PRISCILA SALA KOBAL

**Alterações na expressão gênica do tecido gástrico e
intestinal de pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 2
submetidos à derivação gástrica em Y de Roux**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de: Ciências em Gastroenterologia

Orientador: Prof. Dan Linetzky Waitzberg

Coorientador: Prof. Daniel Giannella Neto

**São Paulo
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Kobal, Priscila Sala

Alterações na expressão gênica do tecido gástrico e intestinal de pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 2 submetidos à derivação gástrica em Y de Roux / Priscila Sala Kobal. -- São Paulo, 2017.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências em Gastroenterologia.

Orientador: Dan Linetzky Waitzberg.

Coorientador: Daniel Gianella Neto.

Descritores: 1.Cirurgia bariátrica 2.Derivação gástrica 3.Diabetes mellitus tipo 2 4.Enteroscopia de duplo balão 5.Trato gastrointestinal 6.Expressão gênica

USP/FM/DBD-022/17

Dedico o conteúdo desta pesquisa à **Ciência**, que se traduz em esperança àqueles que sofrem de diversas doenças; principalmente o diabetes mellitus tipo 2, que atua como protagonista “do novo mal do século”.

Aos meus pais, **Valter e Elisabete**, que muitas vezes se doaram e renunciaram aos seus sonhos, para que eu pudesse realizar os meus, por terem me ensinado que nada é fácil, mas tudo é possível, desde que haja força de vontade e dedicação. Tudo que consegui só foi possível graças ao amor, apoio e dedicação que vocês sempre tiveram por mim.

Ao meu irmão **Eder**, pelo amor e carinho, por estar sempre torcendo pelas minhas conquistas.

Ao meu marido **André Galleoti Kobal**, meu porto seguro e melhor amigo, obrigada por estar sempre ao meu lado, por sempre me incentivar nos momentos de incertezas, por me fazer rir quando na verdade eu queria chorar, por acreditar em mim. Obrigada pela paciência e compreensão com minha ausência, em alguns momentos durante essa jornada. Esse doutorado só foi possível porque tenho você ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador **Dan Linetzky Waitzberg**, pela oportunidade de realizar este trabalho ao lado de alguém que transborda sabedoria; meu respeito e admiração pela sua serenidade, competência e acima de tudo pelo seu dom no ensino da Ciência. Tenho muito orgulho de citá-lo como um dos responsáveis pela minha formação profissional. Obrigada por me ensinar que é muito mais fácil multiplicar quando sabemos dividir. Minha eterna gratidão por acreditar em mim e pela oportunidade de realizar um trabalho tão grandioso como este dentro do temático. Muito obrigada!

Ao meu coorientador **Daniel Giannella Neto**, agradeço pela confiança, pelos ensinamentos, pela paciência e por ter me acolhido como aluna. Minha eterna admiração pelo modo de ensinar e gratidão por gastar tantas horas se dedicando ao meu crescimento profissional.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**), pelo apoio financeiro do temático (2011/09612-3) e pelas bolsas que me concederam (DD 2013/03246-0), BEPE (2014/07742-5) e bolsa pós-doutorado já aprovada (PD 2016/19170-1).

Às **pacientes** do estudo, que com generosidade aceitaram participar do protocolo e pesquisa, pelo exemplo de perseverança e fé. Minha eterna gratidão às pacientes pois sem elas, nada disso seria possível. Obrigada a cada uma pelo carinho e pela confiança.

À nutricionista **Maria Carolina Gonçalves Dias**, por ter me indicado para fazer pós-graduação com o Prof Dan. Foi através dela que tudo começou. Obrigada Carol!

Aos Professores **Dr Ivan Cecconello, Dr José Jukemura, Dr Augusto Carneiro D’Albuquerque**, que me acolheram no programa de pós-graduação. A todos funcionários administrativos da Disciplina de Cirurgia do Aparelho Digestivo do HC-FMUSP, em especial a **Vilma de Jesus Libério**, pela dedicação e gentileza.

Ao **Dr Eduardo Moura, Dr Paulo Sakai e Dr Ismael Guarda**, à toda equipe de endoscopia agradeço pela paciência, pela persistência, pela oportunidade, pelos ensinamentos. Obrigada por fazer esse estudo dar certo. Agradeço especialmente ao endoscopista **Dr Robson Ishida** pois com brilhantismo e competência realizou os exames de enteroscopia desse protocolo.

Ao **Dr Marco Aurélio Santo e a Priscila Caproni** que me ajudaram em todos os momentos. Muito obrigada Dr Marco Aurélio, pelo apoio constante, pela confiança e simpatia e por ter acreditado em mim.

Ao **Prof Steven Heymsfield** que me acolheu por três meses em Pennington Biomedical Research Center (EUA) e se dedicou em me auxiliar na interpretação dos dados.

À bióloga chefe do Metanutri **Raquel Torrinhas...** a quem me falta palavras para agradecer... por sempre me apoiar e por ter deixado suas férias de lado para me auxiliar na tese. Sem palavras. Muito obrigada Rá!

À **Cláudia Cristina Alves Pereira**, quem me ensinou a amar biologia molecular, me ensinou os primeiros passos da genética, a quem eu me espelhei, serei eternamente grata.

À **Natasha Mendonça Machado**, por realizar o protocolo com todo cuidado, dedicação e amor. Obrigada Ná!

À **Danielle Cristina Fonseca**, minha parceira de genética, a quem devo agradecer pela ajuda, por estar sempre ali até altas horas da noite comigo, validando genes, interpretando resultados e discutindo genética. Obrigada pelo companheirinho. Eu não poderia ter encontrado alguém melhor para estudar genética.

À **Giliane Belarmino** pela amizade aos longos desses anos, pelo apoio, pelo ombro amigo e por ter realizado as atividades do projeto com muita dedicação durante minha ausência. Muito obrigada por tudo Gi!

À **Daniele Yumi**, quem me ensinou bioinformática de genes, sou eternamente grata. Mesmo morando na Alemanha, manteve-se disponível o tempo todo para me ensinar.

Às enfermeiras **Janete, Francisca e Maria**, por sempre se disponibilizarem a realizar as coletas de sangue das pacientes.

À todos da equipe SURMetaGIT e do temático, **Camila Cardinelli, Karina Al Assal, Mariane Marques, Samira Barcelos, Amanda Barbosa, Beatriz de Azevedo, Dr Ismael Dale e Dra Angela Logullo**, muito obrigada pela parceria!

À equipe Metanutri, em especial para a **Graziela Ravacci, Priscila Garla, Alweyd Tesser e Francisco Balbino**, pela convivência diária e troca de experiências.

Não poderia deixar de agradecer à **Polenta**, minha labradora, por me fazer sentir extraordinária, por estar sempre ao meu lado e me mostrar que viver é muito mais do que ter um diploma, viver é fazer cada dia valer a pena!

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

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

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

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

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

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE GRÁFICOS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO.....	2
1.1 Diabetes mellitus tipo 2.....	2
1.2 Potencial contribuição do trato gastrointestinal na fisiopatologia do diabetes mellitus tipo 2	4
1.3 Derivação gástrica em Y de Roux e homeostase glicêmica	7
1.4 Estudo do perfil de expressão gênica global em diabetes mellitus tipo 2	14
1.5 Hipótese e justificativa do estudo	16
2 OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo primário	19
2.2 Objetivos secundários.....	19
3 MÉTODOS.....	21
3.1 Local de execução do trabalho.....	21
3.2 Aspectos éticos	21
3.3 Delineamento do protocolo do estudo.....	22
3.4 Casuística e critérios de seleção de pacientes	23
3.5 Procedimento cirúrgico.....	24
3.6 Critério de classificação de pacientes responsivos e não responsivos à remissão pós-operatória de DM2	25
3.7 Acompanhamento clínico ambulatorial	25
3.7.1 Avaliação bioquímica	26
3.7.2 Análise estatística dos dados clínicos e bioquímicos.....	27
3.8 Análises transcriptômicas do tecido gastrointestinal	28
3.8.1 Obtenção de biópsias gastrintestinais	29

3.8.2 Extração do RNA, quantificação e avaliação da sua integridade	32
3.9 Análise de expressão gênica global - <i>microarray</i>	34
3.9.1 Normalização dos dados, análise estatística e funcional	35
3.10 Validação dos genes diferencialmente expressos de interesse por RT-qPCR	37
3.11 Correlação de dados clínicos e bioquímicos com dados transcriptômicos	38
4 RESULTADOS	40
4.1 Características descritivas da amostra	40
4.2 Características clínicas dos grupos R e NR antes e após derivação gástrica em Y de Roux	40
4.3 Mudanças das variáveis bioquímicas associadas ao metabolismo de carboidratos, lipídeos e hormônios gastrintestinais em condições de jejum e perante teste de alimentação	45
4.4 Coleta de biópsias gastrintestinais, controle de qualidade das amostras e normalização de dados do <i>microarray</i>	54
4.4.1 Genes diferencialmente expressos (DEGs)	58
4.4.2 Efeito metabólico da derivação gástrica em Y de Roux na expressão de genes e suas correlações com marcadores de homeostase glicêmica	61
4.4.2.1 Duodeno	62
4.4.2.2 Jejunum	77
4.4.2.3 Íleo	93
4.4.2.4 Estômago remanescente (ECA) e estômago excluído (ECM)	103
4.4.3 Confirmação dos achados por RT-qPCR	115
5 DISCUSSÃO	119
5.1 Da contribuição científica	119
5.2 Do método	119
5.3 Dos resultados	123
5.4 Das limitações	133
6 CONCLUSÃO	138
7 ANEXOS	140
7.1 Anexo A – Aprovação do estudo pela Comissão de Ética para Análises de Projetos de Pesquisas do Hospital das Clínicas da FMUSP (CAPPesq).	140
7.2 Anexo B – Mudança de título e desmembramento do projeto temático pela CAPPesq.	141

7.3 Anexo C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).	143
7.4 Anexo D - Estudo piloto para determinar o número de biópsias necessárias para as análises de expressão gênica pelas técnicas de <i>microarray</i> e para a validação dos genes de interesse por RT-qPCR.	147
7.5 Anexo E - Estudo piloto para escolha do melhor método de extração e de armazenamento do RNA das biópsias gastrintestinais.	149
7.6 Anexo F - Estudo piloto para determinação do melhor controle endógeno para análises de RT-qPCR	151
7.7 Apêndice G – Medidas descritivas de peso e IMC e comparação dos 4 períodos avaliados (pré e pós-operatório 30, 60 e 90 dias) para os grupos responsivo e não responsivo à DGYR.	156
7.8 Anexo H – Medidas descritivas das dosagens das medicações que foram utilizadas apenas no período pré-operatório.	157
7.9 Anexo I – Medidas descritivas dos medicamentos que foram usados no período pré-operatório e continuados por pelo menos um período pós-operatório (30 dias, 60 dias e 90 dias).	158
7.10 Anexo J – Medidas descritivas do consumo de macronutrientes e comparação dos períodos pré e 90 dias pós-operatório para os grupos responsivo e não responsivo à DGYR	159
7.11 Anexo K – Medidas descritivas das variáveis bioquímicas e os testes para a comparação dos períodos para os grupos responsivo e não responsivo à DGYR.	161
7.12 Anexo L – Medidas descritivas de glicose e insulina e comparação dos 5 tempos do teste de refeição pré-operatório e pós-operatório de 90 dias da DGYR.	165
7.13 Anexo M - Medidas descritivas das variáveis hormonais e análise de comparação dos períodos (pré-operatório e pós-operatório 90 dias) em cada tempo do teste de alimentação.	167
7.14 Anexo N - Medidas descritivas e teste AUC dos hormônios gastrintestinais.	172
7.15 Anexo O - Resultado da normalização de dados por segmento gastrintestinal separado por grupo responsivo e não responsivo	173
7.16 Anexo P – Classificação dos processos biológicos com base nos termos do Gene Ontology (GO-Slim) para os genes diferencialmente expressos identificados no duodeno em ambos os grupos.	177
7.17 Anexo Q – Classificação dos processos biológicos com base nos termos do Gene Ontology (GO-Slim) para os genes diferencialmente expressos identificados no jejuno em ambos os grupos	179

7.18 Anexo R – Classificação dos processos biológicos com base nos termos do Gene Ontology (GO-Slim) para os genes diferencialmente expressos identificados no íleo em ambos os grupos.....	181
7.19 Anexo S – Classificação dos processos biológicos com base nos termos do Gene Ontology (GO-Slim) para os genes diferencialmente expressos identificados nos segmentos ECA e ECM dos pacientes responsivos à remissão do DM2.	183
7.20 Anexo T – Valores individuais das variáveis clínicas e bioquímicas dos pacientes R e NR ante e após 90 dias da DGYR	185
7.21 Anexo U - Valores individuais de fold change do segmento duodeno.....	186
7.22 Anexo V - Valores individuais de fold change do segmento jejuno	189
7.23 Anexo X - Valores individuais de fold change do segmento íleo	197
7.24 Anexo Z – Valores individuais de fold change dos segmentos ECA e ECM	199
8 REFERÊNCIAS	204
APÊNDICES	

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	porcentagem
®	marca registrada nacional
AA	ácido araquidônico
ABCA1	<i>binding cassette transporter A-1</i>
ACSL1	acil-CoA sintetase membro da família de cadeia longa 1 [<i>acyl-CoA synthetase long-chain family member 1</i>]
ACTB	beta actina
ADA	Associação Americana de Diabetes [<i>American Diabetes Association</i>]
AFIP	Associação Fundo de Incentivo à Pesquisa
AG	ácidos graxos
AGL	ácidos graxos livres
ALDOB	<i>aldolase, fructose-bisphosphate B</i>
ALDOC	<i>aldolase, fructose-bisphosphate C</i>
AMPc	AMP cíclico
APOC3	apolipoproteína C3
AUC	área sobre a curva
B2M	beta 2 microglobulina
BEPE	Bolsa de Estudo à Pesquisa no Exterior
BGA	banda gástrica ajustável
CAPPesq	Comissão de Ética para Análises de Projetos de Pesquisas
CB	cirurgia bariátrica
cDNA	DNA complementar
cm	centímetros
Cols	colaboradores
CYP1A1	citocromo P450 família 1 subfamília A membro 1 [<i>cytochrome P450 family 1 subfamily A member 1</i>]

DAVID	<i>Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery</i>
DEGs	genes diferencialmente expressos
DGYR	derivação gástrica em Y de Roux
DHCR7	<i>7-dehydrocholesterol reductase</i>
dL	decilitro
DM	diabetes mellitus
DM2	diabetes mellitus do tipo 2
DPP4	<i>dipeptidyl peptidase 4</i>
ECA	estômago corpo alto
ECM	estômago corpo médio
EDB	enteroscopia de duplo balão
EDN1	<i>endothelin 1</i>
ENPP7	ectonucleótido pirofosfatase/fosfodiesterase 7 [ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 7]
ERE	estresse de retículo endoplasmático
EROs	espécie reativa de oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
FADS1	<i>fatty acid desaturase 1</i>
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FDR	<i>false discovery rate</i>
FXR	receptor farnesoide X
GAPDH	<i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
GAST	gastrina
GCG	preproglucagon
GHRL	grelina
GI	gastrintestinal
GIP	peptídeo inibitório gástrico
GJ	glicemia de jejum
GLP- 1	peptídeo glucagon-símile 1
GLUT	transportador de glicose

GLUT-1	transportador de glicose do tipo 1
GO	<i>gene ontology</i>
h	horas
HbA1c	hemoglobina glicada
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HDL	lipoproteína de alta densidade
HIF1A	fator induzido por hipóxia-1 alfa
HMGR	<i>hydroxymethylglutaryl Co-A reductase</i>
HNF4A	Fator nuclear 4 alfa do hepatócito [<i>hepatocyte nuclear factor 4 alpha</i>]
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDF	Federação Internacional de Diabetes [<i>International Diabetes Federation</i>]
IMC	Índice de Massa Corporal
INSIG1	<i>insulin induced gene 1</i>
IPA	<i>Ingenuity Pathways Analysis</i>
IPKB	Ingenuity Pathways Knowledge Base
IQ	amplitude interquartil
kcal	quilocalorias
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
kg	quilogramas
LDL	lipoproteína de baixa densidade
LDLR	receptor de LDL
LIM	Linha de Investigação Médica
LXR	receptor X hepático
m	metros
ME1	enzima malica 1 [<i>malic enzyme 1</i>]
mg	miligramas
MIF	<i>macrophage inhibitory factor</i>
min	minutos
mL	mililitros

MMP1	matriz metalopeptidase 1 [<i>matrix metallopeptidase 1</i>]
MODY	<i>maturity-onset diabetes of the yong</i>
MSMO1	metilsterol monooxigenase 1 [<i>methylsterol monooxygenase 1</i>]
MYC	<i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
NCP1L1	<i>niemann Pick C-like-1</i>
ng	nanogramas
NR	não responsivos
O2	oxigênio
PBRC	<i>Pennington Biomedical Research Center</i>
PCA	<i>principal componente analysis</i>
PGA	produto de glicação avançada
PNS	Pesquisa Nacional de Saúde
PPARs	receptores ativados por proloferadores de peroxissomos
PPAR _γ	peroxisome-proliferator-activated receptor-γ
PYY	peptídeo YY
QUICKI	<i>quantitative insulin sensitivity check index</i>
R	responsivos
RCT	transporte reverso do colesterol [<i>reverse cholesterol transport</i>]
RE	retículo endoplasmático
REG1A	<i>regenerating family member 1 alpha</i>
rho	coeficiente de correlação de <i>Spearman</i>
RI	resistência à insulina
RIN	<i>RNA integrity number</i>
RL	<i>roux limb</i>
RMA	robust multi-array average
RNA	ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
RNs	receptores nucleares
RP	rank product

rpm	rotação por minuto
RT-qPCR	reação de transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia de polimerase quantitativa
RXR	receptor X retinoide
SCAP	SREBP cleavage-activating protein
SCT	secretina
SGLT1	<i>sodium/glucose cotransporter 1</i>
SI	<i>sucrase-isomaltase</i>
SLC10A2	família de carreadores de soluto 10, membro 2 [<i>solute carrier family 10 member 2</i>]
SLC5A1	<i>solute carrier family 5 member 1</i>
SLC7A11	família de carreadores de soluto 7, membro 11 [<i>solute carrier family 7 member 11</i>]
SREBP	<i>sterol-regulatory elemento-binding protein</i>
STC-1	<i>secretin tumor cell line</i>
SURMetaGIT	Surgically induced Metabolic effects if human GastroIntestinal Tract
T1R2	<i>taste 1 receptor member 2</i>
TG	triglicérides
TGI	trato gastrointestinal
TGR5	receptor acoplado à proteína G-8
TICE	<i>trans-intestinal cholesterol excretion</i>
TLR	<i>toll like receptor</i>
TM	<i>trade mark</i> (marca registrada internacional)
Uninove	Universidade Nove de Julho
UPR	<i>unfolded protein response</i>
VLDL	lipoproteína de muito baixa densidade
WebGestalt	Web-based Gene seT AnaLysis Toolkit
β	beta
μg	microgramas
μU	microunidades

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Ilustração esquemática dos potenciais mecanismos fisiológicos após a DGYR.....	9
Figura 2 -	Hipóteses da participação do TGI na regulação da homeostase glicêmica, em resposta à DGYR.....	10
Figura 3 -	Delineamento do protocolo do estudo com a descrição dos procedimentos gerais em seus respectivos períodos.	22
Figura 4 –	Mudanças anatômicas induzidas pela DGYR.....	25
Figura 5 –	Marcação da mucosa intestinal com tinta nanquim durante o exame pré-operatório.	30
Figura 6 -	Trajetória percorrida pelo enteroscópio no pós-operatório da DGYR	31
Figura 7 -	Resumo das quatro principais etapas do <i>microarray</i>	34
Figura 8 –	Diagrama consort das biópsias e RNA obtidos para realização da técnica de <i>microarray</i>	55
Figura 9 –	Teste de normalização nas amostras de ECM	57
Figura 10 –	Teste de normalização nas amostras de íleo	57
Figura 11 –	Teste de normalização nas amostras de duodeno	58
Figura 12 -	Resultados das alterações na expressão de genes gastrintestinais pela técnica de <i>microarray</i>	59
Figura 13 –	Contexto de dependência para interpretação das análises de <i>microarray</i>	61
Figura 14 –	Agrupamento hierárquico dos DEGs relacionados à função “desordem do sistema endócrino” no segmento duodeno.....	63
Figura 15 -	Classificação dos processos biológicos com base nos termos do Gene Ontology (GO-Slim) para os genes diferencialmente expressos identificados no duodeno de pacientes do grupo responsivos à remissão de DM2.....	64

Figura 16 –	Figura ilustrativa da interação entre as 48 vias canônicas identificadas por IPA no duodeno do grupo responsivo à remissão de DM2 após DGYR.....	66
Figura 17 –	Rede de interações gênicas do duodeno de pacientes responsivos à remissão do DM2 após DGYR	70
Figura 18 -	Conjunto de alterações da expressão de genes envolvidos na via LXR (NR1H3) no duodeno de pacientes responsivos à remissão pós-operatória de DM2.....	71
Figura 19 –	Comparação dos reguladores <i>upstream</i> envolvidos na via LXR (NR1H3) no duodeno de pacientes responsivos e não responsivos à remissão pós-operatória do DM2 e sua associação com a inibição da doença.	72
Figura 20 -	Ilustração da influência da via PPAR na alteração da via LXR no duodeno de pacientes responsivos à remissão de DM2. .	73
Figura 21 –	Funções com predição preditiva reduzida e/ou inibida em pacientes responsivos à remissão pós-operatória de DM2. ...	74
Figura 22 -	Genes mais representativos da alteração da via LXR no duodeno de pacientes responsivos à remissão pós-operatória de DM2.	75
Figura 23 –	Agrupamento hierárquico dos DEGs relacionados à função “desordem do sistema endócrino” no segmento jejuno	77
Figura 24 -	Classificação dos processos biológicos com base nos termos do Gene Ontology (GO-Slim) para os genes diferencialmente expressos identificados no jejuno de pacientes do grupo responsivos à remissão de DM2.....	78
Figura 25 -	Via de transativação do receptor de EGF por GPCRs em hipertrofia cardíaca identificada pelo banco Biocarta	81
Figura 26 –	Figura ilustrativa da interação entre as 111 vias canônicas identificadas por IPA no jejuno do grupo responsivo à remissão de DM2 após DGYR	82
Figura 27 –	Genes e reguladores <i>upstreams</i> envolvidos no acúmulo de lipídeo intracelular no jejuno de pacientes responsivos à remissão pós-operatória de DM2.....	84
Figura 28 –	Funções com predição preditiva reduzida no jejuno de pacientes responsivos à remissão pós-operatória de DM2 ...	85
Figura 29 -	Rede de interações gênicas do jejuno de pacientes responsivos à remissão do DM2 após DGYR.....	87

Figura 30 –	Preditiva, mas não significativa inibição do DM2 em amostras de jejuno de pacientes R à remissão da doença.	88
Figura 31 -	Agrupamento hierárquico dos DEGs relacionados à função “desordem do sistema endócrino” no segmento íleo.	94
Figura 32 -	Classificação dos processos biológicos com base nos termos do Gene Ontology (GO-Slim) para os genes diferencialmente expressos identificados no íleo de pacientes do grupo responsivos à remissão de DM2.....	95
Figura 33 –	Figura ilustrativa da interação entre as 73 vias canônicas identificadas por IPA no íleo do grupo responsivo à remissão de DM2 após DGYR.	97
Figura 34 -	Figura ilustrativa da via canônica regulatória do sistema imunológico do fator inibitório de migração de macrófagos...	99
Figura 35 -	Rede de interações gênicas do íleo de pacientes responsivos à remissão do DM2 após DGYR.....	101
Figura 36 –	Regulador <i>upstream</i> em destaque no íleo de pacientes responsivos à remissão de DM2.....	102
Figura 37 –	Figura ilustrativa da interação entre as 38 vias canônicas identificadas por IPA no ECA do grupo responsivo à remissão de DM2 após DGYR.	104
Figura 38 –	Via canônica da degradação da sacarose em mamíferos, representadas pelo aumento dos genes SI e ALDOB, respectivamente.	106
Figura 39 -	Rede de interações gênicas do ECA de pacientes responsivos à remissão do DM2 após DGYR.....	109
Figura 40 –	Reguladores <i>upstreams</i> e seus efeitos preditivos em vias metabólicas do ECA.	110
Figura 41 –	Figura ilustrativa da interação entre as 34 vias canônicas identificadas por IPA no ECM do grupo responsivo à remissão de DM2 após DGYR.	111
Figura 42 -	Rede de interações gênicas do ECM de pacientes responsivos à remissão do DM2 após DGYR.....	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Características descritivas das 20 pacientes da amostra, separadas por grupos responsivo e não responsivo à remissão de DM2.	40
Tabela 2 –	Dados de peso e IMC antes e após 90 dias da DGYR das 20 pacientes da amostra, separadas por grupos responsivo e não responsivo à remissão de DM2.	41
Tabela 3 –	Medicamentos para tratamento do DM2 de uso exclusivos no período pré-operatório.	43
Tabela 4 -	Valores de Índice QUICKI no pré-operatório e após 90 dias da DGYR.	49
Tabela 5 -	Medidas descritivas e análise de comparação da área sob a curva (AUC) de glicose e insulina no pré-operatório e após 90 dias da DGYR.....	52
Tabela 6 –	Número de DEGs encontrados dentro das 5 funções de interesse estudadas nos pacientes responsivos e não responsivos à remissão de DM2.....	60
Tabela 7 –	Vias representativas e os genes nelas envolvidos no duodeno de pacientes responsivos à remissão do DM2 de acordo com análise funcional por banco DAVID.	65
Tabela 8 -	Via representativa e os genes nela envolvidos no duodeno de pacientes responsivos à remissão do DM2 de acordo com análise funcional por banco Biocarta.	65
Tabela 9 -	Genes diferencialmente expressos no duodeno, que apresentaram correlação positiva forte com variáveis bioquímicas sistêmicas.	76
Tabela 10 –	Vias representativas e os genes nelas envolvidos no jejuno de pacientes responsivos à remissão do DM2 de acordo com análise funcional por banco DAVID.	79
Tabela 11 –	Vias representativas e os genes nelas envolvidos no jejuno de pacientes não responsivos à remissão do DM2 de acordo com análise funcional por banco DAVID.	80

