	-0.20	0.49
<i>Obese AS</i>	0.05	0.84
<i>Lean+Obese BS+Obese AS</i>	0.01	0.98

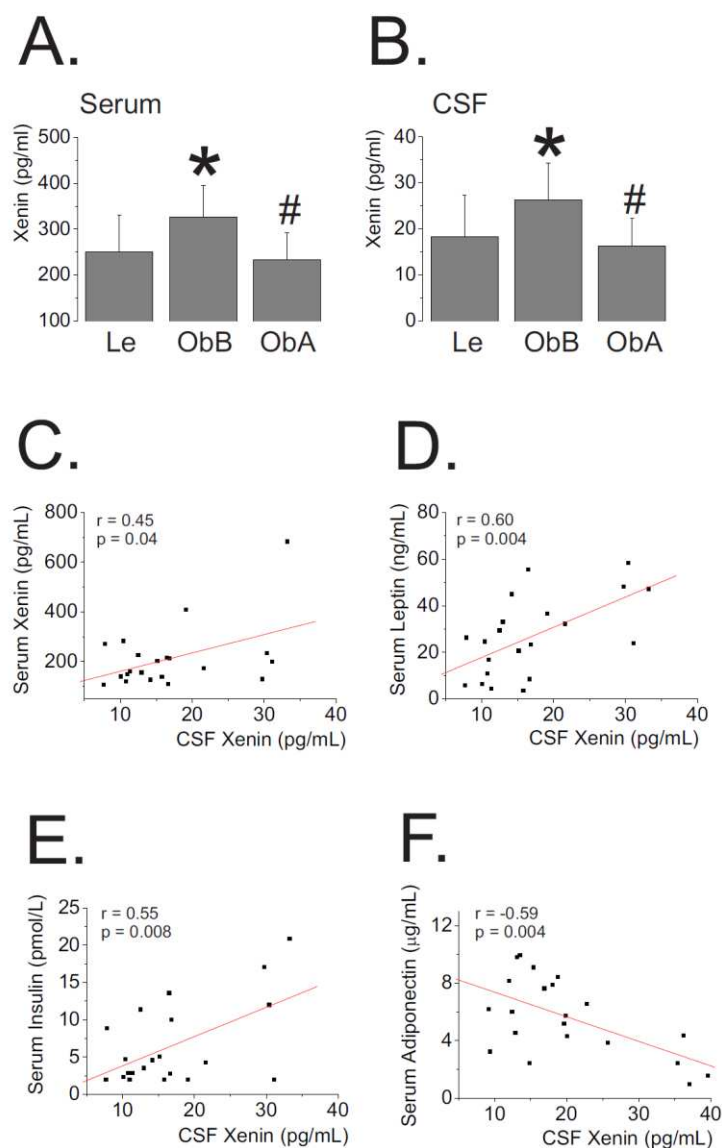
BMI, body mass index; Obese BS, obese before surgery; Obese AS, obese after surgery; IL10, interleukin-10; IL6, interleukin-6. *p≤0.05.

Table 3. Correlation of CSF xenin with BMI and CSF cytokines.

	<i>r</i>	<i>p</i>
BMI (Kg/m²) x CSF Xenin (pg/mL)		
<i>Lean</i>	0.03	0.95
<i>Obese BS</i>	0.34	0.32
<i>Obese AS</i>	0.38	0.24
<i>Lean+Obese BS+Obese AS</i>	0.01	0.93
CSF Xenin (pg/mL) x CSF IL10 (pg/mL)		
<i>Lean</i>	-0.01	0.97
<i>Obese BS</i>	-0.33	0.33
<i>Obese AS</i>	-0.18	0.58
<i>Lean+Obese BS+Obese AS</i>	0.01	0.93
CSF Xenin (pg/mL) x CSF IL6 (pg/mL)		
<i>Lean</i>	0.53	0.35
<i>Obese BS</i>	0.49	0.14
<i>Obese AS</i>	0.30	0.36
<i>Lean+Obese BS+Obese AS</i>	0.20	0.31

BMI, body mass index; CSF, cerebrospinal fluid; Obese BS, obese before surgery; Obese AS, obese after surgery; IL10, interleukin-10; IL6, interleukin-6.

Figure 1. The mean concentrations of xenin in the serum and cerebrospinal fluid (CSF) of lean (Le), obese patients before surgery (ObB) and obese patients after surgery (ObA), are presented in A and B, respectively. The graphic representations of the correlations between serum leptin (C), insulin (D) and adiponectin (E) vs. CSF xenin are depicted. The graphic representation of the correlation between serum and CSF xenin is shown in F. In all figures, lean controls = 8; obese patients = 13; in A and B, * $p < 0.05$ vs. Le, # $p < 0.05$ vs. ObB.



ANEXO 1

December 12, 2011

Christine N. Taylor
Associate
Rights and Permissions
Publications
703-549-1500 ext. 1635 - Tel
703-683-2890 - Fax
permissions@diabetes.org

Permission Request Number: CT091511-FSC

Dear Simone Van de Sande Lee:

We are pleased to grant permission to you to reproduce the following article:

- ✓ **Partial Reversibility of Hypothalamic Dysfunction and Changes in Brain Activity After Body Mass Reduction in Obese Subjects.**

From: **Diabetes, Vol. 60, 2011; 1699-1704**

For use in: **Thesis**

The permission granted is for a one-time use only for English language as described in this agreement, and is subject to the following conditions:

1. Permission is granted for use in the following formats – **Print & Electronic.**
2. Each copy containing our material that you reproduce or distribute must bear the following copyright notice:

**“Copyright 2011 American Diabetes Association
From Diabetes, Vol. 60, 2011; 1699-1704
Reprinted with permission from *The American Diabetes Association.*”**
1. The article(s) will be reprinted exactly as it was originally published.
2. Permission is **non-exclusive** and the American Diabetes Association reserves the right to grant the same permission to others.
3. This permission agreement is valid for a period of **twelve (12)** months beginning from the date of this letter.

Sincerely,



Christine N. Taylor

Unless specifically noted here, the permission granted does not include the use of the American Diabetes Association logo or the cover logo of the journal(s). Permission to reproduce material does not permit the above-named entity or the company sponsoring the resulting product to act as an agent of the American Diabetes Association or of the journals(s).

National Office
1701 North Beauregard Street
Alexandria, VA 22311
Tel: 703-549-1500

Diabetes Information
call 1-800-DIABETES (1-800-342-2383)
online www.diabetes.org
The Association gratefully accepts gifts through your will.

**The Mission of the American
Diabetes Association is to prevent and
cure diabetes and to improve the lives
of all people affected by diabetes.**