Tabela 12 –	Via representativa e os genes nela envolvidos no jejuno de pacientes responsivos à remissão do DM2 de acordo com análise funcional por banco Biocarta.	80
Tabela 13 -	Genes diferencialmente expressos no jejuno que apresentaram correlação positiva moderada com variáveis clínicas e bioquímicas sistêmicas.	91
Tabela 14 -	Genes diferencialmente expressos no jejuno que apresentaram correlação negativa moderada com variáveis bioquímicas sistêmicas.	92
Tabela 15 –	Vias representativas e os genes nelas envolvidos no íleo de pacientes responsivos à remissão de diabetes mellitus tipo 2 de acordo com análise funcional por banco DAVID.	96
Tabela 16 –	Vias representativas e os genes nelas envolvidos no ECA de pacientes responsivos à remissão do DM2 de acordo com análise funcional por banco DAVID.	104
Tabela 17 –	Vias representativas e os genes nelas envolvidos no ECM de pacientes responsivos à remissão do DM2 de acordo com análise funcional por banco DAVID.	111
Tabela 18 –	Genes validados em cada segmento separado por grupo. Valores negativos e positivos indicam diminuição e aumento da expressão, respectivamente. Os valores em negrito indicam mudanças significativas ($p \leq 0,05$). (M), análise de microarrays; (V), validação por RT-qPCR	116

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Perfis medianos de peso corporal e IMC antes e após 30, 60 e 90 dias da DGYR das 20 pacientes da amostra, separadas por grupos responsivo e não responsivo à remissão de DM2.	42
Gráfico 2 –	Representação em frequência de pacientes em uso de biguanidas (metformina) antes e após 30, 60 e 90 dias da DGYR.	44
Gráfico 3 -	Concentrações séricas de HDL-c em condições de jejum no pré-operatório e mensalmente até 90 dias da DGYR.	46
Gráfico 4 –	Concentrações séricas de insulina e peptídeo C em condições de jejum no pré-operatório e mensalmente até 90 dias da DGYR.	47
Gráfico 5 –	Concentrações plasmáticas de glicose e HbA1c em condições de jejum antes e após DGYR.	48
Gráfico 6 –	Avaliação das concentrações plasmáticas de glicose durante diferentes tempos do teste de alimentação, no pré-operatório e após 90 dias da DGYR.	50
Gráfico 7 -	Avaliação das concentrações plasmáticas de insulina durante diferentes tempos do teste de alimentação, no pré-operatório e após 90 dias da DGYR.	51
Gráfico 8 –	Área sobre a curva de glicose no pré-operatório e após 90 dias da DGYR.	52
Gráfico 9 –	Área sobre a curva de insulina no pré-operatório e após 90 dias da DGYR.	53
Gráfico 10 –	Avaliação dos níveis plasmáticos de GLP-1 durante teste de alimentação, antes e após DGYR.....	54
Gráfico 11 –	Dez vias canônicas mais significativas no duodeno do grupo responsivo à remissão de DM2 após DGYR.	67
Gráfico 12 -	Comparação das dez vias canônicas mais significativas no duodeno do grupo R com as respectivas vias no grupo NR. .	68
Gráfico 13 –	Principais genes diferencialmente expressos no duodeno de pacientes responsivos e não responsivos à remissão de DM2 após DGYR.....	69

Gráfico 14 – Dez vias canônicas mais significativas no jejuno do grupo responsivo à remissão de DM2 após DGYR.	83
Gráfico 15 - Comparação das dez vias canônicas mais significativas no jejuno do grupo R com as respectivas vias no grupo NR.	86
Gráfico 16 - Principais genes diferencialmente expressos no jejuno de pacientes responsivos e não responsivos à remissão de DM2 após DGYR (Parte 1).....	89
Gráfico 17 - Principais genes diferencialmente expressos no jejuno de pacientes responsivos e não responsivos à remissão de DM2 após DGYR (Parte 2).....	90
Gráfico 18 - Dez vias canônicas mais significativas no íleo do grupo responsivo à remissão de DM2 após DGYR.	98
Gráfico 19 - Comparação das dez vias canônicas mais significativas no íleo do grupo R com as respectivas vias no grupo NR.....	98
Gráfico 20 - Principais genes diferencialmente expressos no íleo de pacientes responsivos e não responsivos à remissão de DM2 após DGYR.....	100
Gráfico 21 - Dez vias canônicas mais significativas no ECA do grupo responsivo à remissão de DM2 após DGYR.	105
Gráfico 22 - Principais genes diferencialmente expressos no ECA de pacientes responsivos e não responsivos à remissão de DM2 após DGYR.....	108
Gráfico 23 - Dez vias canônicas mais significativas no ECM do grupo responsivo à remissão de DM2 após DGYR.	112
Gráfico 24 - Principais genes diferencialmente expressos no ECM de pacientes responsivos e não responsivos à remissão de DM2 após DGYR.....	113

RESUMO

Kobal PS. *Alterações na expressão gênica do tecido gástrico e intestinal de pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 2 submetidos à derivação gástrica em Y de Roux* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

Em pacientes obesos com diabetes mellitus tipo 2 (DM2), o controle glicêmico pode ser observado em poucos dias após derivação gástrica em Y de Roux (DGYR), antes de ocorrer significativa perda de peso. Dentre os mecanismos propostos para explicar esse benefício metabólico, aqueles que envolvem adaptações gastrintestinais (GI) em resposta às mudanças anatômicas cirúrgicas são os mais consistentes. O presente estudo avaliou a resposta global do transcriptoma gastrintestinal à DGYR em pacientes obesos responsivos à remissão pós-operatória de DM2 e sua correlação com marcadores de homeostase glicêmica. Vinte pacientes adultas obesas com DM2 e candidatas à DGYR foram incluídas, de acordo com critérios específicos. Todas foram submetidas à técnica de DGYR, por laparotomia padronizada e acompanhadas até um ano após DGYR, para classificação dos pacientes responsivos (R) e não responsivos (NR) à remissão de DM2, de acordo com o critério da *American Diabetes Association* (ADA). Variáveis clínicas e bioquímicas envolvidas na homeostase glicêmica foram avaliadas no pré-operatório e, mensalmente, até 90 dias pós-operatórios. Análises transcriptômicas gastrintestinais foram desenvolvidas por técnica de *microarray* (Genechip 1.0 ST Array; Affymetrix™), a partir de RNA obtido de biópsias de estômago corpo alto (ECA), estômago corpo médio (ECM), duodeno, jejuno e íleo, coletadas por enteroscopia de duplo balão (EDB), no período pré-operatório e após 90 dias da DGYR. O método *não paramétrico Rank Products* (RP) foi utilizado para a seleção dos genes diferencialmente expressos (DEGs). Os DEGs identificados por RP foram submetidos ao programa *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA), para a seleção de genes dentro das seguintes funções relacionadas à fisiopatologia do DM2: 1) Metabolismo dos Carboidratos; 2) Metabolismo Lipídico; 3) Metabolismo dos Aminoácidos, 4) Doenças Metabólicas e 5) Desordem do Sistema Endócrino. DEGs relacionados a essas cinco funções foram submetidos a análises de agrupamento hierárquico de Person, classificação funcional de ontologia gênica (*GOslim ontology*), análise de enriquecimento funcional (*software* DAVID, com uso de banco de dados KEGG e Biocarta) e de vias canônicas pelo *software* IPA. Essas análises foram feitas separadamente em pacientes R e NR. DEGs de interesse foram validados por RT-qPCR usando o sistema de ensaio Taqman® e equipamento 7500 Fast™ (Life Technologies). O coeficiente de correlação de *Spearman* correlacionou variáveis clínicas e bioquímicas com variáveis transcriptômicas. Das 20 pacientes estudadas, 12 foram classificadas como R e 8 como NR. Nas 5 funções de interesse, o

número de DEGs encontrado no grupo R foi: 99 (ECA), 26 (ECM), 62 (duodeno), 241 (jejuno) e 63 (íleo). Dentre os DEGs encontrados no duodeno, 8 apresentaram correlação positiva forte a muito forte (coeficiente de *Spearman* > 0,7) com alterações das concentrações sistêmicas de glicemia ou hemoglobina glicada. Destes, LDLR, MMP1, NPC1L1 e SLC2A5 foram submetidos à análise de RT-qPCR e validados pelo método. De acordo com as análises de enriquecimento funcional e vias canônicas entre grupos (R e NR), apenas a via LXR/RXR, representativa de DEGs encontrados no duodeno de pacientes R, apresentou associação com remissão do DM2. Nos demais segmentos gastrintestinais, essas análises não identificaram vias representativas relacionadas com DM2, embora alguns de seus DEGs estivessem potencialmente envolvidos com marcadores da homeostase glicêmica. Em conclusão, DGYR induziu modificações transcriptômicas gastrintestinais em pacientes obesos com remissão pós-operatória de DM2 e algumas delas foram associadas com marcadores de homeostase glicêmica, principalmente por meio de alterações na via LXR no duodeno.

Descritores: cirurgia bariátrica; derivação gástrica; diabetes mellitus tipo 2; enteroscopia de duplo balão; trato gastrointestinal; expressão gênica.

ABSTRACT

Kobal PS. *Changes in the gene expression of gastric and intestinal tissues of patients with type 2 diabetes mellitus submitted to Roux-en-Y gastric bypass* [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

In obese patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM), glycemic control is observed within a few days after Roux-en-Y gastric bypass (RYGB), even before significant weight loss. Among the mechanisms proposed to explain this metabolic benefit, those involving gastrointestinal (GI) adaptations in response to surgical anatomical rearrangement are the most consistent. The present study evaluated the global response of the gastrointestinal transcriptome to DGYR in obese patients responsive to postoperative remission of T2DM and its correlation with markers of glycemic homeostasis. Twenty adult obese patients with T2DM diagnosis and candidates to RYGB were included, according to specific criteria. All of them were submitted to standardized laparotomy RYGB surgery and followed until one year after RYGB, for the patients classification as responsive (R) and non-responsive (NR) to T2DM remission according to the American Diabetes Association (ADA) criteria. Clinical and biochemical variables involved in glycemic homeostasis were evaluated at preoperative and monthly up to 90 postoperative days. GI transcriptomic analyzes were performed by microarray technique (Genechip 1.0 ST Array; Affymetrix™), in RNA samples obtained from biopsies of the stomach cardia (SC), stomach fundus (SF), duodenum, jejunum and ileum, collected by double-balloon enteroscopy (DBE) at pre-postoperative and 90 days after RYGB. The non-parametric Rank Products (RP) method was used for selection of differentially expressed genes (DEGs). DEGs identified by RP were submitted to the Ingenuity Pathways Analysis (IPA) program for its selection within the following functions: 1) Carbohydrate Metabolism; 2) Lipid Metabolism; 3) Amino Acids Metabolism, 4) Metabolic Diseases and 5) Endocrine System Disorder. DEGs related with these five functions were submitted to the analysis of Pearson hierarchical clustering, functional classification of gene ontology (GOSlim), functional enrichment (DAVID software, using KEGG and Biocarta database), and canonical pathways (IPA). These analyzes were performed separately in R and NR groups. DEGs of interest were validated by RT-qPCR using Taqman® assays in 7500 Fast™ (Life Technologies). The Spearman correlation coefficient correlated clinical and biochemical variables with DEGs. From the 20 patients studied, 12 were classified as R and 8 as NR. In the 5 functions of interest, the number of DEGs found in R group were: 99 (SC), 26 (SF), 62 (duodenum), 241 (jejunum) and 63 (ileum). Among the DEGs found in the duodenum, 8 presented a strong to a very strong positive correlation (Spearman coefficient > 0.7) with systemic concentrations of glycemia or glycated hemoglobin. Of

these genes, LDLR, MMP1, NPC1L1 and SLC2A5 were subjected to RT-qPCR analysis and validated by the method. According to the functional enrichment and canonical pathways analyzes between groups (R and NR), only the LXR/RXR pathway, representative of DEGs found in the duodenum of R patients, was associated with T2DM remission. In the other GI segments, these analyzes did not identify representative pathways related to T2DM, although some of their DEGs were potentially involved with markers of glycemic homeostasis. In conclusion, RYGB induced gastrointestinal transcriptomics changes in obese patients with postoperative remission of T2DM and some of these were associated with markers of glycemic homeostasis, mainly by changes in LXR pathway in the duodenum.

Descriptors: bariatric surgery; gastric bypass; diabetes mellitus, type 2; double-balloon enteroscopy; gastrointestinal tract; gene expression.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes mellitus tipo 2

Diabetes mellitus (DM) é um problema de saúde pública mundial que atingiu 415 milhões de pessoas no ano de 2015 e poderá acometer até 642 milhões em 2040, segundo a Federação Internacional de Diabetes (IDF). Essa crescente incidência é predominantemente representada (90%) pelo DM do tipo 2 (DM2)¹ e ocorre em paralelo ao aumento da prevalência de obesidade. Nesse contexto, o aumento de complicações agudas e crônicas associadas ao DM2 também é esperado, e pode agravar as já elevadas taxas de hospitalizações, mortalidade e gastos de recursos financeiros associados à doença^{2,3}.

Além da prevalência da obesidade, fatores que explicam a progressiva incidência mundial de DM2 incluem aumento do crescimento e envelhecimento populacional, da urbanização, do sedentarismo e da sobrevivência desses pacientes⁴. No Brasil, aproximadamente, 14,3 milhões de pessoas foram diagnosticadas com DM em 2015 e 23,3 milhões deverão ser acometidas pela doença em 2040¹. Esses dados foram divulgados pela IDF, que classificou o Brasil como o quarto país com maior número de casos de DM no mundo¹.

A Pesquisa Nacional de Saúde (PNS), feita pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), mostrou que 56,9% das pessoas com mais de 18 anos estão acima do peso em nosso país. O estudo revelou, ainda, uma prevalência de excesso de peso e obesidade em indivíduos do sexo feminino (58,2%), em comparação a indivíduos do sexo masculino (55,6%). Os dados anunciados pelo IBGE traduzem a urgência de se pensar em políticas públicas adequadas à prevenção e ao tratamento do sobrepeso e da obesidade, para minimizar a alta incidência de DM2 na população brasileira⁵.

Cabe destacar que, embora a obesidade continue sendo um grande fator de risco para DM2, nem todos os indivíduos obesos ou com sobrepeso

progridem com DM2. De fato, aproximadamente, 23% dos indivíduos com excesso de peso não apresentam distúrbios metabólicos⁶. Isso mostra que o DM2 é uma doença heterogênea, que envolve fatores genéticos e ambientais em sua fisiopatologia. Ocorre que o genoma humano carrega a informação do código genético do indivíduo (genótipo), mas fatores ambientais desfavoráveis podem alterar a expressão de seus genes, impactando no seu fenótipo.

Dessa forma, grande parcela da população humana pode ser susceptível ao DM2, se apresentar pré-disposição à doença, se tiver hábitos de vida inadequados. No entanto, alguns indivíduos possuem uma resposta adaptativa (hormese) a fatores de estilo de vida prejudiciais, levando à proteção contra o desenvolvimento da doença⁶. Um objetivo importante da saúde pública é entender melhor a fisiopatologia do DM2 e determinar quais indivíduos estão em maior risco, a fim de direcionar estratégias de prevenção e intervenção precoce⁷.

DM2 é considerado um distúrbio metabólico altamente complexo e heterogêneo, caracterizado por resistência à insulina (RI) e hiperglicemia. A RI nos tecidos periféricos ocorre na fase inicial da doença, geralmente acompanhada por hiperinsulinemia⁸. Por outro lado, a piora da hiperglicemia ao longo do tempo se relaciona com disfunção de células β pancreáticas, com capacidade diminuída de secretar insulina para suprir a alta demanda imposta pela resistência a esse hormônio⁹⁻¹¹.

Dentre os diversos fatores relacionados à fisiopatologia do DM2, o aumento da concentração de ácidos graxos livres (AGL) circulantes chama a atenção^{12,13}. O quadro de RI é comumente acompanhado de dislipidemias¹⁴. Além disso, a disfunção de células β parece advir não apenas da exposição prolongada a altas concentrações plasmáticas de glicose, como também de AGL ou a combinação de ambos¹⁵.

Em potencial associação do DM2 com obesidade, dietas ricas em gordura podem induzir RI e culminar no acúmulo intracelular de ácidos graxos, com impacto negativo sobre funções mitocondriais. Em humanos, essas dietas resultam na regulação negativa de vários genes associados à fosforilação oxidativa e à biogênese mitocondrial. Notadamente, indivíduos

com DM2 ou também com RI¹⁶⁻¹⁹ apresentam expressão reduzida de genes envolvidos no metabolismo oxidativo mitocondrial.

De fato, evidências robustas associam conteúdo aumentado de lipídios e disfunção mitocondrial no tecido muscular de humanos com DM2, particularmente caracterizada pela diminuição de marcadores do metabolismo oxidativo, em oposição ao glicolítico²⁰⁻²². Estresse de retículo endoplasmático (ERE) constitui elo potencial entre dislipidemia e disfunção mitocondrial. Distúrbios do metabolismo lipídico são marcadores de ERE e tem sido especulado como possíveis mecanismos celulares envolvidos na fisiopatologia do DM2.

1.2 Potencial contribuição do trato gastrointestinal na fisiopatologia do diabetes mellitus tipo 2

O trato gastrointestinal (TGI), principalmente o intestino, participa ativamente do metabolismo lipídico, em especial, da homeostase do colesterol corpóreo e do balanço energético geral¹⁴. O papel do intestino no metabolismo de gorduras inclui o controle da homeostase do colesterol corpóreo²³. Adicionalmente, o intestino delgado é um órgão neuroendócrino capaz de expressar mais de 30 genes que codificam hormônios em resposta a diversas vias de sinalização celular, culminando na produção de peptídeos bioativos que participam no controle da saciedade e da homeostase glicêmica²⁴⁻²⁶.

Nesse contexto, o potencial papel desse órgão na fisiopatologia do DM2 vem sendo cada vez mais explorado. Em particular, o hormônio intestinal GLP-1 (peptídeo glucagon-símile 1) foi reconhecido como importante contribuinte para a manutenção da glicemia. Desde então, o processo glicorregulatório foi considerado como o resultado da interação de GLP-1 com outros hormônios (incluindo hormônios pancreáticos, insulina e glucagon), de tal forma que DM2 passou a ser entendido com uma doença multi-hormonal. Os principais papéis fisiopatológicos de GLP-1 sobre o DM2 abrangem seus efeitos sobre as ilhotas pancreáticas (estimulação da secreção de insulina e supressão da liberação de glucagon), sobre o trato digestivo (inibição do

esvaziamento gástrico e motilidade intestinal) e sobre o apetite. Pacientes com DM2 podem apresentar concentrações pós-prandiais diminuídas de GLP1. Essa alteração parece contribuir para o quadro clínico da doença, ao diminuir o estímulo fisiológico da secreção de insulina e não suprimir o de glucagon²⁷.

Estudos do papel do metabolismo lipídico intestinal na fisiopatologia de DM2 são limitados em humanos. A maioria desenvolvida em modelos animais relata que a RI local é causa e não consequência da desregulação do metabolismo lipídico no órgão¹⁴. Cabe ressaltar, entretanto, que o metabolismo lipídico intestinal de indivíduos com RI difere-se de pacientes sensíveis ao hormônio.

Particularmente, o duodeno de indivíduos com RI apresenta síntese e secreção aumentada de lipídeos e lipoproteínas, sugerindo papel importante desse segmento intestinal na disfunção do metabolismo lipídico¹⁴. Além disso, o intestino desses indivíduos parece ter maior capacidade de captura de lipoproteína de baixa densidade (LDL) circulante e menor potencial de liberação de colesterol nas partículas de lipoproteínas de alta densidade (HDL) nascentes. Essas observações reforçam a hipótese de que o intestino pode desempenhar um papel fundamental no fenótipo de colesterol alterado, observado em quadros de RI sistêmica²³.

Com base nessas informações, sugere-se que os lipídeos plasmáticos sejam regulados por uma interação entre o metabolismo hepático e intestinal, capaz de sincronizar a homeostase lipídica, e que essa interação pode estar deficiente no DM2¹⁴. O mecanismo subjacente a essa deficiência ainda permanece obscuro. Especula-se que a exposição prolongada a concentrações elevadas de AGL aumente a quantidade intracelular de triglicerídeos nos enterócitos²⁸, podendo culminar em ERE e disfunção mitocondrial.

A redução da sinalização da insulina, desencadeada por estresse oxidativo e inflamação, pode induzir síntese lipídica e lipoproteica exacerbada, e anormalidades no perfil de colesterol. Essas alterações são consideradas contribuintes da dislipidemia aterogênica observada em indivíduos com

síndrome metabólica e DM2. O intestino é alvo da insulina para a modulação da absorção de vários nutrientes, tais como glicose, aminoácidos, vitaminas e íons. Além disso, o transporte de lipídeos nos enterócitos também é regulado pela ação desse hormônio^{28,29}.

A importância da ação da insulina no intestino tem sido ilustrada por alterações funcionais presentes em animais com DM2 induzida por fármaco. Nesses modelos de DM2, observa-se maior absorção intestinal de vários nutrientes, incluindo glicose e aminoácidos. No entanto, a sensibilidade intestinal à insulina raramente foi avaliada em condições normais e patológicas^{28,29}.

Em humanos, o intestino delgado de indivíduos com RI apresenta evidências de defeitos de sinalização de insulina, provavelmente como resultado de um ambiente local pró-oxidativo e pró-inflamatório exacerbado^{14,23,24}. Análise de transcriptoma do intestino humano, mais especificamente do duodeno, evidenciou ainda adaptações funcionais à resistência sistêmica à insulina. Genes envolvidos na digestão, na composição da matriz extracelular, em peptídeos intestinais e no metabolismo do colesterol apresentaram-se alterados no intestino de indivíduos com RI, em comparação com o intestino de indivíduos sensíveis ao hormônio¹⁴.

Em suma, embora os estudos que avaliam o metabolismo lipídico intestinal em humanos portadores de DM2 sejam escassos, defeitos na homeostase da sinalização da insulina estão presentes e parecem se relacionar com alterações de vias intestinais de inflamação, estresse oxidativo e homeostase do colesterol¹⁴. Os dados disponíveis sugerem, portanto, que o intestino delgado humano é um tecido sensível à insulina, que pode se tornar resistente à ação desse hormônio em condições metabólicas adversas. Evidências mais robustas são necessárias para esclarecer quando essa resistência é causa ou também consequência da regulação do metabolismo lipídico pelo órgão.

1.3 Derivação gástrica em Y de Roux e homeostase glicêmica

O excesso de tecido adiposo armazenado em pacientes obesos parece ser responsável por várias comorbidades relacionadas com a doença que podem levar à morte precoce, o que inclui o DM2^{30,31}. Cuidados primários, como modificações dietéticas e de atividade física, frequentemente, apresentam baixa aderência em longo prazo. Nesse cenário, a cirurgia bariátrica (CB) é o tratamento mais eficaz atualmente disponível para tratamento da obesidade³¹.

Procedimentos bariátricos reduzem substancialmente a morbidade e mortalidade associadas com excesso de peso corporal, em comparação com cuidados clínicos primários de mudanças de hábitos de vida e intervenções farmacológicas para o tratamento de suas comorbidades³²⁻³⁴. Revisão sistemática mostrou, ainda, que a CB melhora consideravelmente a qualidade de vida dos pacientes³⁵. Um dos benefícios mais impactantes, no entanto, da CB reside em sua frequente capacidade de normalizar quadros de hiperglicemia e de RI em curto prazo, antes mesmo de ocorrer perda significativa de peso².

De acordo com a Associação Americana de Diabetes (ADA), tanto remissão completa quanto parcial do DM2 exigem uma duração mínima de 1 ano. A ADA considera remissão parcial do DM2, pacientes que apresentam hemoglobina glicada (HbA1c) <6,5% e glicemia de jejum (GJ) entre 100-125 mg/dL, com duração de, pelo menos, 1 ano e ausência de terapia farmacológica; enquanto a remissão completa da doença reflete o retorno aos valores normais do metabolismo da glicose (HbA1C <6%, GJ <100 mg/dL), com duração de pelo menos 1 ano e ausência de terapia farmacológica³⁵. Cabe destacar que hiperglicemia após 1 ano pode indicar recidiva, mas não significa a ausência de remissão.

Taxas mais elevadas de controle e remissão do DM2 são obtidas com procedimentos bariátricos que incluem derivação gastrointestinal (GI), como a derivação gástrica em Y de Roux (DGYR). Essa técnica de CB inclui redução da capacidade gástrica em, aproximadamente, 95%, e desvio do duodeno e de parte do jejuno do trânsito alimentar, promovendo remissão do DM2 em

83,3% a 90,6% dos pacientes, segundo metanálises³⁶⁻³⁸. Lee e cols.⁵ relataram taxas de remissão do DM2 de 93% após 1 ano da DGYR.

A remissão de DM2 após CB puramente restritiva, como a técnica de banda gástrica ajustável (BGA), é em torno de 48%^{38,39}. Adicionalmente, o ritmo da remissão do DM2 é mais lento após BGA do que após DGYR, indicando que a remissão do DM2 após técnicas puramente restritivas está ligada ao tempo necessário para se atingir perda de peso e à intensidade em que essa perda ocorre. Estudo de Dixon e cols. mostrou que a melhora do controle glicêmico após BGA foi de, aproximadamente, 40 a 73% após 3 anos da cirurgia³⁹⁻⁴¹. Estudo realizado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) mostrou 66,7% de taxa de remissão do DM2 a longo prazo e o tempo de diagnóstico da doença esteve associado com ausência da resposta cirúrgica⁴².

Menor ingestão e absorção alimentares, em função de alterações cirúrgicas da DGYR, podem explicar perda de peso corporal; mas não explicam, plenamente, seu efeito na melhora em curto prazo do DM2. Benefícios clínicos associados a técnicas de CB que envolvem desvio intestinal como a DGYR parecem advir da extensão de seus reflexos, que impactam o sistema GI e podem levar a efeitos sistêmicos, como melhora do perfil glicêmico e lipídico. Entre eles, inclui-se alteração na secreção de hormônios intestinais, mudança no perfil da microbiota intestinal e no metabolismo de ácidos biliares, conforme resumido na Figura 1⁴³.

Figura 1 - Ilustração esquemática dos potenciais mecanismos fisiológicos após a DGYR [adaptado de ⁴³]. Diferentes mecanismos são organizados com base no seu nível de origem e, portanto, divididos em efeitos gastrintestinais (círculo interno, branco), efeitos sistêmicos (círculo médio, azul) e comportamentais (círculo externo, laranja).

Os benefícios metabólicos induzidos pela DGYR sobre DM2 impulsionam esforços para esclarecer os mecanismos neles envolvidos. O alcance desse conhecimento é dificultado pelas robustas alterações periféricas e centrais induzidas cirurgicamente, que parecem orquestrar conjuntamente o controle glicêmico. Hipóteses levantadas sugerem importante participação do TGI (principalmente do intestino) na regulação da glicose, em resposta à DGYR²⁴⁻²⁶, conforme resumido na Figura 2 e detalhado a seguir.

Figura 2 - Hipóteses da participação do TGI na regulação da homeostase glicêmica, em resposta à DGYR. A: Efeitos imediatos da DGYR devido a alterações anatômicas. B: Potenciais mediadores/mecanismos envolvidos e. C: Efeitos sobre a homeostase da glicose [Adaptado de ²⁶].

Dentre os mecanismos propostos para explicar a remissão do DM2 induzida por DGYR, a hipótese de restrição calórica no controle da homeostase glicêmica associa-se à nova conformação anatômica gástrica. Esta pressupõe que a restrição de ingestão alimentar no período pós-operatório imediato tem mínimo efeito sobre células β pancreáticas e, portanto, melhora a glicemia. Essa hipótese não consegue, entretanto, explicar totalmente o controle glicêmico pós-operatório. Além disso, essa hipótese se enfraquece ao considerarmos que a privação de alimentos ocorre independentemente da técnica cirúrgica utilizada e que o controle da glicemia pós-operatório é mínimo após procedimentos estritamente restritivos³⁹.

As demais hipóteses que serão discutidas sugerem direta ou indiretamente importante participação intestinal na regulação da glicose após cirurgias bariátricas e parecem mais consistentes. Parte delas se ampara no papel do intestino na produção de hormônios envolvidos no controle glicêmico e seu possível papel na fisiopatologia de DM2.

A hipótese do intestino proximal considera que o desvio cirúrgico do duodeno e jejuno proximal do trânsito alimentar evita a liberação de um ou mais sinais diabetogênicos, chamados de fator(es) “anti-incretina”, induzida por nutrientes em indivíduos susceptíveis. Dessa forma, a RI é diminuída e a tolerância à glicose, restaurada^{25,44,45}. O GIP tem sido proposto como candidato do sinal diabetogênico na hipótese do intestino proximal. GIP tem baixo efeito insulínico em pacientes com DM2, comportando-se, principalmente, como hormônio glucagonotrópico^{44,45}.

Outra hipótese bastante discutida nessa área é a do intestino distal. Essa hipótese sugere que a oferta rápida e direta de nutrientes para o intestino distal resulta em aumento da produção de sinais antidiabetogênicos, como os mediados por hormônios insulínicos, contribuindo para a reversão da hiperglicemia^{39,46}. Principais candidatos desses sinais incluem o peptídeo YY (PYY) e o hormônio incretina GLP-1, pois as concentrações plasmáticas desses hormônios aumentam após cirurgias que realizam o desvio do intestino proximal²⁴.

Estudos que exploram os mecanismos que envolvem essas hipóteses no intestino humano após DGYR ainda são limitados. Os estudos realizados, na grande maioria, restringem-se a observações de concentrações sistêmicas de hormônios intestinais. Dentre eles, observou-se que o rápido fornecimento de nutrientes no intestino superior após DGYR se associa ao aumento precoce e acentuado das concentrações plasmáticas de glicose, insulina e GLP-1 após ingestão de refeição mista ou glicose⁴⁷⁻⁵³.

Curiosamente, estudo clínico demonstrou que concentrações plasmáticas aumentadas de GLP-1 se correlacionam positivamente com os de ácidos biliares em pacientes submetidos à DGYR⁵⁴. Além de seu papel na absorção de lipídeos dietéticos e na regulação do metabolismo do colesterol, os ácidos biliares também agem como hormônios, ligando-se ao receptor farnesóide X (FXR) e receptor de ácido biliar acoplado à proteína G-5 (TGR5), altamente expressos em hepatócitos e enterócitos⁵⁵⁻⁵⁷. Ácidos biliares estimularam a secreção de GLP-1 via TGR5 em linhagem de células

enteroendócrinas STC-1⁵⁸, o que pode explicar sua correlação com as concentrações desse hormônio após DGYR.

Outra hipótese que envolve o intestino humano que está apenas indiretamente relacionada ao seu papel na produção de hormônios envolvidos no controle glicêmico reside nos ácidos biliares. Notadamente, o intestino delgado participa da regulação da homeostase do colesterol corpóreo, substrato essencial para a síntese de ácidos biliares. Esse órgão não apenas contribui para absorção de colesterol, mas também participa da remoção de seu excesso, pela via do RCT (do Inglês, *reverse cholesterol transport*) e, em menor extensão, pela via TICE (do Inglês, *trans-intestinal cholesterol excretion*)²³. Classicamente, a via RCT tem, na secreção biliar, sua única via para a remoção intestinal do colesterol derivado do plasma, e HDL como sua lipoproteína primária; enquanto TICE ocorre, principalmente, em situações de insuficiência biliar e sua lipoproteína primária ainda é desconhecida.

Evidências sugerem papel crucial de receptores nucleares (RNs) de células epiteliais do intestino na homeostase do colesterol total. Estes orquestram os fluxos de colesterol para enterócitos e sua eliminação orgânica pela regulação transcricional da absorção de colesterol, biogênese de HDL, RCT e TICE⁵⁹⁻⁶⁵. Os RNs incluem: receptor X retinoide (RXR), receptor X hepático (LXR), FXR e receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (PPARs). Particularmente, RXR heterodimeriza com esses NRs, para controlar a especificidade de transcrição gênica⁶⁶⁻⁷⁰. Por si só, RXR é autossuficiente para esse propósito, enquanto os demais NRs são seus ligantes-dependentes^{71,72}. NRs são expressos ao longo do sistema GI⁷³, sugerindo um papel crucial desses fatores de transcrição no intestino para a regulação do metabolismo de HDL-colesterol, RCT e TICE.

Concentrações séricas de ácidos biliares estão aumentadas em pacientes submetidos à DGYR⁵⁴. De fato, os ácidos biliares têm mostrado regular vias do metabolismo da glicose pela ativação de FXR, com consequente diminuição da gliconeogênese hepática, aumento da síntese de glicogênio hepático e melhora da sensibilidade à insulina^{74,75}.

Outra hipótese que envolve o intestino na remissão de DM2 após DGYR abrange sua microbiota residente. Em função das modificações anatômicas intestinais da DGYR, a microbiota residente também se altera. Após DGYR, pacientes obesos apresentam aumento da riqueza da microbiota intestinal em paralelo com alterações na expressão de genes do tecido adiposo branco⁷⁶. Esta observação sugere um possível papel de bactérias intestinais sobre efeitos metabólicos pós-operatórios.

Notadamente, alterações da microbiota intestinal (disbiose) se associam a doenças metabólicas, que incluem obesidade e DM2⁷⁷. Mecanismos relacionados parecem envolver inflamação crônica de baixo grau, característica de distúrbios metabólicos e aparentemente induzida por aumento de translocação bacteriana. Esse estado pró-inflamatório parece prejudicar ação e secreção de insulina, contribuindo para o desenvolvimento de DM2^{76,77}.

Em conjunto, as observações reportadas consistem nos mecanismos hipotéticos clássicos que tentam explicar porque pacientes obesos com DM2 alcançam homeostase glicêmica em curto prazo após DGYR. No entanto, essa área é um campo fértil e estudo recente sugere novos mecanismos para o efeito metabólico da cirurgia. Dentre eles, destaca-se o possível papel de DGYR na regulação da expressão do gene que transcreve o transportador de glicose do tipo 1 (GLUT1). GLUT1 codifica uma proteína transportadora de glicose não intestinal, mas que foi encontrada superexpressa na membrana basolateral do jejuno da alça alimentar (*Roux Limb* – RL), de ratos e humanos após DGYR.

A presença de GLUT1 nesse segmento intestinal após DGYR foi associada à sua hiperplasia, com aumento do número de células produtoras de incretinas. Análises complementares mostraram que o transporte de glicose para dentro dos enterócitos estava aumentado no jejuno da RL, devido ao aumento da expressão do gene SGLT1 (também maior captação de glicose sanguínea por GLUT1). Adicionalmente, a expressão do gene fator induzido por hipóxia-1 alfa (HIF1A) também estava aumentada nessa região e diminuída na porção do jejuno da alça biliopancreática (alça exclusiva). Em

conjunto, as observações levantadas sugerem que, após DGYR, o jejuno da RL aumenta a absorção intestinal e captação de glicose sistêmica para seu uso como substrato energético, o que pode impactar na redução da hiperglicemia sistêmica de pacientes com DM2. Além disso, essas alterações parecem implementar a hiperplasia e hipóxia observadas nessa região^{78,79}.

Em suma, os efeitos metabólicos induzidos por DGYR são oriundos de mecanismos multifatoriais ainda pouco explorados, o que implica em abordagem multidisciplinar e integrada para seu estudo. Recentemente, com o apoio da Fapesp (processo 2011/09612-3), nosso laboratório desenvolve estudo temático com o objetivo principal de avaliar se a remissão precoce de DM2 após DGYR é associada a alterações “ômicas” do TGI que impactam na homeostase glicêmica sistêmica. O protocolo do referido estudo, denominado SURMetaGIT (do Inglês, ***SUR**gically induced **Meta**bolic effects of human **Gastro**Intestinal **Tract***), foi recentemente publicado⁸⁰, e suas avaliações transcriptômicas gastrintestinais constituem foco de análise da presente pesquisa.

1.4 Estudo do perfil de expressão gênica global em diabetes mellitus tipo 2

A busca por genes associados à predisposição a doenças complexas é um grande desafio. A variedade de fatores (genéticos e não genéticos) envolvidos nestas etiologias e a complexidade de suas interações não podem ser explicadas por técnicas reducionistas que estudam gene a gene. Atualmente, os poucos estudos que avaliaram mudanças na expressão de genes GI após DGYR focaram em genes específicos, como aqueles que codificam os hormônios grelina (GHRL), secretina (SCT), GLP-1 (GCG), GIP, PYY^{81,82} e aqueles relacionados a receptores de gosto (T1R2), absorção de glicose (SGLT-1) e genes da família GLUT^{78,83,84}.

A principal limitação da análise de genes específicos individuais é ignorar a dependência onipresente entre eles. Genes trabalham em conjunto (como nas vias de sinalização, por exemplo) e, claramente, a magnitude da

expressão não são independentes. Análises de expressão gênica global viabilizam identificar o comportamento de um conjunto de genes e suas interações e, a partir dessas observações, inferir vias biológicas ativadas ou inibidas em determinada condição⁸⁴⁻⁸⁷.

A metodologia de *microarray* tornou possível o estudo de expressão gênica em larga escala de maneira eficaz, permitindo analisar simultaneamente os perfis de expressão de milhares de genes em uma situação biológica de interesse. O emprego dessa metodologia no estudo de doenças, por exemplo, tem permitido a identificação de genes com alterações em perfis de expressão, os quais estão direta ou indiretamente envolvidos na etiologia da enfermidade estudada⁸⁸.

A comparação do padrão de expressão global de indivíduos sadios e afetados pode contribuir para a identificação de vias biológicas críticas para a manifestação da patologia estudada⁸⁹. Particularmente, análises de *microarrays* representam um grande avanço metodológico para pesquisas de doenças complexas, ao permitirem o monitoramento da variação de transcriptomas inteiros.

Um dos pontos de partida para análise de expressão gênica global é definir quais tipos de tecidos e de células usar, na dependência da disponibilidade de amostra e do objetivo do estudo. Adicionalmente, análises de *microarrays* envolvem uma série de etapas, que vão desde o controle da qualidade dos *arrays* até a seleção dos genes diferencialmente expressos e posterior interpretação de suas relevâncias biológicas. Além de fornecerem assinaturas de expressão gênica, muito úteis para obter melhor conhecimento sobre mudanças na expressão de genes tecido-específicos e seu papel no desenvolvimento de doenças crônicas, análises de dados de *microarrays* também têm sido focadas na reconstrução de redes transcricionais regulatórias que refletem as interações entre moléculas de RNA. Tais redes visam encontrar e entender a interação gene-gene a partir de dados de expressão transcricional⁹⁰.

De fato, análises de redes gênicas têm fornecido novas e importantes percepções sobre mecanismos envolvidos na fisiopatologia de doenças multifatoriais, como o DM2. Recentemente, Alain Veilleux e cols.^{14,28} compararam a expressão gênica global por técnica de *microarray* de biópsias de duodeno de pacientes obesos com RI e pacientes obesos sensíveis à insulina. Essa abordagem possibilitou identificar diferenças em vias biológicas envolvidas direta ou indiretamente na regulação da homeostase glicêmica.

Análises de redes gênicas globais também podem ser úteis para elucidar mecanismos moleculares envolvidos na resposta a intervenções terapêuticas específicas. Nesse sentido, estudos de expressão gênica global por técnica de *microarray* foram conduzidos em biópsias de músculos⁸⁴ e tecido adiposo⁹¹ antes e após cirurgia de DGYR. No entanto, a literatura carece de análises de expressão gênica global do TGI de pacientes com DM2 antes e após DGYR. Sabendo-se que a regulação da expressão gênica é tecido-específica, considera-se relevante estudar a resposta transcriptômica à DGYR desse tecido-alvo para DM2, para melhor compreender sua participação na remissão pós-operatória da doença.

1.5 Hipótese e justificativa do estudo

A comunidade científica atual se preocupa com a incidência crescente da obesidade e suas comorbidades. Pacientes obesos com DM2 podem recuperar sua homeostase glicêmica após DGYR, antes que ocorra perda significativa de peso. No entanto, a remissão pós-operatória de DM2 não é universal e alguns pacientes persistem com a doença, por motivos ainda não esclarecidos.

A busca do entendimento dos mecanismos associados aos benefícios metabólicos sobre DM2 alcançados cirurgicamente tem provocado estudos com a finalidade de propor tratamentos menos invasivos para a doença. Dentre os vários mecanismos propostos, aqueles que envolvem adaptações GI em resposta às mudanças anatômicas cirúrgicas são os mais consistentes. O presente estudo foi desenvolvido para fornecer evidências clínicas que

expliquem mecanismos moleculares envolvidos na homeostase glicêmica alcançada após DGYR. Sua hipótese considerou que a melhora imediata do DM2 em pacientes obesos após DGYR inclui alterações na expressão de genes no TGI envolvidos na regulação da homeostase glicêmica.

Nessa perspectiva, a análise global de expressão gênica do tecido GI foi investigada, dada sua já reportada aplicabilidade na análise exploratória de respostas fisiológicas a fatores externos, como intervenções cirúrgicas. O conhecimento da resposta gênica global do tecido GI à DGYR, obtido no presente estudo, permitiu a identificação de consequências biomoleculares dessa intervenção cirúrgica, potencialmente relacionadas com homeostase glicêmica. Essa identificação foi feita pelo reconhecimento de alterações pós-operatórias (*versus* pré-operatórias) de padrões de expressão gênica GI exclusivas de pacientes responsivos à remissão de DM2, com foco em genes envolvidos em vias biológicas, principalmente relacionadas ao metabolismo glicídico e lipídico.

A identificação desses diferentes padrões pôde fornecer melhor entendimento de como genes gastrintestinais se comportam conjuntamente e interagem entre si em resposta à cirurgia. Isso permitiu inferir possíveis vias e sistemas centrais de desregulação da homeostase glicêmica e o potencial impacto de DGYR sobre elas. Nesse sentido, os achados podem oferecer subsídios para a identificação de alvos moleculares para o desenvolvimento futuro de novos tratamentos não invasivos para a doença.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo primário

Avaliar a resposta global do transcriptoma gastrointestinal à DGYR em pacientes responsivos à remissão pós-operatória de DM2 e sua correlação com marcadores da homeostase glicêmica.

2.2 Objetivos secundários

- Comparar o perfil transcriptômico gastrointestinal antes e após 90 dias da DGYR em pacientes responsivos (R) à remissão pós-operatória de DM2.
- Avaliar o perfil de alterações transcriptômicas gastrointestinais de pacientes responsivos (R) à remissão pós-operatória de DM2, em relação à pacientes não-responsivos (NR) à remissão da doença.
- Correlacionar marcadores transcriptômicos gastrointestinais com marcadores da homeostase glicêmica sistêmica, em pacientes responsivos à remissão pós-operatória de DM2.

3 MÉTODOS

3 MÉTODOS

3.1 Local de execução do trabalho

Trabalho realizado no Laboratório de Nutrição e Cirurgia Metabólica do Aparelho Digestivo (LIM-35) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), em parceria com a Unidade de Cirurgia Bariátrica e Metabólica (HC-FMUSP), com o Serviço de Endoscopia Gastrointestinal (HC-FMUSP), com a Universidade Nove de Julho (Uninove) e com Pennington Biomedical Research Center (PBRC) da Universidade de Louisiana – EUA (Bolsa BEPE 2014/07742-5).

3.2 Aspectos éticos

A presente investigação faz parte de projeto temático financiado pela FAPESP (2011/09612-3), aprovado pela Comissão de Ética para Análises de Projetos de Pesquisas do Hospital das Clínicas da FMUSP (CAPPesq) sob número 1011/09 (Anexo A), e registrado na Plataforma Brasil (19339913.0.0000.0068) e no www.clinicalTrials.gov (NCT01251016). O protocolo específico do presente estudo bem como seu título foram devidamente aprovados pela CAPPesq sob o número 1.851.565 (Anexo B), como desmembramento do referido projeto temático. Todos os procedimentos nele envolvidos foram conduzidos segundo as recomendações da Declaração de Helsinki, e mediante assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo C).

3.3 Delineamento do protocolo do estudo

O protocolo do presente estudo foi delineado buscando-se identificar a contribuição do TGI no efeito metabólico da DGYR sobre a homeostase glicêmica. Nesse sentido, os procedimentos nele envolvidos comparam o perfil de pacientes responsivos e não responsivos à remissão do DM2, do ponto de vista clínico, bioquímico sistêmico e transcriptômico em diferentes segmentos do TGI, em dois momentos distintos: pré-operatório e 90 dias após DGYR. Para isso, análises clínicas e bioquímicas foram desenvolvidas de forma contínua, no período pré-operatório e mensalmente até 90 dias pós-operatórios; enquanto análises transcriptômicas em diferentes segmentos do TGI foram desenvolvidas pontualmente, a partir de biópsias obtidas nos períodos pré e pós-operatório de 90 dias. Adicionalmente, todos os pacientes foram acompanhados até um ano após DGYR, para classificação dos pacientes responsivos e pacientes não responsivos à remissão de DM2. O delineamento do protocolo do estudo está resumido na Figura 3.

Figura 3 - Delineamento do protocolo do estudo com a descrição dos procedimentos gerais em seus respectivos períodos.

3.4 Casuística e critérios de seleção de pacientes

O tamanho da nossa amostra foi estimado baseado em testes paramétricos (ANOVA) e não paramétrico (Wilcoxon signed-rank teste) que calcularam uma amostra de 20 participantes, com poder de 80% para a detecção de efeitos teciduais e sistêmicos de DGYR, e um valor alfa estimado de 0,05. O tamanho do efeito foi calculado considerando a variação dos hormônios GI ser, aproximadamente, duas vezes maior no pós-operatório, em comparação com o período pré-operatório. O tamanho da amostra em si reflete o fato de o presente estudo envolver análises bioquímicas sistêmicas de marcadores da homeostase glicêmica, para correlação com dados de expressão gênica. Dada a elevada sensibilidade do método de *microarray*, uma amostra mínima de 7 pacientes tem poder de 80%, com nível de significância de 5%, para detectar diferença de 0,756 para o *fold change* de expressão gênica, considerando desvio padrão de 0,556, segundo teste de Wilcoxon.

O presente estudo, portanto, envolveu 20 mulheres candidatas à DGYR pelo Departamento de Cirurgia do Aparelho Digestivo do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), selecionadas entre fevereiro de 2011 a dezembro de 2014 de acordo com os seguintes critérios de elegibilidade: 1. Inclusão: mulheres adultas (18-60 anos); índice de massa corporal (IMC) entre 35 e 50 kg/m²; diagnóstico comprovado de DM2 (glicemia de jejum ≥ 126 mg/dL e hemoglobina glicada $\geq 6,5\%$) ou também o uso de antidiabéticos orais; 2. Exclusão – uso de insulina; presença de *Helicobacter pylori* em câmara gástrica, diagnóstico de disfunção tireoidiana: hormônio tireoestimulante (TSH) $< 0,27$ ou $> 4,2$ μ U/mL; triiodotironina (T3) < 80 ou > 200 ng/dL; tiroxina (T4) $< 5,1$ ou $> 14,1$ μ g/dL; presença de disfunção hepática grave: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e gama-glutamilttransferase (Gama-GT) com valores superiores a três vezes o valor de referência pela Divisão de Laboratório Central do HC-FMUSP, conforme descrito a seguir – ALT e AST > 93 U/L e Gama-GT > 108 U/L; participação atual ou recente em outro

protocolo do estudo intervencionista; recusa em participar do estudo e/ou em assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

3.5 Procedimento cirúrgico

Todas as pacientes foram submetidas à técnica cirúrgica de derivação gástrica em Y de Roux (DGYR) por meio de laparotomia, realizada na Unidade de Cirurgia Bariátrica e Metabólica (HC-FMUSP). A técnica de DGYR reduz o volume do estômago ao realizar uma bolsa gástrica proximal com aproximadamente, 30 mL de capacidade total, e exclui o restante do estômago, duodeno e parte do jejuno proximal do fluxo de nutrientes (Figura 4). Conforme o presente protocolo, os tamanhos das alças intestinais foram padronizados e conferidos em cada uma das intervenções cirúrgicas: alça biliopancreática de 50-60 cm e alça alimentar de 100-120 cm.

A reconstrução do trânsito alimentar ocorre pela prática de anastomose gastrojejunal término-lateral entre a bolsa gástrica e o jejuno. Pratica-se a secção do jejuno proximal ou médio, medido a partir de 50 a 100 cm do ângulo de Treitz. A porção distal do jejuno é levada ao novo reservatório gástrico (anastomose gastrojejunal), e o trânsito alimentar passa a ser restaurado pela alça alimentar. A outra porção proximal que se encontra excluída do trânsito alimentar (estômago, duodeno e jejuno proximal) é anastomosada na alça jejunal que originou a anastomose gastrojejunal em uma região, aproximadamente, a 120 cm abaixo desta e, com isso, restaura-se o trânsito biliodigestivo formando-se a alça biliopancreática. Esta enteroanastomose (Y de Roux – Figura 4) marca o ponto de convergência entre as duas alças intestinais, em que o alimento que vem pela alça intestinal alimentar encontra-se com as secreções biliodigestivas que vem da alça biliopancreática. A partir dessa junção, denominada alça intestinal comum, há maior absorção de nutrientes no restante do intestino distal.

Figura 4 – Mudanças anatômicas induzidas pela DGYR: **(a)** anatomia normal do trato gastrointestinal; **(b)** anatomia gastrointestinal alterada após DGYR.

3.6 Critério de classificação de pacientes responsivos e não responsivos à remissão pós-operatória de DM2

Após um ano da DGYR, utilizou-se o critério da ADA para classificar as 20 pacientes do presente estudo em dois grupos distintos: grupo responsivo (R) e não responsivo (NR) à remissão do DM2. Pacientes do grupo R apresentaram remissão completa do DM2 [HbA1c <6% e glicemia de jejum (GJ) <100 mg/dL], enquanto os pacientes do grupo NR apresentaram remissão parcial da doença [HbA1c <6,5% e GJ entre 100-125 mg/dL], em ambos os casos na ausência de antidiabético oral ou outros procedimentos por, pelo menos, um ano³⁵.

3.7 Acompanhamento clínico ambulatorial

Todas as pacientes foram acompanhadas no pré-operatório e, mensalmente, até 90 dias da DGYR. O peso corporal atual foi aferido em quilogramas (kg), utilizando-se balança eletrônica para indivíduos obesos,

com carga máxima 500 kg e divisão 100 gramas (Lucastec®, Brasil). Durante este procedimento, as pacientes vestiram apenas roupas leves. Para o cálculo de IMC, pela fórmula peso (kg)/altura (m)², a altura corporal foi medida com auxílio de estadiômetro (Sanny®, American Medical do Brasil). Durante o procedimento, as pacientes mantiveram-se de pé, com os pés descalços, calcanhares juntos, costas eretas e os braços estendidos ao lado do corpo. Foram colhidas informações de ingestão de medicamentos (períodos pré-operatório e pós-operatório 30, 60 e 90 dias) e de ingestão alimentar por meio registro alimentar durante 7 dias consecutivos (incluindo um final de semana), no pré e pós-operatório de 90 dias. As informações contidas nos registros alimentares foram processadas por meio do *software* Virtual Nutri Plus®, e forneceram os dados de ingestão de energia e macronutrientes (carboidratos, proteínas, gordura total e frações, e fibras). Dados de idade (em anos), cor (brancos e pretos, classificados de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, IBGE), tempo de obesidade (em anos) e tempo de DM2 (<5 anos de DM2 e ≥5 anos de DM2) também foram registrados.

3.7.1 Avaliação bioquímica

Marcadores bioquímicos da homeostase glicêmica foram mensurados após a suspensão prévia do uso de todos os medicamentos orais (com exceção dos anti-hipertensivos), por período superior à sua meia-vida (3-5 dias). Essas mensurações foram feitas em condições de jejum (12 h) e frente a teste de alimentação.

Em condições de jejum, concentrações de glicose, insulina, peptídeo C e perfil lipídico: colesterol total, LDL-colesterol, VLDL-colesterol, HDL-colesterol e triglicérides (TG), foram mensuradas em amostras de plasma ou soro colhidas no período pré-operatório e mensalmente no período pós-operatório até 90 dias da DGYR, com exceção do HbA1c, que foi mensurado somente nos períodos pré-operatório e após 90 dias de cirurgia. Adicionalmente, valores de glicemia e insulina de jejum foram utilizados para

cálculo da sensibilidade à insulina por meio da fórmula de QUICKI: $[QUICKI = 1 \div (\text{Log insulina} + \text{Log glicemia})]$, sendo o nível de insulina em μU (microunidades)/mL e o de glicose em mg/dL]⁹².

O teste de alimentação foi realizado para análise ao longo do tempo de glicose e insulina séricas, e de glucagon e hormônios GI plasmáticos (grelina, GLP-1, GIP, PYY), nos períodos pré-operatório e após 90 dias de cirurgia. Este teste consistiu na coleta sequencial de amostras de sangue, em condições de jejum e após 30, 60, 90 e 120 m da ingestão oral de 200 ml de uma dieta padrão nutricionalmente completa (Ensure™, Abbott, EUA). Trata-se de dieta hipercalórica (300 kcal), hiperproteica (16,7%), normolipídica (29,5%), e normoglicídica (53,8%). Especificamente, para a análise de hormônios GI e glucagon, as amostras de plasma foram tratadas com inibidor de protease no momento da coleta (Complete™ Mini, EDTA-free, Roche LifeScience, EUA), centrifugadas (2.800 rpm a 4°C), aliquotadas em microtubos (500 μl), e armazenadas a -80°C até sua mensuração.

Todas as dosagens de glicose, HbA1c, insulina, peptídeo C e perfil lipídico foram realizadas na Divisão de Laboratório Central do HC-FMUSP por método enzimático (glicose e perfil lipídico), cromatografia líquida (HbA1c) e eletroquimioluminescência (insulina e peptídeo-C). Os hormônios GI e glucagon foram analisados por técnica de Multiplex™ (Merck Millipore, EUA), em duplicata biológica.

3.7.2 Análise estatística dos dados clínicos e bioquímicos

A análise estatística de dados clínicos e bioquímicos foi feita por testes não paramétricos, com uso do *software* R na versão 3.3.0 (www.r-project.org), considerando-se nível de significância de 5%. Variáveis contínuas foram sintetizadas em mediana (mínimo-máximo) quando a distribuição foi assimétrica. As medidas descritivas mediana, mínimo, máximo e amplitude interquartil (IQ) foram consideradas para resumir as variáveis quantitativas. As variáveis qualitativas foram expressas por meio das frequências absolutas

e relativas (%). Os gráficos de perfis medianos com intervalo com 95% de confiança para mediana e boxplot foram construídos para as variáveis de interesse para os grupos ao longo dos períodos estudados⁹³.

Para variáveis contínuas, a diferença entre os grupos foi testada com uso do teste *Mann-Whitney* (variáveis assimétricas e/ou heterogeneidade das variâncias). O teste exato de *Fisher* foi utilizado para avaliar a associação entre grupo (responsivos e não responsivos à remissão de DM2) e as variáveis qualitativas⁹³. A comparação dos grupos em relação à idade e à comparação transversal dos grupos em relação às variáveis quantitativas foram realizadas pelo teste de *Mann-Whitney*⁹⁴.

Para a análise dos grupos de pacientes responsivos e não responsivos à remissão de DM2, foi utilizado teste não paramétrico para medidas repetidas. Nesta análise, realizou-se a comparação dos grupos (efeito entre indivíduos), comparação dos períodos estudados (efeito intraindivíduos) e a interação entre esses dois efeitos. Para a análise dos períodos em cada grupo (análise estratificada), foi utilizada a análise não paramétrica para medidas repetidas de um fator (períodos)^{95,96}.

Para avaliar o uso das medicações e comparar as proporções de uso, nos períodos pós-operatórios em relação ao período pré-operatório e também em relação ao momento imediatamente anterior, foram realizados testes de *McNemar*⁹⁴. A área sob a curva (AUC) de cada paciente do teste de alimentação foi calculada por meio da regra do trapézio.

3.8 Análises transcriptômicas do tecido gastrointestinal

As análises transcriptômicas gastrintestinais foram realizadas por técnica de *microarray* (seguida de validação de genes diferencialmente expressos de interesse), a partir de RNA obtido de biópsias de estômago, duodeno, jejuno e íleo coletadas antes (aproximadamente uma semana) e após 90 dias da DGYR.

3.8.1 Obtenção de biópsias gastrintestinais

No presente estudo, as biópsias gastrintestinais foram obtidas por meio de exame de enteroscopia de duplo balão (EDB), realizado no Serviço de Endoscopia Gastrointestinal (HC-FMUSP). Todas as pacientes compareceram para o referido exame em jejum de 12 horas e sem uso prévio de qualquer medicação oral (exceto para hipertensão arterial), por 3-5 dias ou por até 7 dias, na dependência do uso específico de anticoagulantes.

Inicialmente, a paciente foi colocada na posição de decúbito lateral sob sedação profunda endovenosa com uso de fentanil na dose de 1 µg/kg (Fentanest®, Cristália, SP-Brasil), cinco minutos antes da indução da anestesia. O exame foi realizado sob oxigênio suplementar ministrado por cateter nasal (2 litros de O₂/min). Para anestesia, foi aplicado protocolo específico padronizado pela instituição, para indivíduos obesos, conforme descrito a seguir: 2 µg/kg/h de dexmedetomidina (Precedex®, Hospira, IL-EUA) foi administrado via endovenosa 15 m antes do início do procedimento de EDB. Posteriormente, a quantidade de dexmedetomidina foi reduzida para 0,4 µg/kg/hora seguida, se necessário, por aplicação de propofol (Diprivan®, Astrazenica, SP-Brasil) na dose de 70-100 µg/kg/ minuto. A quantidade de drogas para sedação profunda e procedimentos anestésicos foi calculada com base no peso ideal corrigido (peso ideal mais 30% da diferença do peso real e peso ideal) nos exames pré-operatórios e apenas com base no peso real nos exames pós-operatórios. Durante todo o exame de EDB, os pacientes foram monitorizados continuamente por eletrocardiograma, oxímetro de pulso e avaliação da pressão arterial. As anestесias foram conduzidas pelo anestesista Dr. Ismael Francisco Mota de Siqueira Guarda.

Após atingir-se o nível desejado de anestesia, o enteroscópio de duplo-balão (modelo EN-450T5, Fujifilm Corporation™, Tokyo-Japão) foi inserido por via oral (anterógrada) e introduzido ao longo do TGI (incluindo o estômago excluso, no pós-operatório, Figura 5)⁹⁷. O uso de tubo flexível (overtube modelo TS-13140, Fujifilm Corporation™, Tokyo-Japão) com dois balões acoplados, e sequencialmente insuflados e esvaziados, permitiu que o

enteroscópio progredisse ao longo do intestino delgado. No período pré-operatório, foram coletadas biópsias de mucosa gastrointestinal (aproximadamente, 15-20 mg) do estômago corpo alto (ECA), estômago corpo médio (ECM), duodeno, jejuno e íleo. Todas as biópsias foram imediatamente armazenadas, inicialmente, em nitrogênio líquido e, posteriormente, em freezer -80°C (REVCO™, Thermo Scientific Inc., MA-EUA). Os locais de coleta das biópsias intestinais foram marcados por tinta nanquim SPOT™, o que permitiu a visualização pós-operatória desse marcador e, assim, coletar biópsias próximas aos mesmos locais dos exames pós-operatórios (Figura 5).

Figura 5 – Marcação da mucosa intestinal com tinta nanquim durante o exame pré-operatório.

No pós-operatório da DGYR, o enteroscópio percorreu todo o TGI até a enteroanastomose. Nesse momento, o enteroscópio foi guiado para os segmentos excluídos, em que foram coletadas biópsias de duodeno médio, próximo à marcação da tinta nanquim realizada no pré-operatório (Figura 6-A) e, em seguida, quando possível, do estômago excluído – ECM (Figura 6-B). Durante o retorno do enteroscópio dos segmentos excluídos, o aparelho foi guiado para a alça comum, em que foram coletadas amostras de jejuno distal/íleo proximal (local correspondente à marcação da tinta nanquim no pré-operatório), conforme Figura 6-C. Após essa coleta, o enteroscópio é removido gradativamente a partir da porção distal do TGI médio, sendo efetuadas as biópsias na região da alça alimentar (jejuno médio, próximo à região marcada no pré-operatório com tinta nanquim) – Figura 6-D.

Finalmente chegou-se ao estômago remanescente (ECA), em que foram coletadas amostras desse último segmento (Figura 6-E).

Figura 6 - Trajeto percorrido pelo enteroscópio no pós-operatório da DGYR: A) duodeno excluído (local em que coletamos amostras de duodeno médio); B) estômago excluído (local que coletamos ECM); C) local no qual coletamos amostras de íleo, durante o retorno do enteroscópio; D) alça alimentar (local em que coletamos amostras de jejuno médio); E) estômago remanescente ou estômago corpo alto – ECA (local em que coletamos amostras de ECA). Figura adaptada de Kuga R – tese de mestrado, 2007¹¹³.

Para identificação dos segmentos intestinais, foram consideradas as características macroscópicas de cada região e a extensão percorrida com o enteroscópio. Todos os exames foram conduzidos pelo mesmo endoscopista (Dr. Robson Kiyoshi Ishida), o que garantiu o seguimento de um padrão de avaliação baseado na experiência do profissional. A distinção entre o ECA e o ECM se deu a partir da linha Z (transição do esôfago e estômago), sendo amostras de ECA coletada na parte superior do estômago, próximas à linha Z (cárdia), e amostras de ECM na curvatura maior do estômago, entre o cárdia e a incisura angular. O duodeno, primeira porção do intestino delgado após o canal pilórico, possui entre 25 a 38 cm de comprimento e representa a parte

mais curta do intestino delgado. As biópsias de duodeno no pré-operatório foram realizadas no duodeno médio, entre a segunda e terceira porção. O jejuno possui um número abundante de pregas de *Kerckring* (estruturas anatômicas circulares que atuam aumentando a superfície de contato para absorção de nutrientes), possui uma vascularização abundante e mucosa avermelhada, parede mais espessa e alça mais fixa, tendo cerca de 2,5 metros de comprimento e um calibre de 2 a 4 centímetros. As biópsias de jejuno foram realizadas no jejuno médio, no mínimo, 1,5 metro do ângulo de Treitz, correspondente a, aproximadamente, 50 cm da anastomose gastrojejunal no pós-operatório da DGYR. O íleo foi identificado por sua menor espessura e vascularização (que lhe confere uma mucosa mais clara e lisa) e sua riqueza em nódulos linfoides (placas de Peyer)⁹⁸. As biópsias foram realizadas na região entre o jejuno distal e íleo proximal, aproximadamente, 50 cm da enteroanastomose até o limite máximo do aparelho, o que representa a alça comum após DGYR.

3.8.2 Extração do RNA, quantificação e avaliação da sua integridade

Experimentos com RNA requerem controle rígido da quantidade e integridade do material para a obtenção de dados significativos de expressão gênica. A integridade do RNA da amostra depende muito do tipo de tecido analisado e do seu método de extração. O tecido GI contém grande quantidade de enzimas digestivas e micro-organismos que podem prejudicar a integridade do RNA^{99,100,101}. Assim, tivemos o cuidado de realizar dois estudos-piloto prévios: 1) Estudo-Piloto 1 – determinou o número de biópsias necessárias para obtenção de RNA de boa quantidade e qualidade, suficientes para as análises de expressão gênica pelas técnicas de *microarray* e para a validação dos genes de interesse por reação de transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia de polimerase quantitativa (RT-qPCR), ao comparar a quantidade de RNA total obtida a partir de 5, 10, 15 e 20 biópsias intestinais; 2) Estudo-Piloto 2 – avaliou diferentes métodos de

extração de RNA em biópsias intestinais para escolha do método que mantém a melhor integridade do material. Usamos diferentes métodos de extração [Trizol (Invitrogen™, EUA) e posterior purificação com o RNeasy Mini Kit (Qiagen™, Germany) vs extração e purificação com o Kit RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen™, Germany)], para a escolha daquele mais adequado para obter-se RNA de boa qualidade e o mais íntegro possível. Em adição, comparamos amostras teciduais GI congeladas vs amostras armazenadas em produto para estabilização do RNA, o RNAlater (Ambion™, EUA), para identificação do método de armazenamento mais adequado. Detalhes dos respectivos estudos-piloto encontram-se nos Anexos D e E.

Orientados pelos resultados dos dois estudos-piloto, coletamos, aproximadamente, 15-20 mg de biópsias gastrintestinais que foram armazenadas por congelamento a -80°C e, posteriormente, submetidas à extração e purificação de RNA total, com o Kit RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen®, EUA). A concentração de RNA total obtido em cada amostra foi mensurada pela leitura de sua absorbância, nos comprimentos de onda de 260 e 280 nM, por meio do uso de espectrofotômetro NanoDrop (ND-1000™ Spectrophotometer, NanoDrop Technologies, EUA); enquanto a pureza desse RNA foi avaliada pela razão 260/280. Apenas amostras com valores dessa razão entre 1.8 e 2.0⁹⁹ foram consideradas para estudo.

A análise da integridade do RNA foi averiguada por meio do aparelho de eletroforese em nanochips, Bionalyzer (Modelo 2100; Agilent Technologies™, CA, EUA), no laboratório Molecular Core (AFIP). A qualidade das amostras foi identificada a partir do RIN (*RNA Integrity Number*) gerado pelo aparelho, que pode variar de 0 a 10, em ordem crescente de integridade. Para análise de expressão gênica pela técnica de *microarray*, apenas amostras com RIN ≥ 7 foram estudadas, conforme recomendado pelo seu fabricante (GeneChip 1.0 ST Array - Affymetrix™, EUA).

3.9 Análise de expressão gênica global - *microarray*

A análise de expressão gênica global por *microarray* foi feita a partir de 100 ng/μL do RNA obtido em cada segmento gastrintestinal e em cada período pré e pós-operatório estudado. A técnica foi desenvolvida com uso de Genechip 1.0 ST Array (Affymetrix™, EUA), um chip com sequência de oligonucleotídeos representativos de, aproximadamente, 28.869 transcritos humanos¹⁰², de acordo com as recomendações de seu fabricante. Brevemente, cada experimento de *microarray* consistiu de 4 etapas principais: (1) extração de RNA da amostra biológica seguido de síntese de cDNA para amplificação; (2) hibridização dos ácidos nucleicos, marcação com fluoróforo (biotina); (3) detecção do sinal e visualização dos dados, e (4) processamento e análise dos dados. Os passos técnicos encontram-se descritos em detalhes no manual do fabricante e em dissertação de mestrado realizado em nosso laboratório (Figura 7)^{102,103}.

Figura 7 - Resumo das quatro principais etapas do *microarray*

A análise de *microarray* foi realizada no laboratório Molecular Core (AFIP), em plataforma Affymetrix GeneChip Fluidics Station 450™. A análise de dados foi feita com uso do *software* Affymetrix Expression Console™. Para evitar degradação de amostras, a técnica de *microarray* foi realizada, anualmente, em três remessas.

3.9.1 Normalização dos dados, análise estatística e funcional

A qualidade dos arrays foi verificada com a análise estatística multivariada de componente principal (PCA), para simplificação do conjunto de dados e identificação de padrões predominantes de expressão, e prever a tendência de separação entre as amostras pré e pós-operatórias. Os valores de expressão foram obtidos com o método RMA (*Robust Multi-array Average*) de pré-processamento de dados¹⁰⁴. O método ComBat (<http://jlab.byu.edu/ComBat/Abstract.html>) foi aplicado para remoção de possíveis vieses (efeito de *batch*) causados pelas diferentes remessas em que os microarrays foram processados¹⁰⁵. Todas essas ferramentas estão disponíveis no programa R/Bioconductor (<http://www.bioconductor.org/>).

O método não paramétrico RP (*Rank Products*)¹⁰⁶ foi utilizado para a seleção dos genes diferencialmente expressos (DEGs, do Inglês *Differentially Expressed Genes*). Esse método é baseado em *ranking*, isto significa que, dado dois grupos de amostras, ele decide se um gene é ou não diferencialmente expresso se este gene ficou bem "ranqueado" na maioria das amostras, sem levar em conta a variabilidade entre elas. O RP foi aplicado seguindo um desenho de análise pareada, valor de $p < 0,05$ e correção por FDR (*False Discovery Rate*)¹⁰⁷.

Para direcionar os resultados de genômica global para o objetivo do presente estudo, os resultados estatísticos dos DEGs identificados por RP, obtidos pelo programa R Bioconductor, foram, inicialmente, submetidos ao programa *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA, Qiagen).

A partir da lista de funções na base "Disease&Biofunctions" do programa IPA, foram selecionadas 5 funções de interesse, em termos de relevância na fisiopatologia do DM2: 1) Metabolismo dos Carboidratos; 2) Metabolismo Lipídico; 3) Metabolismo dos Aminoácidos; 4) Doenças Metabólicas e 5) Desordem do Sistema Endócrino. Os genes relacionados a essas cinco funções foram submetidos a análises de agrupamento hierárquico, classificação funcional de ontologia gênica e análise de enriquecimento funcional.

O agrupamento hierárquico de DEGs foi feito com medida de distância por correlação de *Pearson* e o método de associação por média (*average linkage clustering*), utilizando o *software* JMP versão 8 (SAS Institute Inc. SAS Campus Drive, Cary, NC, EUA)

Para a classificação funcional de ontologia gênica, os conjuntos de DEGs das 5 funções previamente escolhidas foram classificados por função molecular, processo biológico e componente celular, em subconjuntos de termos GO de alto nível (*GOslim ontology*), pelo banco de dados *GOslim*¹⁰⁸. Essa análise foi realizada em cada segmento gastrointestinal, utilizando o *software* WEB-based Gene seT AnaLysis Toolkit (WebGestalt)¹⁰⁹. A análise estatística para a identificação de categorias GO enriquecidas foi realizada a partir da seleção de um conjunto de genes de referência, a partir do “genoma homo sapiens” fornecido no WebGestalt. Este programa utiliza o teste hipergeométrico para avaliar o enriquecimento categórico e, como múltiplas categorias são testadas ao mesmo tempo, os valores de p são ajustados conforme o método de ajuste de testes múltiplos proposto por *Benjamini e Hochberg* (1995)¹¹⁰. O número mínimo de dois genes foi estabelecido como ponto de corte para que uma categoria fosse considerada. Foram consideradas enriquecidas as dez categorias com maior significância para cada termo do GO.

Para a realização de enriquecimento funcional, utilizou-se o *software* DAVID (do Inglês, *Database for Annotarion, Visualization, and Integrated Discovery*), disponível *on-line*. Essa análise permitiu identificar processos biológicos e vias representadas por DEGs¹¹¹. Foram selecionadas somente categorias dos bancos internos Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) e Biocarta. Uma categoria foi considerada significativa caso tivesse, no mínimo, dois genes e um *score* $\leq 0,05$, fornecido pelo teste exato de Fisher com correção de Benjamin-Hochberg¹¹⁰.

Uma abordagem adicional para identificar vias metabólicas suprarrepresentadas e redes gênicas foi realizada, utilizando-se o programa IPA (QIAGENTM, <http://www.ingenuity.com>) para análise de vias canônicas e redes de interação. Esse programa permitiu explorar mecanismos, vias e

funções nos quais os DEGs participavam, a partir de relações estabelecidas entre genes, compreendidas no *Ingenuity Pathways Knowledge Base* (IPKB). No IPKB, as informações são manualmente curadas, a partir da literatura científica, e modeladas, de forma a ajudar na compreensão e interpretação do significado biológico dos dados (<http://www.ingenuity.com/products/ipa>).

O programa IPA é uma ferramenta comercial que, assim como o DAVID, também utiliza o teste exato de Fisher com correção de Benjamin-Hochberg¹⁰⁷. Foram também selecionadas as vias biológicas potencialmente relacionadas com a fisiopatologia do DM2, pela análise de vias canônicas e análise de predição de reguladores *upstream* pelo programa IPA, considerando interações experimentalmente comprovadas indiretas e diretas descritas em mamíferos.

Todas essas ferramentas estatísticas se complementaram na identificação de potenciais vias em que os DEGs dos diferentes segmentos gastrintestinais poderiam estar envolvidos. Essas análises foram feitas separadamente em pacientes dos grupos R e NR. No entanto, como o foco do presente estudo é correlacioná-las com remissão de DM2, apenas vias identificadas por essas ferramentas como alteradas nos pacientes do grupo R, mas não nos pacientes do grupo NR, foram exploradas nos seus resultados.

3.10 Validação dos genes diferencialmente expressos de interesse por RT-qPCR

Os genes GI, de interesse, encontrados nos resultados do *microarray*, foram validados pela técnica de RT-qPCR. A partir de 1 µg de RNA, obtido das amostras dos segmentos GI de interesse, procedeu-se síntese e purificação de cDNA (DNA complementar), utilizando o kit comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription™ Kits com inibidor de RNase (Applied Biosystems, EUA). A RT-qPCR foi feita em duplicata biológica, usando o sistema de ensaio Taqman™ (Applied Biosystems, EUA) e equipamento 7500 Fast™ Real-Time PCR (Life Technologies, EUA), para leitura. Beta-actina

(ACTB) foi utilizada como controle endógeno, conforme determinado por estudo-piloto prévio conduzido em amostras gastrintestinais de 5 pacientes e que também testou 18S, GAPDH (*Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) e B2M (beta 2 microglobulina) pelo software Expression Suíte™ (Applied Biosystems, EUA). Detalhes do respectivo estudo-piloto encontram-se no Anexo F.

3.11 Correlação de dados clínicos e bioquímicos com dados transcriptômicos

O coeficiente de correlação de *Spearman*¹¹⁰ foi aplicado para quantificar a correlação entre variáveis clínicas e bioquímicas com cada variável transcriptômica do duodeno, jejuno e íleo relacionadas às 5 funções de interesse descritas no item 3.9.1.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Características descritivas da amostra

Das 20 pacientes estudadas, 12 (60%) apresentaram remissão total (grupo R) e 8 (40%) remissão parcial de DM2 (grupo NR) após um ano da DGYR. As características descritivas dos grupos encontram-se na Tabela 1. Ambos os grupos foram similares entre si quanto à idade, à cor/raça, ao tempo de obesidade e ao tempo de DM2 ($p \geq 0,057$).

Tabela 1 – Características descritivas das 20 pacientes da amostra, separadas por grupos responsivo e não responsivo à remissão de DM2.

	GRUPOS		Valor p
	Responsivo (n=12)	Não Responsivo (n=8)	
Idade (anos)	49,00 (42-59)	43,50 (33-52)	0,057*
Cor^Δ (n, %)			
Branços	6 (50%)	6 (75%)	0,125**
Negros	6 (50%)	2 (25%)	
Tempo de Obesidade (anos)	24,00 (3-51)	23,00 (12-35)	0,851*
DM2 < 5 anos	6 (50%)	4 (50%)	0,999**
DM2 ≥ 5 anos	6 (50%)	4 (50%)	

^Δ Conforme sistema de classificação adotado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e estatística (IBGE)¹³⁹; *Teste Mann-Whitney - valores apresentados como mediana (mínimo – máximo); **Teste exato de Fisher.

4.2 Características clínicas dos grupos R e NR antes e após derivação gástrica em Y de Roux

Peso e IMC

No período pré-operatório, ambos R e NR apresentaram valores de peso corporal e IMC similares entre si ($p \geq 0,457$). Diferenças estatísticas dessas variáveis foram observadas somente entre períodos. Após 90 dias de DGYR, ambos os grupos apresentaram diminuição de peso corporal e IMC ($p < 0,001$), e essa diminuição foi similar entre R e NR, sem diferença significativa entre

os grupos ($p \geq 0,457$). Os dados utilizados nessas análises encontram-se resumidos na Tabela 2.

Tabela 2 – Dados de peso e IMC antes e após 90 dias da DGYR das 20 pacientes da amostra, separadas por grupos responsivo e não responsivo à remissão de DM2.

Varável Clínica	GRUPO RESPONSIVO (R)		GRUPO NÃO RESPONSIVO (NR)	
	Pré-Op. (n=12)	Pós-Op. 90 dias (n=12)	Pré-Op. (n=8)	Pós-Op. 90 dias (n=8)
Peso Corporal (kg)	113,2 (83,5-143,6)	90,35 (68,2-113,7)	119,5 (97,6-135,2)	99,75 (80,3-114)
IMC (kg/m²)	46,42 (37,11-7,52)	38,54 (30,31-45,55)	46,22 (37,65-53,54)	38,21 (30,98-42,19)

Valores apresentados como mediana (mínimo – máximo).

Legenda: R – responsivo; NR – não responsivo; Pré-Op. – pré operatório; Pós-Op. – pós-operatório; IMC – índice de massa corporal.

No acompanhamento clínico, observamos que a redução do peso e IMC foram igualmente significativos ($p < 0,001$) em ambos os grupos durante todos os períodos pós-operatórios estudados (Gráfico 1). Os detalhes das medidas de peso e IMC nos 4 períodos avaliados (pré, 30, 60 e 90 dias) e o teste de comparação de períodos e grupos encontram-se detalhados no Anexo G.

Gráfico 1 – Perfis medianos de peso corporal e IMC antes e após 30, 60 e 90 dias da DGYR das 20 pacientes da amostra, separadas por grupos responsivo e não responsivo à remissão de DM2.

Legenda: ‡ Mediana significativamente diferente do valor pré-operatório ($p < 0,001$); † Mediana significativamente diferente da mediana do momento anterior ($p < 0,001$).

Tratamento Medicamentoso:

No período pré-operatório, os pacientes fizeram uso de 4 classes distintas de medicamentos para controle de DM2: sulfonilureias (glibenclamida e gliclazida), inibidores de alfa-glucosidase (acarbose), biguanidas (metformina) e gliptinas/inibidores de DPP-4 (sitagliptina), totalizando 5 diferentes tipos de medicamentos. Destes, 3 foram descontinuados no pós-operatório por ambos os grupos (acarbose, gliclazida

e sitagliptina) e 2 tiveram seu uso mantido no pós-operatório (metformina e glibenclamida) por, pelo menos, um paciente, conforme descrito a seguir.

Uso de medicamentos para DM2 no período pré-operatório:

Entre os medicamentos para controle do DM2 que foram usados exclusivamente no período pré-operatório, ou seja, que foram descontinuados já na alta hospitalar em ambos os grupos, destacaram-se acarbose, gliclazida e sitagliptina. O número de pacientes que faziam uso desses medicamentos no pré-operatório foi maior no grupo R, em comparação com o grupo NR; entretanto, a dosagem de acarbose e gliclazida foi maior nos pacientes do grupo NR, do que pacientes do grupo R (Tabela 3). As medidas descritivas das medicações que foram utilizadas apenas no período pré-operatório (incluindo medicamentos para outras comorbidades) encontram-se no Anexo H.

Tabela 3 – Medicamentos para tratamento do DM2 de uso exclusivos no período pré-operatório.

	GRUPOS			
	N (%)	Responsivo	N (%)	Não Responsivo
Acarbose (mg/dia) Pré-Op.	2 (16,67%)	200 (100-300)*	1 (12,5%)	600 (600-600)*
Gliclazida (mg/dia) Pré-Op.	5 (41,67%)	60 (30-90)*	2 (25%)	200 (80-320)*
Sitagliptina (mg/dia) Pré-Op.	1 (8,33%)	200 (200-200)*	0 (0%)	

* valores apresentados como mediana (mínimo – máximo); %: frequência relativa; Teste McNemar. Legenda: mg – miligramas; Pré-Op. – pré-operatório.

O número de pacientes em tratamento com metformina no pré-operatório foi maior no grupo R em relação ao grupo NR [10 pacientes (83,3%) vs 6 pacientes (75%)], e a dosagem empregada desse medicamento foi semelhante entre ambos os grupos ($p > 0,05$), com mediana de 2.550 mg/dia conforme tabela descritiva no Anexo I. A frequência relativa do uso de glibenclamida no pré-operatório foi menor no grupo R (4 pacientes, 33,33%) em comparação ao grupo NR (3 pacientes, 37,50%).

Uso de medicamentos para tratamento de DM2 no período pós-operatório:

Pacientes do grupo R descontinuaram o uso de todos os medicamentos para DM2 já na alta hospitalar de DGYR e não voltaram a fazer uso de nenhum deles durante o primeiro ano de cirurgia (em atendimento ao critério da ADA). O mesmo não ocorreu no grupo NR, no qual duas pacientes (25%) continuaram o uso de metformina até 30 dias pós-operatórios e uma delas continuou com o uso de metformina até os 90 dias após DGYR. Dessa forma, o grupo NR não apresentou redução significativa do uso desse medicamento ($p \geq 0,063$) após 90 dias da DGYR (Gráfico 2).

Gráfico 2 – Representação em frequência de pacientes em uso de biguanidas (metformina) antes e após 30, 60 e 90 dias da DGYR.

Em relação à glibenclamida, todos os pacientes de ambos os grupos descontinuaram o uso desse medicamento até os 60 dias de pós-operatório ($p > 0,100$). Uma paciente do grupo NR (a mesma paciente que fez uso contínuo de metformina no pós-operatório) voltou, entretanto, a fazer uso de glibenclamida após 90 dias de cirurgia.

Os detalhes das análises de medicações que foram usadas no período pré-operatório e, pelo menos, um período pós-operatório (30 dias, 60 dias e

90 dias), incluindo medicações não relacionadas com tratamento de DM2, encontram-se nos Anexos H e I.

Consumo de energia e macronutrientes

O consumo de calorias e de todos os macronutrientes diminuiu significativamente em ambos os grupos ($p \leq 0,005$) após 90 dias de DGYR. Essa diminuição foi similar entre R e NR ($p \geq 0,20$). Os detalhes da análise descritiva e estatística encontra-se no Anexo J.

4.3 Mudanças das variáveis bioquímicas associadas ao metabolismo de carboidratos, lipídeos e hormônios gastrintestinais em condições de jejum e perante teste de alimentação

Em relação às variáveis bioquímicas em jejum, pacientes de ambos os grupos R e NR apresentaram diminuição significativa das concentrações séricas de colesterol total ($p < 0,006$), LDL-c ($p < 0,026$), VLDL-c ($p < 0,022$) e triglicérides ($p < 0,028$) e concentrações plasmáticas de glicose e HbA1c ($p < 0,001$) no período pós-operatório, em relação ao pré-operatório. Embora houve redução significativa de HDL-c em ambos ($p < 0,023$), observa-se que aos 90 dias, os pacientes do grupo R apresentou aumento nas concentrações dessa lipoproteína, quase que igualando aos seus valores pré-operatório (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Concentrações séricas de HDL-c em condições de jejum no pré-operatório e mensalmente até 90 dias da DGYR.

No entanto, apenas pacientes do grupo R apresentaram diminuição significativa das concentrações de insulina e peptídeo C (Gráfico 4) no pós-operatório, em relação ao pré-operatório [$p < 0,001$ vs. $p = 0,395$ (NR) e $p < 0,001$ vs. $p = 0,314$ (NR), respectivamente].

Gráfico 4 – Concentrações séricas de insulina e peptídeo C em condições de jejum no pré-operatório e mensalmente até 90 dias da DGYR.

Adicionalmente, a análise entre períodos das variáveis bioquímicas que diminuíram similarmente entre os grupos mostrou que a diminuição da glicose nos pacientes do grupo R ocorreu em todos os períodos pós-operatórios estudados, em relação ao pré-operatório e a cada período pós-operatório

anterior estudado (60 vs. 30 dias e 90 vs. 60 dias). O mesmo não ocorreu nos pacientes do grupo NR, que apresentaram diminuição significativa da glicose somente até os 60 dias pós-operatórios. As concentrações plasmáticas de HbA1c no pós-operatório de 90 dias da DGYR mostrou-se diminuída significativamente em ambos os grupos ($p < 0,001$) (Gráfico 5).

Gráfico 5 – Concentrações plasmáticas de glicose e HbA1c em condições de jejum antes e após DGYR.

A análise entre períodos mostrou ainda que, em relação ao pré-operatório, a diminuição de colesterol total foi significativa em ambos os grupos aos 60 e 90 dias pós-operatórios; mas apenas nos pacientes do grupo R essa diminuição foi significativa entre esses períodos. Em relação ao pré-operatório, a diminuição de LDL-c foi significativa em ambos os grupos nos 90 dias pós-operatórios; entretanto, apenas pacientes do grupo R apresentaram diminuição significativa dessa variável entre 60 e 90 dias de DGYR. A diminuição de VLDL-c teve comportamento similar entre os grupos R e NR, sendo significativa nos 90 dias pós-operatórios, em relação ao pré-operatório; e entre os períodos de 30 e 60 dias após a cirurgia. Finalmente, em relação ao pré-operatório, a diminuição dos TG após 90 dias da DGYR foi significativa somente em pacientes do grupo R ($p = 0,014$), e ambos os grupos R e NR apresentaram diminuição significativa de TG aos 60 dias de pós-operatório, em relação aos 30 dias de pós-operatórios.

O índice QUICKI apresentou aumento significativo ($p < 0.05$) em ambos os grupos após 90 dias da DGYR (Tabela 4), em relação ao pré-operatório. Entretanto, não houve diferença significativa entre os grupos R e NR ($p \geq 0.050$). A descrição de todas as variáveis bioquímicas em jejum e a comparação entre períodos encontram-se detalhadas no Anexo K.

Tabela 4 - Valores de Índice QUICKI no pré-operatório e após 90 dias da DGYR.

Variável Clínica	GRUPO RESPONSIVO (R)		GRUPO NÃO RESPONSIVO (NR)	
	Pré-Op. (n=12)	Pós-Op. 90 dias (n=12)	Pré-Op. (n=8)	Pós-Op. 90 dias (n=8)
Glicemia de Jejum (mg/dL)	200 (77-321)	91,5 (75-153)	216 (166-338)	111,5 (87-159)
Insulina de Jejum (μU/mL)	18,1 (13,4-51,5)	7,5 (4,1-16,7)	12,9 (5-43,6)	7,85 (5,4-14,9)
QUICKI	0,28 (0,24-0,32)	0,35 (0,29-0,40)	0,29 (0,25-0,34)	0,34 (0,31-0,36)

Legenda: Valores apresentados como mediana (mínimo – máximo).

Em relação ao comportamento de variáveis bioquímicas frente ao teste de alimentação, ambos os grupos R e NR apresentaram resposta parecida após 90 dias da DGYR. Encontrou-se curva glicêmica pré-operatória característica de pacientes diabéticos para ambos os grupos, com concentrações plasmáticas elevadas e constantes de glicemia; enquanto a curva de glicose pós-operatória apresentou pico de hiperglicemia apenas imediatamente após consumo do EnsureTM (Gráfico 6). Similarmente, ambos os grupos de pacientes apresentaram diminuição significativa dos valores de glicose após 90 dias da DGYR; entretanto pacientes do grupo R apresentaram diferença significante para os 5 tempos do teste de alimentação (0, 30, 60, 90 e 120 min) ($p = 0,002$), enquanto os do grupo NR não apresentaram redução significativa no tempo de 30 min do teste de alimentação (valor $p = 0,063$).

Gráfico 6 – Avaliação das concentrações plasmáticas de glicose durante diferentes tempos do teste de alimentação, no pré-operatório e após 90 dias da DGYR.

Em semelhança com a curva de glicose pré-operatória, observamos uma curva de insulina pré-operatória característica de pacientes com DM2, sem evidências da primeira e segunda fase da secreção de insulina em ambos os grupos. No pós-operatório de 90 dias, notou-se restauração da primeira fase da secreção de insulina, principalmente no grupo R (Gráfico 7). Embora ambos os grupos R e NR tenham apresentado aumento significativo dos valores de insulina no tempo de 30 min do teste de alimentação [R, $p = 0,002$; NR, $p = 0,031$] e diminuição significativa dos valores de insulina no tempo de 120 min (R, $p = 0,012$; NR, $p = 0,031$), somente pacientes do grupo R apresentaram diminuição significativa dos valores de insulina no tempo basal (0 min; $p = 0,008$). Além disso, apenas pacientes do grupo NR apresentaram aumento significativo dos valores de insulina no tempo de 60 min do teste de alimentação (valor $p = 0,031$). Essa observação foi concordante com a não diminuição da glicemia nos 30 m após teste de alimentação no grupo NR.

Gráfico 7 - Avaliação das concentrações plasmáticas de insulina durante diferentes tempos do teste de alimentação, no pré-operatório e após 90 dias da DGYR.

A área sob a curva da glicose (AUC) foi menor 90 dias após DGYR em ambos os grupos ($p < 0,0001$), conforme Tabela 5 e Gráfico 8. Nesse período, entretanto, a análise da AUC da insulina apresentou diferença significativa somente nos pacientes do grupo NR ($p = 0,0053$), sugerindo presença de hiperinsulinemia nesse grupo (Gráfico 9). Os dados de glicose e insulina perante teste de alimentação dos períodos pré e pós-operatório de 90 dias da DGYR encontram-se no Anexo L.

Tabela 5 - Medidas descritivas e análise de comparação da área sob a curva (AUC) de glicose e insulina no pré-operatório e após 90 dias da DGYR.

	Grupo	Momentos	n	Mediana	Mínimo	Máximo	IQ	Valor p*
AUC Glicose	Responsivos	Pré-Op.	11	30750	21900	47175	10830	<0,0001
	Responsivos	90 dias Pós-Op.	10	15772	11445	27330	3716.25	
AUC Glicose	Não Responsivos	Pré-Op.	6	37297	25245	47835	17628.75	<0,0001
	Não Responsivos	90 dias Pós-Op.	6	20422	16575	24855	6727.5	
AUC Insulina	Responsivos	Pré-Op.	10	4366.5	2151	9424.5	3511.5	0.5362
	Responsivos	90 dias Pós-Op.	9	4867.5	2107.5	11217	3283.5	
AUC Insulina	Não Responsivos	Pré-Op.	6	2864.25	1861.5	5019	2704.13	0,0053
	Não Responsivos	90 dias Pós-Op.	5	4357.5	2823	8209.5	3921	

Legenda: Pré-Op. – pré operatório; Pós-Op. – pós-operatório; AUC; área sobre a curva; IQ – amplitude interquartil; *Análise não paramétrica para medidas repetidas com 1 fator.

Gráfico 8 – Área sobre a curva de glicose no pré-operatório e após 90 dias da DGYR.

Gráfico 9 – Área sobre a curva de insulina no pré-operatório e após 90 dias da DGYR.

Em relação ao comportamento de hormônios gastrintestinais frente ao teste de alimentação, observou-se redução significativa de GIP e glucagon em ambos os grupos, assim como suas respectivas AUC, após 90 dias da DGYR. Não houve diferenças significativas dessas variáveis entre os grupos R e NR. Também não foi encontrada alteração significativa da AUC de grelina e PYY em ambos os grupos. Apenas pacientes do grupo R apresentaram aumento significativo na AUC de GLP-1 ativo (R, $p = 0,011$; NR, $p = 0,191$). Quando observamos a resposta do GLP-1 durante o teste de alimentação, notamos que o aumento após 30 m do teste aconteceu em ambos os grupos (Gráfico 10), o que sugere que outros mecanismos gastrintestinais possam estar envolvidos na remissão do DM2.

Gráfico 10 – Avaliação dos níveis plasmáticos de GLP-1 durante teste de alimentação, antes e após DGYR.

As medidas descritivas e o teste de comparação dos hormônios gastrintestinais durante teste de alimentação, assim como AUC encontram-se detalhados nos Anexos M e N. O teste de alimentação foi realizado sem intercorrências. Nenhuma paciente apresentou sintomas de síndrome de *Dumping* durante o teste de alimentação.

4.4 Coleta de biópsias gastrintestinais, controle de qualidade das amostras e normalização de dados do *microarray*

A Figura 8 ilustra o fluxo de coleta de biópsias gastrintestinais, obtenção de RNA com qualidade e quantidade adequada, bem como, o resultado do processo de normalização dos dados de *microarray*, que serão detalhados a seguir:

Figura 8 – Diagrama consort das biópsias e RNA obtidos para realização da técnica de microarray.

Legenda - RNA* ≥ 100 ng/ μ L e RNA Integrity Number (RIN) ≥ 7 , conforme recomendações do Genechip 1.0 ST Array (Affymetrix®); [] Número de amostras que não foram extraídas RNA devido à falta da amostra correspondente no período pós-operatório: ECM [n = 13], duodeno [n = 3], íleo [n = 2]; [#]Biópsia não coletada de 3 pacientes devido à dificuldade da passagem do enteroscópio na alça biliopancreática; ^{*}Biópsia não coletada devido à impossibilidade de alcançar o estômago excluso (ECM) devido à falha na posição do estômago decorrente a refluxo biliar (n = 10); [†]Biópsia não coletada de 2 pacientes devido à dificuldade da passagem do enteroscópio na alça comum; { } amostras que não passaram pelo teste de normalização. **Total de amostras pré e pós-operatórias segmento-correspondente com RNA adequado para análise de expressão gênica pela técnica de microarray separado por grupo R e NR. As caselas em preto correspondem ao número de amostra final correspondente à amostra total, separada por grupo R e NR.

O sucesso da coleta de biópsias pareadas (nos períodos pré e pós-operatórios) de cada segmento gastrointestinal foi de 100% (n = 20) no ECA, 100% (n = 20) no jejuno, 90% (n = 18) no íleo, 85% (n = 17) no duodeno e 35% (n = 7) no ECM, conforme pode ser visto na linha C da Figura 8. As alterações promovidas pela DGYR na anatomia gastrointestinal limitaram o acesso a regiões que foram desviadas do trato digestivo (ECM e duodeno), exigindo manobras complexas durante a enteroscopia realizada no período pós-operatório.

Das biopsias pareadas obtidas do ECA, apenas 6 apresentaram qualidade ($RIN \geq 7$) e quantidade ($\geq 100 \text{ ng}/\mu\text{L}$) de RNA necessárias para realização de microarray. Foi possível extrair RNA de boa qualidade em 4 amostras pareadas das 7 obtidas no ECM. Nos demais segmentos intestinais, tivemos obtenção de RNA de qualidade em 16 amostras pareadas do jejuno, 14 do duodeno e 12 do íleo (Linha E, Figura 8). Essa limitação em relação à perda de RNA já era esperada, devido à região gástrica possuir grande quantidade de RNase e outras enzimas hidrolíticas que diminuem a qualidade do tecido coletado e RNA extraído (140,141). Por essa razão, foram realizados os estudos-piloto prévios já descritos (Anexos D e E) e selecionado um tamanho amostral maior do que o necessário, já prevendo essas perdas, pois uma amostra mínima de 7 pacientes tem poder de 80%, com nível de significância de 5% para as análises de *microarray* do presente estudo.

Dessa forma, foram utilizados 104 chips de microarray, correspondentes a: 12 para análise de ECA (6 amostras pareadas), 8 para ECM (4 amostras pareadas, uma delas não passou no teste de normalização), 28 para duodeno (14 amostras pareadas, 2 delas não passaram no teste de normalização), 32 para jejuno (16 amostras pareadas) e 24 para íleo (12 amostras pareadas). Toda a análise de *microarray* foi pareada, comparando o paciente na condição pós-operatória em relação ao pré-operatório, separado por segmento GI, desse modo, é importante ressaltar que o paciente foi seu próprio controle.

Durante as análises dos dados gerados pelo microarray, dados obtidos de uma amostra do segmento ECM não passou pelo teste de normalização, durante comparação entre períodos (pré e pós-operatório) não separada por grupos (R e NR); e dados obtidos de uma amostra de íleo e duas amostras de duodeno também não passaram pelo teste de normalização, durante a comparação entre períodos (pré e pós-operatório) separado por grupos. Essas amostras de ECM, íleo e duodeno foram excluídas da análise estatística, assim como seus pares (pré ou pós-operatório). Após exclusão, todas as demais amostras de ECM, íleo e duodeno passaram pelo método de normalização (Figuras 9, 10 e 11, respectivamente).

Figura 9 – Teste de normalização nas amostras de ECM. Legenda - a) amostras de ECM pré e pós-operatório não estão devidamente separadas. B) resultado do processo de normalização e das aplicações do Combat, após remoção do par de amostra 61 e 71. As amostras de pré (pontos azuis) e pós-operatório (pontos verdes) ficaram visivelmente separadas.

Figura 10 – Teste de normalização nas amostras de íleo. Legenda a) amostras de íleo pré e pós-operatório grupo R não estão devidamente separadas. B) resultado do processo de normalização e das aplicações do Combat, após remoção do par de amostras 194 e 203. As amostras de pré (pontos azuis) e pós-operatório (pontos verdes) ficaram visivelmente separadas.

Figura 11 – Teste de normalização nas amostras de duodeno. Legenda a) amostras de duodeno pré e pós-operatório grupo NR não estão devidamente separadas; b) resultado do processo de normalização e das aplicações do ComBat, após remoção dos pares de amostras 64-73 e 285-293. As amostras de pré (pontos azuis) e pós-operatório (pontos verdes) ficaram visivelmente separadas.

Com exceção das amostras acima que não passaram pelo processo de normalização, por serem muito diferentes das outras amostras, o processo de normalização com o método ComBat mostrou boa qualidade e distribuição das amostras em cada segmento gastrointestinal (Anexo O). A seguir, realizou-se a análise estatística da técnica de microarray nas amostras GI qualificadas, separadas por grupo R e NR, e obteve-se: ECA (R, $n = 5$; NR, $n = 1$); ECM (R, $n = 3$; NR, $n = 0$); duodeno (R, $n = 8$; NR, $n = 4$), jejuno (R, $n = 11$; NR, $n = 5$) e íleo (R, $n = 7$; NR, $n = 4$). Apenas os dados obtidos a partir dessas amostras foram considerados nas análises estatísticas de expressão gênica.

4.4.1 Genes diferencialmente expressos (DEGs)

A Figura 12 apresenta os genes diferencialmente expressos ($p < 0.05$) obtidos pelo método estatístico Rank Product (RP) em cada segmento GI da amostra em geral, e dos diferentes grupos (R e NR). De acordo com a classificação da ADA (36), utilizada para classificar os pacientes em R e NR, nenhuma paciente em que foram obtidas amostras de ECM foi classificada

dentro do grupo NR e somente biópsia de ECA de uma paciente foi classificada como NR. O pequeno número de amostras ECA do grupo NR inviabilizou a aplicação do método RP. A análise estatística do segmento ECA do grupo NR foi realizada pelo método de fold change $>$ ou $<$ 1, entre períodos, e, por esse motivo, não houve comparação entre os grupos no segmento ECA.

Figura 12 - Resultados das alterações na expressão de genes gastrintestinais pela técnica de *microarray*.

Legenda: *O pequeno número de amostras (1 pré e 1 pós-cirurgia) inviabiliza a aplicação dos métodos de seleção de DEGs por RP. Nesse segmento do grupo NR, foi realizado cálculo do *Fold Change* (FC), subtraindo o valor da expressão de cada gene na condição pós-operatória pelo valor na condição pré-operatória. Assumiu-se o valor de corte de FC $<$ 1.0 para os genes com expressão diminuída; e de FC $>$ 1.0 para os com expressão aumentada.

A seleção dos DEGs relacionados às 5 funções de interesse previamente descrita mostrou que o duodeno foi o segmento intestinal que mais apresentou alterações nessas 5 funções relacionadas à fisiopatologia do DM2, observa-se, na Tabela 5, que, do total de DEGs alterados no duodeno no grupo R, 33,9% representou as 5 funções de interesse. Já o jejuno do

grupo R, embora tenha sido o segmento com maior DEGs alterados após a cirurgia, apenas 23,1% representavam as 5 funções de interesse, desse modo, o jejuno parece ser um segmento que está em adaptação às mudanças anatômicas da DGYR com diversas alterações metabólicas locais. Os segmentos ECM e íleo do grupo R mostraram menores alterações de número de DEGs nas 5 funções de interesse, representando apenas 19% e 17,6%, respectivamente. Curiosamente, no estômago remanescente (ECA) do grupo R, 41,6% dos DEGs alterados, representavam as 5 funções de interesse, o que sugere que esse segmento possa ter importante participação nas alterações metabólicas relacionadas à homeostase glicêmica após DGYR (Tabela 6).

Tabela 6 – Número de DEGs encontrados dentro das 5 funções de interesse estudadas nos pacientes responsivos e não responsivos à remissão de DM2.

GRUPO RESPONSIVO				GRUPO NÃO RESPONSIVO		
Segmento GI	N	Total de DEGs	DEGs nas 5 funções	N	Total de DEGs	DEGs nas 5 funções
ECA	5	238	99 (41,6%)	1	541	62 (11,5%)
ECM	3	135	26 (19%)	0		
Duodeno	8	183	62 (33,9%)	4	48	21 (43,7%)
Jejuno	11	1043	241 (23,1%)	5	126	38 (30,2%)
Íleo	7	358	63 (17,6%)	4	47	11 (23,4%)

Em concordância com os resultados do grupo R, o grupo NR apresentou resultados semelhantes em relação aos segmentos GI mais representativos, sendo o duodeno o mais envolvido nas 5 funções de interesse. A representação em porcentagem foi maior nas 5 funções em relação ao grupo R, com exceção do ECA do grupo NR, que foi aplicado método estatístico diferente dos demais. Entretanto, o número de DEGs nas 5 funções de interesse foi maior no grupo R. Desse modo, a representação em porcentagem aumentada no grupo NR torna-se irrelevante dada a importância de que os genes trabalham em conjunto e seus níveis de expressão claramente não são independentes, por essa razão, os resultados da análise

de *microarray* devem passar por várias etapas para se obter uma interpretação mais refinada. O uso de somente uma ferramenta de análise pode levar à deficiência na interpretação dos resultados, pois funções e processos biológicos geralmente envolvem mais de uma via, e, mais precisamente, vias interconectadas. Nesse sentido, tivemos o cuidado de tratar os dados não somente por meio da refinação das funções de interesse e da classificação ontogênica, como também na interpretação das vias alteradas pelo *software* David que fornece dados do banco KEGG e Biocarta, e da análise de genes reguladores e vias canônicas pelo *software* IPA (Figura 13).

Figura 13 – Contexto de dependência para interpretação das análises de *microarray*.

Legenda: Em azul, estão descritos os *softwares* utilizados no presente estudo [adaptado de¹²⁸].

4.4.2 Efeito metabólico da derivação gástrica em Y de Roux na expressão de genes e suas correlações com marcadores de homeostase glicêmica

Os resultados da resposta transcriptômica gastrointestinal à DGYR serão apresentados com os dados obtidos nas análises de seus segmentos intestinais (duodeno, jejuno e íleo) e, posteriormente, ECA e ECM. Para cada

um desses segmentos gastrintestinais, esses resultados serão apresentados com foco no grupo R e na seguinte sequência: 1) agrupamento hierárquico de Pearson; 2) classificação funcional de ontologia gênica; 3) identificação dos processos biológicos e vias metabólicas suprarrepresentadas, e 4) análise de vias canônicas, redes de interações e reguladores *upstream*.

4.4.2.1 Duodeno

A análise global entre períodos (pré e pós-operatório) mostrou que, dentre as 5 funções de interesse estudadas, a função “desordem do sistema endócrino” foi a mais representativa ($p=5,82E-13$) no duodeno. O agrupamento hierárquico dessa função mostrou 6 subgrupos de genes que apresentaram grande similaridade entre si (Figura 14).

Figura 14 – Agrupamento hierárquico dos DEGs relacionados à função “desordem do sistema endócrino” no segmento duodeno.

Legenda: As cores destacadas nas laterais representam os subgrupos de genes com similaridade entre si. Os pontos verdes do *heatmap* indicam uma menor expressão enquanto vermelho indica uma maior expressão. O dendrograma no ápice da figura representa a similaridade do padrão de expressão entre as amostras.

Especificamente para o duodeno de pacientes do grupo R, foram encontrados 62 genes diferencialmente expressos ($p < 0.05$) dentro das 5 funções selecionadas, no período pós-operatório em relação ao pré-operatório. A análise de classificação funcional por Gene Ontology (GO) de pacientes do grupo R destacou metabolismo do colesterol (GO:0008203) e metabolismo do esterol (GO:0016125) dentre os 10 processos biológicos mais representados (Figura 15). A lista das 10 categorias enriquecidas no duodeno para cada termo GO: função molecular, processo biológico e componente celular de ambos os grupos (N e NR) encontram-se no Anexo P.

Figura 15 - Classificação dos processos biológicos com base nos termos do Gene Ontology (GO-Slim) para os genes diferencialmente expressos identificados no duodeno de pacientes do grupo responsivos à remissão de DM2. Legenda: Os valores representam o valor de p ajustado por testes múltiplos.

A análise de enriquecimento funcional do transcriptoma do duodeno de pacientes do grupo R pelo banco DAVID identificou biossíntese de esteroides, metabolismo de ácidos graxos e vias de sinalização PPAR como as 3 vias KEGGs mais representativas (Tabela 7), envolvendo 6,5%, 4,8% e 4,8% do total dos genes alterados, respectivamente. A análise de enriquecimento funcional pelo banco Biocarta identificou a via de metabolismo do colesterol (via FXR/ LXR) como a mais enriquecida e representativa (Tabela 8), envolvendo 3,2% do total dos genes alterados. Nenhuma via significativamente enriquecida por KEGG ou Biocarta foi encontrada no duodeno de pacientes do grupo NR.

Tabela 7 – Vias representativas e os genes nelas envolvidos no duodeno de pacientes responsivos à remissão do DM2 de acordo com análise funcional por banco DAVID.

Vias KEGG	Genes envolvidos	Valor de P	Benjamini
Biossíntese de esteroides	DHCR24, DHCR7, MSMO1, SQLE	1,9E-4	2,0E-2
Metabolismo de ácidos graxos	ELOVL5, ACSL1, FADS1	3,1E-2	6,7E-1
Vias de sinalização PPAR	ACSL1, APOC3, MMP1	5,7E-2	7,1E-1

Legenda - Em verde, genes com expressão significativamente diminuída.

Tabela 8 - Via representativa e os genes nela envolvidos no duodeno de pacientes responsivos à remissão do DM2 de acordo com análise funcional por banco Biocarta.

Vias Biocarta	Genes envolvidos	Valor de P	Benjamini
Metabolismo do colesterol via FXR e LXR	ABCA1, LDLR	4,2E-2	8,3E-1

Legenda - Em verde, genes com expressão significativamente diminuída; em vermelho, genes com expressão significativamente aumentada.

No total, o programa IPA identificou 48 vias canônicas significativamente alteradas no duodeno de pacientes do grupo R ($p < 0,05$; $-\log p > 1.3$) (Figura 16).

Figura 16 – Figura ilustrativa da interação entre as 48 vias canônicas identificadas por IPA no duodeno do grupo responsivo à remissão de DM2 após DGYR.

Legenda: As linhas representam a ligação entre vias e a intensidade da cor representa o grau de significância, quanto mais intensa a cor, mais significativa é determinada via canônica.

Em concordância com a análise gênica funcional por banco Biocarta, a via LXR/RXR destacou-se entre as dez vias canônicas mais significativas (dadas por uma razão elevada e um valor de p reduzido pela análise IPA) no duodeno dos pacientes do grupo R. Em adição, essa via foi a única que apresentou z-score significativo no duodeno desses pacientes [Ratio 4/120 (0,003)], [z-score: -2] e [p-value: 1,09E-02] (Figura 17). O referido z-score foi negativo, mostrando preditiva inibição da via LXR/RXR.

Gráfico 11 – Dez vias canônicas mais significativas no duodeno do grupo responsivo à remissão de DM2 após DGYR.

Legenda: A razão (*ratio*) demonstrada no diagrama fornece uma visualização da porcentagem de genes pertencentes a uma via específica que estão também em dados de nossas amostras. Seu cálculo está baseado no número de moléculas de uma dada via que compreendem o critério de inclusão (*cutoff*) dividido pelo total de moléculas que fazem parte desta dada via. A razão fornece a associação entre um dado gene e a via a que ele pertence. Nessa figura, a via LXR/RXR destacada em azul apresentou z-score negativo com preditiva inibição ou diminuição da atividade dessa via.

Além disso, a comparação entre grupos mostrou que a via LXR/RXR só se apresentou alterada no grupo R, já que essa alteração não foi identificada nas amostras de duodeno do grupo NR (Gráfico 12). Entre outras vias canônicas exclusivas do grupo R, destacaram-se as vias do metabolismo do colesterol e gliconeogênese (Gráfico 12).

Gráfico 12 - Comparação das dez vias canônicas mais significativas no duodeno do grupo R com as respectivas vias no grupo NR.

Os genes mais envolvidos nas 10 vias canônicas foram: ABCA1, APOC3, ARG2, LDLR, SQLE, DHCR7, MSMO1, INSIG1, FADS1, NCP1L1, ALDOC, ACSL1 e CXCL10. Com exceção do ABCA1 que apresentou expressão significativamente aumentada, todos os outros genes apresentaram expressão significativamente diminuída. Esses genes e os demais envolvidos direta ou indiretamente às dez vias canônicas por IPA estão representados no Gráfico 13. Nota-se que os genes ARG2, CA2, DHCR7, ENPP7, GCG, GCLM e SHBG seguiram direções opostas no seu padrão de alteração de expressão entre pacientes do grupo R e pacientes do grupo NR. Nota-se, ainda, que a expressão do gene ABCA1 aumentou apenas no grupo R e que alterações da expressão dos genes ALDOC, APOC3 e NPC1L1 ocorreram quase que exclusivamente nesse grupo.

Gráfico 13 – Principais genes diferencialmente expressos no duodeno de pacientes responsivos e não responsivos à remissão de DM2 após DGYR.

A análise de redes de interações gênicas pelo IPA mostrou que a rede gênica relacionada ao metabolismo lipídico foi a mais enriquecida no duodeno de pacientes do grupo R, com 18 DEGs nela envolvidos (Figura 17).

Figura 17 – Rede de interações gênicas do duodeno de pacientes responsivos à remissão do DM2 após DGYR. Legenda: Em verde, genes com expressão significativamente diminuída; em vermelho, genes com expressão significativamente aumentada. Linha contínua, relação direta, linha pontilhada, regulação indireta e linha curva, autorregulação. As moléculas representadas com duplos círculos são grupos ou complexos que estão envolvidos na via.

Na análise de redes gênicas pelo IPA no duodeno de pacientes do grupo R, destacou-se, ainda, preditiva inibição dos reguladores *upstream* SREBP1, SREBP2 e SCAP, todos envolvidos na via LXR/RXR. A Figura 18 mostra que esse conjunto de alterações da via LXR/RXR (representada pela sigla NR1H3) associou-se com inibição do DM2. A Figura 19 mostra que esses reguladores

upstream envolvidos na via LXR foram praticamente exclusivos de pacientes do grupo R, bem como sua associação com inibição de DM2.

Figura 18 - Conjunto de alterações da expressão de genes envolvidos na via LXR (NR1H3) no duodeno de pacientes responsivos à remissão pós-operatória de DM2. Legenda: Linha contínua representa relação direta e linha pontilhada representa regulação indireta.

Figura 19 – Comparação dos reguladores *upstream* envolvidos na via LXR (NR1H3) no duodeno de pacientes responsivos e não responsivos à remissão pós-operatória do DM2 e sua associação com a inibição da doença.

Adicionalmente, alterações da via LXR/RXR no duodeno de pacientes do grupo R também parecem ter sido influenciadas por sinalização de PPAR, pela diminuição dos genes APOC3, ME1, ACSL1, MMP1 (Figura 20).

Figura 20 - Ilustração da influência da via PPAR na alteração da via LXR no duodeno de pacientes responsivos à remissão de DM2.

A diminuição do gene *INSIG1* foi classificada pelo IPA como marcador de resposta de desdobramento de proteínas (do Inglês, *unfolded protein*) com valor de *p* significativo para essa função ($1,78E-01$). Em paralelo, a análise de IPA mostrou, ainda, preditiva inibição de vias de recrutamento de macrófagos ($p = 1,70E-05$, *z*-score de -2,3801), da função inflamatória ($p = 1,06E-03$, *z*-score: -1,223) e da síntese de espécies reativas de EROs ($p = 5,46E-04$, *z*-score: -1,729), no duodeno de pacientes do grupo R (Figura 21).

Figura 21 – Funções com predição preditiva reduzida e/ou inibida em pacientes responsivos à remissão pós-operatória de DM2.

Legenda: A) Preditiva diminuição da quantidade de macrófagos por meio da regulação da citocina anti-inflamatória TGF beta 1; B) Preditiva inibição da síntese/produção de EROs, representada, parcialmente, pela via canônica "Resposta ao estresse oxidativo mediado por NRF2". Em verde, genes com expressão significativamente diminuída; em vermelho, genes com expressão significativamente aumentada. Linha contínua, relação direta, linha pontilhada, regulação indireta, em laranja ativação preditiva e, em cinza, nenhuma predição encontrada.

Os resultados de todas as análises efetuadas no duodeno dos pacientes do grupo R apresentaram concordância entre si, mostrando alterações no metabolismo do colesterol e ácidos graxos (segundo Gene Ontology, KEGG e vias canônicas por IPA) e consequente alteração na via LXR/RXR (segundo Biocarta e IPA). Os genes mais representativos da resposta transcriptômica duodenal à DGYR nesses pacientes foram o aumento de *ABCA1* e a diminuição de *NCP1L1* (Figura 22).

FAT DIGESTION AND ABSORPTION

Figura 22 - Genes mais representativos da alteração da via LXR no duodeno de pacientes responsivos à remissão pós-operatória de DM2.

A análise de correlação dos dados transcriptômicos com variáveis clínicas e bioquímicas sistêmicas identificou correlações significativas de moderadas a muito fortes no duodeno de pacientes responsivos à remissão pós-operatória de DM2.

O gene SLC7A11 teve correlação positiva muito forte [Coeficiente de correlação de *Spearman* (ρ) de 0,9 a 1,0] com alterações das concentrações sistêmicas de HBA1c ($p = 0,002$; $\rho = 0,955$). Outros genes encontrados como diferencialmente expressos no duodeno tiveram correlação positiva forte (ρ de 0,7 a 0,9) com alterações das concentrações sistêmicas de glicose, HBA1c, VLDL-c e triglicérides (Tabela 9). Também se encontrou correlação negativa moderada (ρ de -0,7 a -0,5) de alterações das concentrações de LDL-c com alterações do gene MSMO1 ($p = 0,041$; $\rho = -0,731$) nesse segmento intestinal.

Tabela 9 - Genes diferencialmente expressos no duodeno, que apresentaram correlação positiva forte com variáveis bioquímicas sistêmicas.

Gene	Variável Bioquímica							
	Glicose		HBA1c		VLDL-c		Triglicérides	
	Valor de P	ρ	Valor de P	ρ	Valor de P	ρ	Valor de P	ρ
ALDOC	0,004	0,881	-	-	-	-	-	-
APOC3	0,016	0,810	-	-	-	-	-	-
NPC1L1	0,016	0,810	-	-	-	-	-	-
SHBG	0,029	0,762	-	-	-	-	-	-
SLC2 A5	0,048	0,714	-	-	-	-	-	-
MMP1	-	-	0,017	0,847	0,008	0,854	0,024	0,778
LDLR	-	-	0,017	0,847	-	-	-	-
SLC7A11	-	-	-	-	0,008;	0,854	0,028	0,766

Legenda: VLDL-c, lipoproteína de muito baixa densidade-c; HBA1c, hemoglobina glicada; ρ - correlação de Spearman.

4.4.2.2 Jejuno

A análise global identificou a função “desordem do sistema endócrino” a mais representativa ($p=1,32E-48$) no jejuno, entre as 5 funções de interesse estudadas. O agrupamento hierárquico dessa função mostrou 13 subgrupos de genes que apresentou grande similaridade entre si (Figura 23).

Figura 23 – Agrupamento hierárquico dos DEGs relacionados à função “desordem do sistema endócrino” no segmento jejuno.

Legenda: As cores destacadas nas laterais representam os subgrupos de genes com similaridade entre si. Os pontos verdes do *heatmap* indicam uma menor expressão, enquanto vermelho indica uma maior expressão. O dendograma no ápice da figura representa a similaridade do padrão de expressão entre as amostras.

No jejuno de pacientes do grupo R, foram encontrados 241 genes diferencialmente expressos ($p < 0.05$) dentro das 5 funções selecionadas, no período pós-operatório em relação ao pré-operatório. A análise de classificação funcional por Gene Ontology (GO) de pacientes do grupo R destacou proliferação celular (GO:0008283), resposta a estímulos químicos (GO:0042221), resposta fisiológica a ferimentos (GO:0009611) e resposta ao estresse (GO:0006950) dentre os 10 processos biológicos mais representados (Figura 24). A lista das 10 categorias enriquecidas no jejuno para cada termo GO: função molecular, processo biológico e componente celular de ambos os grupos (N e NR) encontram-se no Anexo Q.

Figura 24 - Classificação dos processos biológicos com base nos termos do Gene Ontology (GO-Slim) para os genes diferencialmente expressos identificados no jejuno de pacientes do grupo responsivos à remissão de DM2. Legenda: Os valores representam o valor de p ajustado por testes múltiplos.

A análise de enriquecimento funcional pelo banco DAVID identificou biossíntese de esteroides, vias de sinalização PPAR, secreção biliar, interação entre receptores citocinas, metabolismo de ácidos graxos, vias de sinalização p53, receptores NOD-like, vias de sinalização PI3k-AKT, degradação de ácidos graxos e vias metabólicas (biossíntese de glicanos) como as vias KEGGs mais representativas (Tabela 10), envolvendo 2,9%, 3,4%, 3,4%, 5,9%, 2,5%, 2,5%, 2,1%, 5,9%, 1,7% e 15,5% do total dos genes alterados, respectivamente. No entanto, as duas últimas vias também foram identificadas como mais representativas no jejuno de pacientes do grupo NR, envolvendo 8,1 e 37,8% do total de genes alterados (Tabela 11).

Tabela 10 – Vias representativas e os genes nelas envolvidos no jejuno de pacientes responsivos à remissão do DM2 de acordo com análise funcional por banco DAVID.

KEGG	GENES	VALOR DE P	BENJAMINI
BIOSSÍNTESE DE ESTEROIDES	DHCR24, DHCR7, CYP51A1, EBP, MSMO1, SQLE, SC5D	4,5E-6	9,9E-4
VIAS DE SINALIZAÇÃO PPAR	ACAA1, ACSL4, APOA1, APOC3, FABP4, MMP1, PLTP, SCD	9,1E-4	6,5E-2
SECREÇÃO BILIAR	HMGCR, ABCC2, AQP9, CA2, EPHX1, LDLR, NROB2, SLC10A2	1,1E-3	5,9E-2
INTERAÇÃO ENTRE RECEPTORES CITOCINAS	CCL2, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL8, TNFRSF9, CNTFR, CSF1R, IL1R1, IL18, KDR, LIFR, PDGFRA, PDGFRB	2,8E-3	9,9E-2
METABOLISMO DE ÁCIDOS GRAXOS	ACAT2, ACAA1, ACSL4, FASN, SCD, TECR	5,1E-3	1,2E-1
VIAS DE SINALIZAÇÃO P53	CHEK1, CCNB2, CDK1, IGFBP3, SERPINE1, THBS1	2,0E-2	3,1E-1
RECEPTORES NOD-LIKE	CCL2, CXCL8, CASP1, CASP5, IL18	3,9E-2	4,5E-1
VIAS DE SINALIZAÇÃO PI3K-AKT	COL6A3, CSF1R, FGF9, ITGA9, KDR, LAMA4, NRAS, PDGFRA, PDGFRB, TNC, TNXB, THBS1, MYC, VWF	6,1E-2	4,9E-1
DEGRADAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS	ACAT2, ACAA1, ACSL4, ADH4	8,3E-2	5,7E-1
VIAS METABÓLICAS (BIOSSÍNTESE DE GLICANOS)	DHCR24, HMGCR, DHCR7, ACAT2, ACAA1, ACSL4, ADA, AK7, ADH4, ALDH1A3, ALDOC, AASS, AMY2B, CYP1A1, CYP2C8, CYP51A1, DGAT2, ENPP7, EBP, FDPS, FASN, GGT5, HSD3B2, LIPG, MTHFD2, MSMO1, MVK, NOS2, ODC1, PNPLA3, PLA2G10, RDH11, SQLE, SC5D, TYMS, TPH1, TUSC3	8,4E-2	5,6E-1

Legenda - Em verde, genes com expressão significativamente diminuída e, em vermelho, genes com expressão significativamente aumentada.

Tabela 11 – Vias representativas e os genes nelas envolvidos no jejuno de pacientes não responsivos à remissão do DM2 de acordo com análise funcional por banco DAVID.

KEGG	GENES	Valor de P	BENJAMINI
Vias metabólicas (biossíntese de glicanos)	HMGCS2, NT5C3A, ACAT1, ACAA1, ADA, ADH4, AASS, AMY2A, CYP1A1, DGAT2, ENPP7, LCT, PLA2G10, SORD	4,4E-4	4,0E-2
Degradação de ácidos graxos	ACAT1, ACAA1, ADH4	1,3E-2	4,7E-1
Degradação de valina, leucina e isoleucina	HMGCS2, ACAT1, ACAA1	1,5E-2	3,8E-1
Síntese e degradação de corpos cetônicos	HMGCS2, ACAT1	4,0E-2	6,2E-1
Absorção e digestão de vitaminas	CUBN, SLC19A1	8,6E-2	7,5E-1
Metabolismo de AG alfa linoleico	ACAA1, PLA2G10	9,7E-2	7,4E-1

Legenda - Em verde, genes com expressão significativamente diminuída e, em vermelho, genes com expressão significativamente aumentada.

A análise de enriquecimento funcional pelo banco Biocarta identificou a via de transativação do receptor de EGF por GPCRs em hipertrofia cardíaca como a mais enriquecida e representativa (Tabela 12 e Figura 25), envolvendo 2,1% do total dos genes alterados. Nenhuma via se mostrou enriquecida no jejuno de pacientes do grupo NR pela análise de enriquecimento funcional pelo banco Biocarta.

Tabela 12 – Via representativa e os genes nela envolvidos no jejuno de pacientes responsivos à remissão do DM2 de acordo com análise funcional por banco Biocarta.

BIOCARTA	GENES	Valor de P	BENJAMINI
Papel da transativação do receptor de EGF por GPCRs em hipertrofia cardíaca	FOS, EDN1, EDNRA, EDNRB, MYC	2,9E-3	2,9E-1

Legenda - Em verde, genes com expressão significativamente diminuída e, em vermelho, genes com expressão significativamente aumentada.

Figura 25 - Via de transativação do receptor de EGF por GPCRs em hipertrofia cardíaca identificada pelo banco Biocarta. Destacam-se os genes FOS (*cFOS*), EDN1 (*endothelin 1*), EDNRA e EDNRB (*endothelin receptors*) com expressão significativamente diminuída e o gene MYC (*c-MYC*) com expressão significativamente aumentada.

No total, o programa IPA identificou 111 vias canônicas significativamente alteradas no jejuno de pacientes do grupo R ($p < 0,05$; $-\log p > 1.3$) (Figura 26).

Legenda: As linhas representam a ligação entre vias e a intensidade da cor representa o grau de significância, quanto mais intensa a cor, mais significativa é determinada via canônica.

Na análise por IPA realizada no jejuno de pacientes R, entre as dez vias canônicas mais significativas nesse segmento, destacam-se as vias de biossíntese do colesterol ($p=4,33E-14$) e via LXR/RXR ($p=1,73E-10$) (Gráfico 14).

Gráfico 14 – Dez vias canônicas mais significativas no jejuno do grupo responsivo à remissão de DM2 após DGYR.

© 2000-2017 QIAGEN. All rights reserved.

Diferente do observado no duodeno, o jejuno mostrou aumento preditivo significativo de acúmulo de lipídeo intracelular ($p=1,26E-13$; z-score: 2,215), principalmente devido à ativação dos fatores de transcrição envolvidos na via LXR: SREBP1 ($p=4,53E-16$), SREBP2 ($p=1,33E-21$) e SCAP ($p=3,46E-25$) (Figura 27), e esses fatores de transcrição levou à ativação do DM2.

Figura 27 – Genes e reguladores *upstreams* envolvidos no acúmulo de lipídeo intracelular no jejuno de pacientes responsivos à remissão pós-operatória de DM2.

Observou-se, também no jejuno, diminuição preditiva significativa na função transporte de lipídeos e transporte de ácidos biliares ($p = 6,70E-09$; z-score -2,887). Essa redução no transporte de ácidos biliares parece ser modulada pela redução dos genes SLC10A2, EPHX1 e ABCC3, e aumento do gene AQP9 (Figura 28A). Ainda nesse contexto, o receptor nuclear NROB2, também conhecido como Shp, envolvido na via de ácidos biliares, diminui as concentrações de ácidos biliares, entretanto, como esse gene está com expressão reduzida, assim como o transportador SLC10A2, observa-se aumento preditivo ($7,49E-09$) da concentração de ácidos biliares sistêmicos (Figura 28B). Essa mesma observação foi encontrada no grupo NR, ambos

apresentaram redução significativa nos genes envolvidos nos ácidos biliares: SLC10A2 e NROB2.

Figura 28 – Funções com predição preditiva reduzida no jejuno de pacientes responsivos à remissão pós-operatória de DM2. A) Preditiva diminuição do transporte de lipídeos e ácidos biliares; B) Preditivo aumento da concentração de ácidos biliares. Em verde, genes com expressão significativamente diminuída; em vermelho, genes com expressão significativamente aumentada. Linha contínua, relação direta, linha pontilhada, regulação indireta. Em azul, inibição preditiva, em laranja, ativação preditiva, em amarelo, achados inconsistentes, em cinza, nenhuma predição encontrada.

Quando comparamos no IPA as vias canônicas dos grupos R e NR, notamos que as vias relacionadas ao metabolismo de colesterol e a via LXR/RXR só se apresentaram alteradas no grupo R, essas alterações não foram alteradas significativamente nas amostras de jejuno do grupo NR (Gráfico 15). Ambos os grupos apresentaram diminuição de receptores de ácidos biliares.

Gráfico 15 - Comparação das dez vias canônicas mais significativas no jejuno do grupo R com as respectivas vias no grupo NR.

A análise de rede de interações gênicas pelo IPA mostrou que a rede gênica mais enriquecida era composta por 24 genes envolvidos no metabolismo lipídico, bioquímica de pequenas moléculas, e metabolismo de vitaminas e minerais. Observa-se predominância na expressão de genes relacionados ao metabolismo lipídico (Figura 29).

Figura 29 - Rede de interações gênicas do jejuno de pacientes responsivos à remissão do DM2 após DGYR.

Legenda: Em verde, genes com expressão significativamente diminuída; em vermelho, genes com expressão significativamente aumentada. Linha contínua, relação direta; linha pontilhada, regulação indireta; e linha curva, autorregulação. As moléculas representadas com duplos círculos são grupos ou complexos que estão envolvidos na via.

Seis genes alteradamente expressos no jejuno dos pacientes do grupo R mostraram predição não significativa (z-score 1,211) na inibição da fisiopatologia do DM2. Essa inibição do DM2 está ocorrendo pela participação de 6 que estão predizendo essa inibição: CCL2, TNFFSF9, IL1R, REG1A, IL1RN e HLA-DMA conforme Figura 30.

Figura 30 – Preditiva, mas não significativa inibição do DM2 em amostras de jejuno de pacientes R à remissão da doença.

Os DEGs encontrados no jejuno dos pacientes responsivos à remissão do DM2 que estão envolvidos direta ou indiretamente a essas vias canônicas podem ser vistas nos Gráficos 16 e 17. Nota-se que os genes AMY2A, COL12A1, COL6A3, CXCL10, CYP2C8, HLADMA, HP, KDR, LIFR, SCD e ZEB2 seguiram direções opostas no seu padrão de alteração de expressão entre pacientes do grupo R e pacientes do grupo NR. Nota-se, ainda, que alterações da expressão dos genes FABP4, FASN, FAT4, HSD3B2, PDGFRA, SCD e UCN3 ocorreram quase que exclusivamente no jejuno de pacientes do grupo R (Gráficos 16 e 17).

Gráfico 16 - Principais genes diferencialmente expressos no jejuno de pacientes responsivos e não responsivos à remissão de DM2 após DGYR (Parte 1).

Gráfico 17 - Principais genes diferencialmente expressos no jejuno de pacientes responsivos e não responsivos à remissão de DM2 após DGYR (Parte 2).

A análise de correlação de dados transcriptômicos com variáveis clínicas e bioquímicas não identificou nenhuma correlação muito forte (ρ 9 a 1,0 ou -0,9 a -1,0) nesse segmento gastrointestinal. Alguns dos genes diferencialmente expressos no jejuno apresentaram correlação positiva forte com alterações das concentrações sistêmicas de glicose [gene ABCC2 ($p = 0,003$; $\rho = 0,809$)], HDL-c [gene HLA-DMA ($p = 0,008$; $\rho = 0,746$)] e triglicérides [gene VWF ($p = 0,015$; $\rho = 0,706$)]. Correlações positivas moderadas (ρ de 0,5 a 0,7) entre DEGs do jejuno e variáveis clínicas/bioquímicas também foram encontradas para alterações do IMC, glicose, LDL-c, VLDL-c e triglicérides (Tabela 13). DEGs desse segmento tiveram correlação negativa forte (ρ de -0,9 a -0,7) com alterações das concentrações sistêmicas de VLDL-c [gene CASP 5 ($p = 0,010$; $\rho = -0,736$)], HbA1c [gene FOXM1 ($p = 0,009$; $\rho = -0,768$)], insulina [gene DHCR7 ($p = 0,013$; $\rho = -0,745$)]. Outros DEGs no jejuno apresentaram correlações negativas moderadas com alterações de todas as variáveis bioquímicas estudadas, com exceção de peptídeo C, que não foi encontrada nenhuma correlação com dados transcriptômicos do jejuno (Tabela 14).

Tabela 13 - Genes diferencialmente expressos no jejuno que apresentaram correlação positiva moderada com variáveis clínicas e bioquímicas sistêmicas.

Gene	Variáveis Clínicas e Bioquímicas									
	IMC		Glicose		LDL-c		VLDL-c		Triglicérides	
	Valor de P	ρ	Valor de P	ρ	Valor de P	ρ	Valor de P	ρ	Valor de P	ρ
ABCA8	-	-	-	-	-	-	0,049	0,602	0,036	0,633
ALDH1A3	-	-	-	-	-	-	0,046	0,612	0,022	0,679
CYP2C8	-	-	-	-	0,048	0,607	-	-	-	-
FAT4	-	-	0,043	0,618	-	-	-	-	-	-
GABRP	0,035	0,636	-	-	-	-	-	-	-	-
IL1R1	-	-	0,047	0,609	-	-	-	-	-	-
KDR	-	-	0,035	0,636	-	-	-	-	-	-
LIFR	-	-	-	-	-	-	0,049	0,602	0,038	0,629
PDGFRA	-	-	-	-	-	-	-	-	0,035	0,638
RGS5	-	-	-	-	-	-	-	-	0,044	0,615
TLR7	-	-	-	-	-	-	-	-	0,040	0,624
VWF	-	-	0,047	0,609	-	-	0,018	0,694	-	-
ZEB2	-	-	0,039	0,627	-	-	-	-	-	-

Legenda: IMC, índice de massa corporal; LDL-c, lipoproteína de baixa densidade-c; VLDL-c, lipoproteína de muito baixa densidade-c; ρ - correlação de Spearman.

Tabela 14 - Genes diferencialmente expressos no jejuno que apresentaram correlação negativa moderada com variáveis bioquímicas sistêmicas.

Gene	Glicose		HbA1c		Colesterol		LDL-c		VLDL-c		Triglicérides	
	Valor de P	rho	Valor de P	rho	Valor de P	rho	Valor de P	Rho	Valor de P	rho	Valor de P	rho
CASP1	-	-	-	-	-	-	-	-	0,049	-0,602	0,046	-0,610
CASP5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,016	-0,702
CCL18	-	-	-	-	0,036	-0,633	-	-	-	-	-	-
FOXM1	-	-	-	-	-	-	-	-	0,021	-0,681	0,019	-0,688
GABRP	-	-	-	-	-	-	-	-	0,048	-0,607	0,038	-,629
HSD3B2	-	-	0,041	-0,652	-	-	-	-	-	-	-	-
NOS2	-	-	-	-	-	-	0,019	-0,690	-	-	-	-
TECR	0,029	-0,655	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TLR7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TMPRSS3	-	-	-	-	-	-	-	-	0,029	-0,653	0,038	-0,629

Legenda: HbA1c, hemoglobina glicada; LDL-c, lipoproteína de baixa densidade-c; HDL-c, lipoproteína de alta densidade-c; VLDL-c, lipoproteína de muito baixa densidade-c; rho- correlação de Spearman.

Nossos resultados de microarray também mostraram que apenas pacientes com remissão de DM2 apresentaram aumento significativo da expressão de REG1a e REG3g no jejuno, genes que codificam a família de proteínas regeneradoras derivadas de ilhotas pancreáticas (do Inglês, *regenerating pancreatic islet-derived protein* – Reg). Essa característica da resposta transcriptômica jejunal à DGYR em pacientes respondedores à homeostase glicêmica foi confirmada por RT-qPCR. Esses resultados estão em fase de publicação (Apêndice A).

4.4.2.3 Íleo

A análise global entre períodos (pré e pós-operatório) mostrou que, dentre as 5 funções de interesse estudadas, a função “desordem do sistema endócrino” foi a mais representativa ($p=1,33E-12$) no íleo. O agrupamento hierárquico dessa função mostrou 5 subgrupos de genes que apresentaram grande similaridade entre si (Figura 31).

Figura 31 - Agrupamento hierárquico dos DEGs relacionados à função “desordem do sistema endócrino” no segmento íleo.

Legenda - As cores destacadas nas laterais representam os subgrupos de genes com similaridade entre si. Os pontos verdes do heatmap indicam uma menor expressão, enquanto vermelho indica uma maior expressão. O dendograma no ápice da figura representa a similaridade do padrão de expressão entre as amostras.

No íleo de pacientes do grupo R, foram encontrados 63 genes diferencialmente expressos ($p < 0.05$) dentro das 5 funções selecionadas, no período pós-operatório em relação ao pré-operatório. A análise de classificação funcional por Gene Ontology (GO) de pacientes do grupo R destacou resposta a estímulos químicos (GO:0042221), processo homeostático (GO:0042592) e regulação biológica (GO:0065008) dentre os 10 processos biológicos mais representados pelos DEGs do íleo (Figura 32) no pós-operatório. A lista das 10 categorias enriquecidas no duodeno para cada termo GO: função molecular, processo biológico e componente celular de ambos os grupos (N e NR) encontram-se no Anexo R.

Figura 32 - Classificação dos processos biológicos com base nos termos do Gene Ontology (GO-Slim) para os genes diferencialmente expressos identificados no íleo de pacientes do grupo responsivos à remissão de DM2. Legenda: Os valores representam o valor de p ajustado por testes múltiplos.

A análise de enriquecimento funcional pelo banco DAVID identificou carcinogênese química, metabolismo do ácido araquidônico e metabolismo do retinol como as vias KEGGs mais representativas (Tabela 15), envolvendo 6,5%, 4,8% e 4,8% do total dos genes alterados, respectivamente.

Tabela 15 – Vias representativas e os genes nelas envolvidos no íleo de pacientes responsivos à remissão de diabetes mellitus tipo 2 de acordo com análise funcional por banco DAVID.

Vias KEGG	P valor	Benjamini	Vias KEGG
Carcinogênese química	ADH4, CYP1A1, CYP2C8, PTGS2	9,4E-3	4,6E-1
Metabolismo do ácido araquidônico	CYP2C8, PLA2G10, PTGS2	4,5E-2	7,8E-1
Metabolismo do retinol	ADH4, CYP1A1, CYP2C8	4,9E-2	7,4E-1

Legenda - Em verde, genes com expressão significativamente diminuída e, em vermelho, genes com expressão significativamente aumentada.

A análise de enriquecimento funcional pelo banco Biocarta não identificou vias representativas no íleo de pacientes do grupo R. Nenhuma via significativamente enriquecida por KEGG ou Biocarta foi encontrada no íleo de pacientes do grupo NR.

No total, o programa IPA identificou 73 vias canônicas significativamente alteradas no íleo de pacientes do grupo R ($p < 0,05$; $-\log p > 1,3$) (Figura 33).

Figura 33 – Figura ilustrativa da interação entre as 73 vias canônicas identificadas por IPA no íleo do grupo responsivo à remissão de DM2 após DGYR.

Legenda: As linhas representam a ligação entre vias e a intensidade da cor representa o grau de significância, quanto mais intensa a cor, mais significativa é determinada via canônica.

Na análise por IPA realizada no jejuno de pacientes R, entre as dez vias canônicas mais significativas nesse segmento, destacam-se a via regulatória do sistema imunológico do fator inibitório de migração de macrófagos (do Inglês, *macrophage inhibitory fator*, MIF) ($p=1,43E-05$) e a via IL-17A sinalização de fibroblastos ($p=6,69E-05$) (Gráfico 18). No entanto, a via MIF se destacou por estar alterada exclusivamente em pacientes do grupo R (Gráfico 19).

Gráfico 18 - Dez vias canônicas mais significativas no íleo do grupo responsivo à remissão de DM2 após DGYR.

Analysis: ILEO RESPONDEDORES 5 FUNÇÕES - 2016-11-29 01:57 PM

© 2000-2017 QIAGEN. All rights reserved.

Gráfico 19 - Comparação das dez vias canônicas mais significativas no íleo do grupo R com as respectivas vias no grupo NR.

Analysis: ILEO RESPONDEDORES 5 FUNÇÕES - 2016-11-29 01:57 PM

© 2000-2017 QIAGEN. All rights reserved.

Nessa via, a alteração do metabolismo de ácido araquidônico (AA) se associou com a inibição da síntese de citocinas, por ativação da via JNK e participação do gene AP1, também conhecido como gene FOS (Figura 34). Os pacientes do grupo R apresentaram aumento significativo na expressão

dos genes: NOS2 (representado na figura como iNOS) e PLA2G10 (representado na figura como PLA2). Este último está diretamente envolvido na síntese de AA, o que foi similar com o os resultados obtidos pelo banco KEGG.

MIF Regulation of Innate Immunity : ILEO RESPONDEDORES 5 FUNÇÕES : Expr Log Ratio

© 2000-2017 QIAGEN. All rights reserved.

Figura 34 - Figura ilustrativa da via canônica regulatória do sistema imunológico do fator inibitório de migração de macrófagos.

Legenda: As moléculas destacadas em em rosa referem-se a genes encontrados em nossos resultados. Em verde, genes com expressão significativamente diminuída; em vermelho, genes com expressão significativamente aumentada. Linha contínua, relação direta; linha pontilhada, regulação indireta. Em azul, inibição preditiva; em laranja, ativação preditiva; em branco, nenhuma predição encontrada.

Os DEGs encontrados no íleo dos pacientes responsivos à remissão do DM2 que estão envolvidos direta ou indiretamente nas vias canônicas identificadas por IPA podem ser vistas no Gráfico 20. Nota-se que os genes CC18, LIPG, LDLR e MS4A1 seguiram direções opostas no seu padrão de alteração de expressão entre pacientes do grupo R e pacientes do grupo NR. Nota-se, ainda, que alterações da expressão dos genes CXR4, CYP1A1 e HBEGF ocorreram quase que exclusivamente no íleo de pacientes do grupo R.

Gráfico 20 - Principais genes diferencialmente expressos no íleo de pacientes responsivos e não responsivos à remissão de DM2 após DGYR.

O regulador *upstream* que mostrou ter o maior efeito regulatório sobre as vias do íleo foi o fator de transcrição SMAD3 ($p=9,03E-04$; z-score: -2,169) envolvido na diferenciação do tecido conectivo e não foi encontrada relação desse regulador *upstream* com DM2 (Figura 36).

Figura 36 – Regulador *upstream* em destaque no íleo de pacientes responsivos à remissão de DM2.

Genes diferencialmente expressos no íleo tiveram correlação positiva forte com alterações de LDL-c [gene CXR4 ($p = 0,015$; $\rho = 0,857$)], HbA1c [gene FADS1 ($p = 0,037$; $\rho = 0,841$)] e colesterol [gene CYP1A1 ($p = 0,042$; $\rho = 0,775$)]; e correlação negativa forte com alterações de insulina [gene CXR4 ($p = 0,008$; $\rho = -0,893$)], LDL-c [gene FFAR2 ($p = 0,037$; $\rho = -0,786$)] e colesterol [gene MMP1 ($p = 0,041$; $\rho = -0,775$)].

4.4.2.4 Estômago remanescente (ECA) e estômago excluído (ECM)

Para estes dois segmentos gástricos, foram realizadas somente análises descritivas devido ao baixo número de amostras no grupo NR (ECA=1 e ECM=0). Não foi realizada análise de correlação de Spearman com os dados clínicos, devido ao baixo tamanho das amostras de R em ambos os segmentos (ECA=5 e ECM=3).

A análise global entre períodos (pré e pós-operatório) mostrou que, dentre as 5 funções de interesse estudadas, a função “desordem do sistema endócrino” foi a mais representativa em ambos os segmentos gástricos (ECA: $p=5,13E-13$; ECM: $p=7,91E-11$). Não foi realizado agrupamento hierárquico, pois não houve comparação entre grupos.

Na análise de classificação funcional por Gene Ontology (GO), destacou-se o processo biológico digestão (GO:0007586) para ambos os segmentos gástricos. A lista das 10 categorias enriquecidas para cada termo GO: função molecular, processo biológico e componente celular encontram-se no Anexo S.

Para melhor compreensão, os resultados das análises de enriquecimento funcional e redes gênicas serão descritos separados por segmento:

ECA

No segmento ECA, de pacientes do grupo R, foram encontrados 99 genes diferencialmente expressos ($p<0.05$) dentro das 5 funções selecionadas, no período pós-operatório em relação ao pré-operatório. A análise de enriquecimento funcional pelo banco DAVID identificou digestão e absorção de ácidos graxos, digestão e absorção de proteínas vias de sinalização do PPAR, vias de sinalização PPAR, digestão e absorção de carboidratos, como as vias KEGGs mais representativas, envolvendo 6,9%, 6,9%, 5,9% e 4,9%, respectivamente (Tabela 16). A análise de enriquecimento funcional pelo banco Biocarta identificou a via de apoptose induzida por TSP-1 em células endoteliais microvasculares como a única

enriquecida e significativa ($p=7,9E-2$; p ajustado = $9,9E-1$), envolvendo 2% do total dos genes alterados (genes FOS e THBS1).

Tabela 16 – Vias representativas e os genes nelas envolvidos no ECA de pacientes responsivos à remissão do DM2 de acordo com análise funcional por banco DAVID.

KEGG	GENES	P-VALUE	BENJAMINI
Digestão e absorção de ácidos graxos	APOA4, APOB, FABP1, FABP2, MTP, MOGAT2, PLA2G2A	2,2E-6	3,4E-4
Digestão e absorção de proteínas	ACE2, DPP4, MME, MEP1A, MEP1B, SLC3A1, SLC6A19	2,5E-4	9,5E-3
Vias de sinalização do PPAR	APOC3, FABP1, FABP2, MMP1, PCK1, SLC27A2	5,5E-4	1,7E-2
Digestão e absorção de carboidratos	AMY2A, MGAM, SLC2A2, SLC5A1, SI	8,1E-4	1,8E-2

Legenda - Em verde, genes com expressão significativamente diminuída e, em vermelho, genes com expressão significativamente aumentada.

No total, o programa IPA identificou 38 vias canônicas significativamente alteradas no ECA de pacientes do grupo R ($p < 0,05$; $-\log p > 1,3$) (Figura 37).

Figura 37 – Figura ilustrativa da interação entre as 38 vias canônicas identificadas por IPA no ECA do grupo responsivo à remissão de DM2 após DGYR.

Legenda: As linhas representam a ligação entre vias e a intensidade da cor representa o grau de significância, quanto mais intensa a cor, mais significativa é determinada via canônica.

Na análise por IPA realizada no jejuno de pacientes R, entre as dez vias canônicas mais significativas nesse segmento, destacam-se a via do DM do tipo MODY (acrônimo de *maturity-onset diabetes of the Young*) ($p=3,67E-06$) e a via da degradação da sacarose V em mamíferos ($p=8,85E-04$) (Gráfico 21 e Figura 38).

Gráfico 21 - Dez vias canônicas mais significativas no ECA do grupo responsivo à remissão de DM2 após DGYR.

Analysis: ECA RESPONDEDORES 5 FUNÇÕES - 2016-11-29 01:58 PM

© 2000-2017 QIAGEN. All rights reserved.

Figura 38 – Via canônica da degradação da sacarose em mamíferos, representadas pelo aumento dos genes SI e ALDOB, respectivamente.

Os DEGs encontrados no ECA dos pacientes responsivos à remissão do DM2 que estão envolvidos direta ou indiretamente nas vias canônicas identificadas por IPA podem ser vistos no Gráfico 22. Nota-se que a maioria

dos genes nesse segmento gastrintestinal está com expressão significativamente aumentada após DGYR, com exceção dos genes AMY2A, AQP9, C9orf84, CHIA, DDR1, DNAH14, FOS, MS4A1, SKP1, SNCA, TCN1 e ZNF208 que apresentaram diminuição significativa após a cirurgia (Gráfico 22).

Gráfico 22 - Principais genes diferencialmente expressos no ECA de pacientes responsivos e não responsivos à remissão de DM2 após DGYR.

Figura 40 – Reguladores *upstreams* e seus efeitos preditivos em vias metabólicas do ECA.

Legenda: A) aumento da glicólise por HNF4A; B) aumento da glicólise por MYC; C) aumento da oxidação lipídica por HNF4A; D) aumento da sobrevivência do organismo por NR3C1 e E) aumento do metabolismo de proteínas.

No segmento ECM de pacientes do grupo R, foram encontrados 26 genes diferencialmente expressos ($p < 0.05$) dentro das 5 funções selecionadas, no período pós-operatório em relação ao pré-operatório. A análise de enriquecimento funcional pelo banco DAVID identificou vias de sinalização Toll Like Receptor (TLR), e proteoglicanos em câncer, como as vias KEGGs mais representativas, cada uma representa 10,7% do total dos genes alterados (Tabela 17). A análise de enriquecimento funcional pelo banco Biocarta identificou a via de apoptose induzida por TSP-1 em células endoteliais microvasculares como a única enriquecida e significativa ($p = 3,9E$; p ajustado = $5,2E-1$), envolvendo 2% do total dos genes alterados (genes GHRL e IGFBP5).

Tabela 17 – Vias representativas e os genes nelas envolvidos no ECM de pacientes responsivos à remissão do DM2 de acordo com análise funcional por banco DAVID.

KEGG	N (%)	GENES	P-VALUE	BENJAMINI
Vias de sinalização	3			
TLR	(10,7%)	CXCL10, CXCL11, IL1B	3,0E-2	9,3E-1
Proteoglicanos em câncer	3	GPC3, IGF1R, mir21	9,4E-2	8,9E-1
	(10,7%)			

Legenda - Em verde, genes com expressão significativamente diminuída e, em vermelho, genes com expressão significativamente aumentada.

No total, o programa IPA identificou 34 vias canônicas significativamente alteradas no ECM de pacientes do grupo R ($p < 0,05$; $-\log p > 1,3$) (Figura 41).

Figura 41 – Figura ilustrativa da interação entre as 34 vias canônicas identificadas por IPA no ECM do grupo responsivo à remissão de DM2 após DGYR.

Legenda: As linhas representam a ligação entre vias e a intensidade da cor representa o grau de significância, quanto mais intensa a cor, mais significativa é determinada via canônica.

Na análise por IPA realizada no ECM de pacientes R, não foi encontrada nenhuma via associada com a fisiopatologia do DM2. As vias canônicas observadas nesse segmento foram associadas à resposta adaptativa do órgão (Gráfico 23).

Gráfico 23 - Dez vias canônicas mais significativas no ECM do grupo responsivo à remissão de DM2 após DGYR.

Os DEGs encontrados no ECM dos pacientes responsivos à remissão do DM2 que estão envolvidos direta ou indiretamente as vias canônicas identificadas por IPA podem ser vistos no Gráfico 24. Observa-se redução do gene precursor de gastrina (GAST) e inesperado aumento da expressão do gene precursor da grelina (GHRL).

Gráfico 24 - Principais genes diferencialmente expressos no ECM de pacientes responsivos e não responsivos à remissão de DM2 após DGYR.

A análise de rede de interações gênicas pelo IPA mostrou que a rede gênica mais enriquecida era composta por 9 genes envolvidos com interação e sinalização celular, movimento celular, e função e desenvolvimento do sistema hematológico (Figura 42).

Figura 42 - Rede de interações gênicas do ECM de pacientes responsivos à remissão do DM2 após DGYR.

Legenda: Em verde, genes com expressão significativamente diminuída; em vermelho, genes com expressão significativamente aumentada. Linha contínua, relação direta; linha pontilhada, regulação indireta; e linha curva, autorregulação. As moléculas representadas com duplos círculos são grupos ou complexos que estão envolvidos na via.

Encontra-se no anexo T todos os valores individuais das variáveis clínicas e bioquímicas dos pacientes R e NR antes e após 90 dias da DGYR. Os valores individuais de fold change dos segmentos duodeno, jejuno, íleo, ECA e ECM estão nos anexos U, V, X e Z, respectivamente.

4.4.3 Confirmação dos achados por RT-qPCR

Alguns dos genes encontrados alteradamente expressos nos resultados de microarray foram validados por RT-qPCR nas 20 pacientes do estudo e em outras 5 pacientes com as mesmas características da amostra inicial, sendo 3 delas responsivas e 2 não responsivas à remissão de DM2 após DGYR (Tabela 18).

Tabela 18 – Genes validados em cada segmento separado por grupo. Valores negativos e positivos indicam diminuição e aumento da expressão, respectivamente. Os valores em negrito indicam mudanças significativas ($p \leq 0,05$). (M), análise de microarrays; (V), validação por RT-qPCR

Gene	ECA	ECM	DUODENO		JEJUNO		ILEO	
	R	R	R	NR	R	NR	R	NR
SCD	-0,027 (M)	-0,175 (M)	-0,186 (M)	-0,073 (M)	+0,865 (M)	+0,023 (M)	+0,006 (M)	-0,256 (M)
CYP2C8	-0,547 (M)	+1,705(M)	-0,418 (V)	-0,541 (V)	+0,112 (V)	-0,211 (V)	-0,460 (V)	-1,349 (V)
	+0,076(V)	+2,022 (V)	+0,286(M)	+0,436(M)	-0,297(M)	+0,267(M)	+0,535(M)	+0,400(M)
LDLR	+0,513(M)	-0,322(M)	-0,872(M)	-0,227(M)	+0,850(M)	+0,460(M)	-0,460(M)	+0,097(M)
			-1,887 (V)	-0,790(V)	+0,649 (V)	+0,559(V)	-0,592 (V)	-1,631(V)
CYP1A1	+0,078(M)	-0,330(M)	-1,855(M)	-0,493(M)	-1,521(M)	-0,789(M)	-0,479(M)	-0,042(M)
			-5,106 (V)	-0,656(V)	-3,255 (V)	-2,235(V)	-1,226 (V)	-1,272(V)
ACSL1	+0,014(M)	+0,668(M)	-0,914(M)	-0,561(M)	+0,203(M)	-0,133(M)	-0,453(M)	-0,217(M)
			-1,444 (V)	-0,975(V)	-0,801 (V)	-0,152(V)	-0,753 (V)	-2,069(V)
INSIG1	+0,254(M)	+0,389(M)	-0,996(M)	-0,113(M)	+1,202(M)	+0,785(M)	-0,443(M)	-0,396(M)
			-1,110 (V)	-0,930(V)	+0,624 (V)	+1,081(V)	-0,877 (V)	-0,956(V)
FADS1	-0,360(M)	+0,178(M)	-0,666(M)	-0,246(M)	-0,324(M)	-0,208(M)	-0,553(M)	-0,220(M)
			-2,007 (V)	-1,147(V)	-1,740 (V)	-1,167(V)	-1,038 (V)	-1,184(V)
FOS	-0,804(M)	-0,030(M)	+0,930(M)	+1,652(M)	-0,490(M)	-1,213(M)	-1,146(M)	-0,428(M)
			1,557 (V)	+2,719(V)	-2,069 (V)	-2,653(V)	-1,644 (V)	-1,600(V)
SQLE	+0,486(M)	-0,150(M)	-0,914(M)	-0,223(M)	+0,972(M)	+0,523(M)	-0,347(M)	+0,020(M)
	+0,911 (V)		-1,732 (V)	+0,053(V)	+0,071(V)	+0,369(V)	+0,031 (V)	-0,924(V)
NPC1L1	+0,649(M)	-0,070(M)	-0,859(M)	-0,039(M)	+0,030(M)	+0,030(M)	+0,001(M)	-0,109(M)
	+3,773 (V)		-1,535(V)	-1,034(V)	-0,880 (V)	+0,245(V)	-0,272 (V)	-1,124(V)
SLC2A5/ GLUT5	+0,446(M)	0,169(M)	-0,569(M)	-0,119(M)	-0,159(M)	-0,134(M)	+0,019(M)	-0,019(M)
			-0,970 (V)	-0,566(V)	-1,540 (V)	-0,649(V)	-0,581 (V)	-0,140(V)
REG1 α	+0,411(M)	0,310(M)	+0,188(M)	+0,472(M)	+0,486(M)	+0,434(M)	+0,237(M)	+0,663(M)
			+0,076 (V)	+0,363(V)	+0,349 (V)	-0,054(V)	-0,427 (V)	+2,429(V)
REG1 β	+1,143(M)	0,052(M)	+0,509(M)	+1,170(M)	+2,052(M)	+2,422(M)	+1,006(M)	+2,166(M)
	+2,733 (V)		-0,628 (V)	+2,118(V)	+2,251 (V)	+2,322(V)	+0,758 (V)	+2,508(V)
REG3 γ	+0,010(M)	-0,431(M)	+0,067(M)	+0,332(M)	+0,588(M)	+0,366(M)	+0,297(M)	+0,256(M)
			+1,133 (V)	+0,647(V)	+1,789 (V)	+1,528(V)	+0,827(V)	+2,049(V)
REG4	+0,861(M)	-1,078(M)	-0,425(M)	-0,342(M)	-0,009(M)	-0,014(M)	-0,099(M)	-0,070(M)
	+0,677(V)	+1,017(V)	-0,435(V)	-0,899(V)				
GIP	+1,359(M)		-0,113(M)	-0,592(M)	-0,227(M)	-0,268(M)	-0,248(M)	-0,100(M)
	+4,442(V)	0,389(M)	-0,479 (V)	-0,834(V)	-1,311(V)	-1,545(V)	-0,490(V)	-0,652(V)

continua

conclusão

Gene	ECA	ECM	DUODENO		JEJUNO		ILEO	
	R	R	R	NR	R	NR	R	NR
GCG	+1,057(M) +0,999(V)	-0,064(M)	-0,110(M) -0,141(V)	+1,547(M) +1,208(V)	+0,899(M) -0,117(V)	+0,533(M) +0,298(V)	+0,819(M) +0,023(V)	+0,503(M) +1,815(V)
PYY	+0,305(M)	-0,075(M)	-0,005(M) -0,243(V)	-0,004(M) +0,054(V)	-0,037(M) -1,623(V)	-0,131(M) -0,540(V)	+0,223(M) +0,624(V)	-0,019(M) -0,252(V)
GHRL	+0,033(M) -0,390(V)	+1,309(M) +1,130(V)	-0,138(M)	-0,375(M)	+0,015(M)	-0,023(M)	-0,090(M)	-0,010(M)
MMP1	+0,677(M)	-0,978(M)	-1,139(M) -2,648(V)	+0,917(M) +0,369(V)	+0,940(M) +0,669(V)	+0,959(M) +0,083(V)	+0,190(M) +0,181(V)	+1,416(M) +0,830(V)
TLR4	+0,060(M)	-0,055(M)	-0,241(M) -0,258(V)	-0,373(M) -0,211(V)	-0,344(M) -1,812(V)	-0,307(M) -1,592(V)	-0,259(M) -0,794(V)	-0,177(M) -1,315(V)
TLR7	-0,221(M)	-0,307(M)	-0,090(M) -0,507(V)	-0,325(M) -0,138(V)	-0,452(M) -1,659(V)	-0,220(M) -1,163(V)	-0,339(M) -0,925(V)	-0,137(M) -1,871(V)

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

5.1 Da contribuição científica

Cirurgias bariátricas, especialmente aquelas que envolvem procedimentos de má absorção, resultam em controle glicêmico pós-operatório quase que imediato. Os mecanismos envolvidos nesse fenômeno metabólico ainda são desconhecidos, mas hipóteses mais consistentes sugerem advir direta ou indiretamente de uma resposta adaptativa do trato gastrointestinal às mudanças anatômicas induzidas pela cirurgia. Estudos em humanos disponíveis nessa área pouco exploram, entretanto, a biologia molecular desses tecidos-alvo e sua correlação com homeostase glicêmica. O aspecto mais original do presente estudo foi avaliar de forma pioneira a resposta transcriptômica gastrointestinal à DGYR em pacientes que atingiram remissão pós-operatória de DM2. Foram identificadas assinaturas transcriptômicas pós-operatórias específicas para cada segmento gastrointestinal nesses pacientes, algumas exclusivas de pacientes responsivos à homeostase glicêmica. Particularmente, DGYR modificou a via LXR/RXR no duodeno e essa alteração de correlacionou com inibição de DM2.

5.2 Do método

O estudo presentemente proposto foi desenvolvido para fornecer evidências clínicas que expliquem os mecanismos moleculares envolvidos na homeostase glicêmica após DGYR, considerando o papel fundamental do trato gástrico e, principalmente, intestinal nas suas origens. Nessa perspectiva, seu principal desafio técnico-científico consistiu na aquisição de amostras de biópsias gastrointestinais, avaliadas antes e após DGYR. Para

ultrapassar esse desafio, optou-se pelo emprego da técnica de enteroscopia de duplo balão (EDB).

A técnica EDB é bem tolerada na maioria dos estudos e a coleta de biópsias durante esse procedimento é significativamente segura. Profissionais de um centro alemão relataram taxa < 1% de complicações num total de 3894 EDB efetuadas¹¹¹. No nosso centro, nenhuma complicação foi relatada após 364 procedimentos de EDB, dos quais 112 incluíram coleta de biópsias¹¹². O comitê de ética de nossa instituição foi inicialmente relutante em aprovar a coleta de biópsias gastrintestinais. No entanto, a Unidade de Endoscopia Digestiva de nossa instituição é um centro de referência mundial na vanguarda do desenvolvimento de EDB. Essa premissa nos permitiu obter a referida aprovação após discussões intensas e sob a condição de informar adequadamente no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que a coleta de amostra de biópsia é específica do protocolo do estudo, e não parte do tratamento padrão de pacientes bariátricos.

No presente estudo, o controle de alterações transcriptômicas gastrintestinais pós-operatórias são os dados obtidos do próprio paciente no pré-operatório. Para isso, utilizou-se marcação com tinta nanquim nas coletas pré-operatórias dos segmentos intestinais, para que as coletas do pós-operatório fossem feitas em região próximas às regiões coletas no pré-operatório.

A seleção da análise “ômica” tecidual a ser empregada no presente estudo foi desafio crítico enfrentado no desenho seu protocolo. Ocorre que as diminutas amostras gastrintestinais obtidas, sem sacrificar minimamente a segurança das pacientes envolvidas, mostraram-se suficientes para a aplicação de apenas uma técnica ômica. Após discussões, enriquecidas pela participação ativa de especialistas em biologia molecular, optamos por desenvolver análises transcriptômicas.

Análises transcriptômicas podem ser úteis para explorar respostas fisiológicas a fatores externos¹¹³. Suas informações indicam “o que pode estar ocorrendo” no tecido (o que ele está requisitando para sua fisiologia) após DGYR, já que nem todo o RNAm é traduzido em proteína. Por outro lado, o

genoma humano é completamente conhecido, enquanto falta identificar as proteínas codificadas por 2.535 de seus genes¹¹⁴. Embora, uma análise proteômica poderia mostrar, portanto, “o que está ocorrendo” no tecido gastrointestinal após DGYR, o total desconhecimento dos mecanismos envolvidos na homeostase glicêmica induzida por esse procedimento implica no rastreamento total das moléculas humanas (ex.: por técnica de *western blot*)¹¹⁵. Nesse contexto, a análise transcriptômica por *microarray* viabilizou identificar a resposta global e irrestrita do tecido gastrointestinal à DGYR, o que poderia não ser alcançado por análise proteômica.

O uso combinado de *microarray* e RT-qPCR tem sido extensamente adotado pela literatura científica em estudos de expressão gênica. Na técnica de *microarray*, obtêm-se melhores resultados quanto mais homogêneas forem as amostras entre os grupos comparados¹¹⁶. No objetivo de obter amostras mais homogêneas possíveis, optamos por avaliar apenas mulheres. Existem genes gênero-específico que poderiam influenciar os nossos resultados, uma vez que a técnica de *microarray* seleciona os genes mais significativamente alterados. Em adição, na Unidade de Cirurgia Bariátrica do Hospital das Clínicas, aproximadamente, 80% dos pacientes submetidos à cirurgia bariátrica são do sexo feminino.

No presente estudo, a identificação de DEGs, a partir das análises de *microarray*, foi feita por Rank Products (RP). RP é um método não paramétrico, desenvolvido por Breitling *et al.* (2004) especificamente para esse propósito. Ele é baseado na classificação de todos os genes em todas as amostras por ordem decrescente de valor de expressão¹⁰⁶. Desta forma, os menores valores de RP indicam menor probabilidade de observar um gene no topo da lista de diferencialmente expressos (genes com expressão aumentada) ao acaso. O mesmo procedimento é feito para detectar os genes com expressão diminuída, mas classificando estes genes em ordem crescente de valor de expressão. No final, é gerada uma lista de genes com expressão aumentada e diminuída, baseada no percentual de falsos positivos estimados, também conhecido como FDR (False Discovery Rate)¹⁰⁷.

Nossos dados transcriptômicos possibilitaram a identificação da expressão alterada de conjuntos de genes em todos os segmentos gastrintestinais estudados após DGYR. Em particular, aqueles diferencialmente expressos nos segmentos intestinais (particularmente, no duodeno) se encaixaram consistentemente em vias biológicas que podem impactar a homeostase glicêmica. A identificação dessas vias foi possível por meio do emprego de diferentes ferramentas modernas de bioinformática.

A análise funcional dos DEGs (GO) permitiu classificar quais categorias de função molecular, processo biológico e componente celular foram alteradas significativamente em resposta à cirurgia. Essa classificação envolveu o mapeamento de o conjunto de anotações dos DEGs para um subconjunto específico de termos GO, com foco naqueles mais relevantes para DM2¹⁰⁸. No entanto, somente a análise de funções por GO pode ser deficiente na interpretação de resultados transcriptômicos, pois funções e processos biológicos geralmente envolvem mais de uma via, mais precisamente, vias interconectadas.

Para melhor identificação de redes gênicas e redes reguladoras que possam influenciar vias biológicas específicas, as análises de GO do presente estudo foram complementadas por análise de enriquecimento funcional (DAVID), e análise de vias canônicas e redes gênicas (IPA). A primeira teve a finalidade de identificar processos biológicos e vias mais representadas pelos DEGs gastrintestinais; a segunda buscou explorar mecanismos, vias e funções nos quais os DEGs estão envolvidos, a partir das relações estabelecidas entre eles. Ambos os métodos utilizam o teste Benjamin-Hochberg (ou FDR), que é o mais adequado para múltiplas categorias de genes por não assumir independência entre eles¹¹⁷. Outras ferramentas, como o PANTHERTM, utiliza o teste de Benferroni, o método mais rigoroso de correção de detecção falsa, mas que pode levar a uma perda substancial de dados (falsos negativos).

No presente estudo, dados transcriptômicos gastrintestinais foram correlacionados com dados bioquímicos sistêmicos de marcadores de homeostase glicêmica, obtidos em condições de jejum e frente a teste

alimentar. Entre eles, utilizou-se o índice QUICKI para identificação de resistência à insulina. Existem diversas maneiras de se avaliar a resistência insulínica, sendo o *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico considerado padrão-ouro. No entanto, o *clamp* é reservado a condições experimentais, devido à complexidade de execução. Estudos mostraram que o QUICKI é um índice preciso de sensibilidade à insulina, mais bem correlacionado ao padrão-ouro do que outros índices, como o HOMA^{118,119}.

Para o desafio alimentar, optou-se por utilizar dieta hipercalórica, com o objetivo de evitar a oferta de alta quantidade de líquido no pós-operatório. O teste de refeição após cirurgia bariátrica deve ser feito com uma dieta de baixo volume e normoglicídica, para evitar a síndrome de dumping. A alta densidade calórica da dieta presentemente utilizada é proveniente do aumento da proteína em sua composição. Além disso, esta possui quantidade adequada de carboidratos e tem sido utilizada em diversos estudos após cirurgia bariátrica¹²⁰⁻¹²².

5.3 Dos resultados

Os resultados não mostraram diferenças significativas entre grupos R e NR à remissão de DM2 frente a algumas características clínicas: 1) intensidade de perda de peso pós-operatória; 2) tempo de DM2 pré-operatório; 3) redução do consumo alimentar pós-operatório de energia e macronutrientes. Adiciona-se que apenas pacientes do grupo R apresentaram diminuição significativa das concentrações de insulina e peptídeo C no pós-operatório, em relação ao pré-operatório e, curiosamente, o GLP-1 aumentou igualmente em ambos os grupos perante teste de alimentação.

Com base no conjunto dessas observações, algumas hipóteses atualmente sugeridas pela literatura como responsáveis pela rápida homeostase glicêmica após DGYR perdem força, tais como a influência da perda de peso, menor consumo alimentar, tempo de DM2 e aumento do GLP-1. Outros mecanismos, portanto, podem estar envolvidos na remissão do DM2. Nesse sentido, os dados de classificação funcional de ontologia gênica,

enriquecimento funcional e de vias canônicas, e redes gênicas do presente estudo identificaram respostas transcriptômicas diferentes em cada segmento gastrointestinal, e algumas delas foram exclusivas de pacientes responsivos à remissão pós-operatória de DM2.

O segmento ECA, que representa o estômago remanescente no pós-operatório, apresentou características de função e manutenção celular como as mais predominantes nesse segmento, típico de um processo de adaptação em consequência da mudança anatômica cirúrgica. Aproximadamente, 80 a 90% dos genes diferencialmente expressos no pós-operatório nesse segmento apresentaram expressão aumentada. Em adição, observou-se aumento preditivo no transporte e oxidação lipídica, aumento de glicólise e metabolismo de proteínas, assim como aumento na função relacionada à sobrevivência do organismo. Os fatores de transcrição mais alterados foram os mesmos observados em pacientes com DM do tipo MODY, como, por exemplo, o aumento do HNF4A^{123,124}. Destacou-se, ainda, aumento do transportador de glicose GLUT-2 nesse segmento, evidenciando que o estômago remanescente possa ter maior transporte de glicose do enterócito para o plasma, por meio de transporte passivo, em adição à maior produção de substratos energéticos. Essas alterações em conjunto podem influenciar, em algum grau, o controle glicêmico após DGYR. Devido ao baixo número de amostras avaliadas nesse segmento no grupo R e à ausência de dados transcriptômicos desse segmento no grupo NR para comparação, não foi possível, entretanto, determinar se a resposta transcriptômica do ECA foi uma resposta padrão à cirurgia ou se esta pode ter alguma relação com o controle glicêmico observado em pacientes do grupo R.

O ECM, que representa o estômago excluído no pós-operatório, apresentou enriquecimento de vias associadas à interação e sinalização celular, movimento celular e função, e desenvolvimento do sistema hematológico. O que chamou a atenção nesse segmento foi a expressão aumentada do gene da grelina (GHL), que não estava alterada no estômago remanescente (ECA). As concentrações plasmáticas de grelina aumentaram no pós-operatório, porém não significativamente. Essas observações sugerem

que a grelina produzida no pós-operatório pode ser advinda do estômago excluído, ao invés do estômago remanescente. Assim como o ECA, o baixo número de amostras impossibilitou a comparação entre grupo R e NR; entretanto, a resposta transcriptômica à DGYR nesse segmento é sugestiva de uma resposta adaptativa para recuperação tecidual local ao estresse cirúrgico.

O duodeno foi o segmento que evidenciou resultados mais consistentes à hipótese do presente estudo, pelas razões apresentadas a seguir: em pacientes responsivos à DM2 1) foi o segmento intestinal que mais apresentou genes diferencialmente expressos dentro das 5 funções de interesse relacionadas à fisiopatologia do DM2, representando 33,9% do total dos genes alterados nesse segmento; 2) os resultados da classificação ontológica por GO e as análises de enriquecimento utilizando o *software* David, e os bancos de dados KEGG e Biocarta, bem como com as análises canônicas por IPA, apresentaram similaridade nos seus resultados, apontando a via LXR do intestino como a mais alterada; 3) os reguladores *upstreams* mais alterados nessa via se correlacionaram com inibição do DM2; 4) único segmento intestinal que apresentou correlação positivas fortes, e muito fortes de genes alteradamente expressos nesse segmento com a glicemia e HbA1c.

O jejuno foi o segmento que apresentou maior número de DEGs alterados após a cirurgia, assim como maior número de vias canônicas. Não houve similaridade entre as análises de classificação de ontologia gênica em pacientes do grupo R, que apresentou proliferação celular e resposta a estímulos químicos como os processos biológicos mais representados de acordo com GO, enquanto que as análises de DAVID e KEGG; mostraram alterações lipídicas, principalmente colesterol, como os processos mais alterados. Diferentemente do observado no duodeno, o jejuno de pacientes do grupo R mostrou aumento preditivo significativo de acúmulo de lipídeo intracelular, principalmente devido à ativação dos fatores de transcrição envolvidos na via LXR, levando à ativação preditiva do DM2. Além disso, no jejuno, observou-se diminuição preditiva significativa na função transporte de lipídeos e transporte de ácidos biliares, e aumento preditivo da concentração

de ácidos biliares sistêmicos. O aumento sistêmico de ácidos biliares é uma resposta benéfica da cirurgia, de tal forma que existe uma hipótese que sugere os ácidos biliares fundamentais na resolução do DM2 após DGYR⁵⁴. No presente estudo, alterações de genes envolvidos com os ácidos biliares foram, entretanto, encontradas em ambos os grupos, R e NR (SLC10A2 e NROB2). Essa observação sugere que, embora possa contribuir para o controle da glicemia, essa via não parece ser a mais representativa na homeostase glicêmica pós-operatória. Em adição, as análises de correlação de dados transcriptômicos com variáveis clínicas e bioquímicas não identificou nenhuma correlação muito forte nesse segmento intestinal. O que chamou atenção nesse segmento foram seis DEGs encontrados que mostraram predição, embora não significativa, na inibição da fisiopatologia do DM2, entre eles o gene REG1A, tema de nosso recente artigo científico (Apêndice A).

O íleo de pacientes do grupo R apresentou doenças inflamatórias, doenças neurológicas, e desordens musculares e esqueléticas entre as funções mais enriquecidas em resposta à DGYR. A resposta transcriptômica desse segmento, portanto, mostrou-se mais relacionada com o processo inflamatório. Foi observada alteração do metabolismo de ácido araquidônico (AA), que se associou com a inibição da síntese de citocinas. O regulador *upstream* que mostrou ter o maior efeito regulatório sobre as vias do íleo, foi o fator de transcrição SMAD3, envolvido na diferenciação do tecido conectivo, sendo análise IPA; mas não foi encontrada relação desse regulador *upstream* com DM2.

Em relação aos hormônios gastrintestinais, foram encontrados, nos pacientes do grupo R, aumento significativo dos genes precursores do hormônio GLP-1 (GCG) e GIP no segmento ECA, aumento do gene precursor da grelina (GHRL) no segmento ECM, diminuição da expressão do gene GCG no duodeno e inesperado aumento desse gene no duodeno do grupo NR. Também, observou-se aumento da expressão do gene GCG no jejuno e íleo de ambos os grupos R e NR. Nas análises sistêmicas, não foi encontrada diferença significativa desses hormônios no pós-operatório, com exceção do

hormônio GLP-1, que aumentou em ambos os grupos perante teste de alimentação.

O presente estudo identificou achados inéditos nos diferentes segmentos gastrintestinais que devem ser mais explorados. Nesse sentido, a correlação de seus dados com resultados de outras ômicas sistêmicas é tema do projeto temático SURMetaGIT⁸⁰, do qual o presente estudo faz parte. Um dos aspectos mais relevantes dos dados transcriptômicos presentemente explorados consiste na observação de que a via LXR, alterada exclusivamente no duodeno de pacientes do grupo R, se associou com diminuição de DM2. Dessa forma, a resposta transcriptômica do duodeno de pacientes responsivos à homeostase glicêmica será foco da presente discussão.

Os dados de enriquecimento funcional, de vias canônicas e redes gênicas mostraram de forma concordante que a resposta transcriptômica duodenal à DGYR em pacientes com remissão pós-operatória de DM2 se caracteriza por alteração da via LXR/RXR. Os receptores X do fígado (LXRs) são reguladores centrais da homeostase lipídica em mamíferos. A atividade de transcrição de LXRs depende da formação de heterodímeros com receptores de retinoide X (RXRs)¹²⁵. A biossíntese celular do colesterol ocorre, sequencialmente, nos peroxissomos e no retículo endotelial^{126,127}. Os peroxissomos têm como principais funções a oxidação e peroxidação de ácidos graxos, produzindo moléculas de acetil-CoA. Acetil-coA são precursoras de colesterol, sob a participação ativa da enzima HMGR (do inglês, *hydroxymethylglutaryl Co-A reductase*). As concentrações de colesterol celular são reguladas diretamente pela via do LXR/RXR e pela via do SREBP (do Inglês, *sterol-regulatory elemento-binding protein*), principalmente SREBP2. Quando as concentrações de esterol estão elevadas, os LXRs são ativados e a HMGR é degradada; mas, quando as concentrações de esterol estão baixas, a transcrição de HMGR é ativada por SREBP2^{128,129}.

Com base nas informações acima, que descrevem os mecanismos envolvidos na regulação da biossíntese do colesterol, é possível notar uma

clara inibição dessa via no pós-operatório de nossos pacientes responsivos à homeostase glicêmica. O principal marcador dessa inibição consiste na menor atividade de SREBP2, demonstrada em nossas análises bioinformáticas, e suportada por um aumento da atividade de INSIG e diminuição da expressão de LDLR. Ocorre que INSIG mantém SREBP sequestrada no RE e, portanto, inativa^{130,131}. Além disso, uma vez ativada, SREBP2 hiper-regula a transcrição de HMGR e LDLR (do Inglês, *low density lipoprotein receptor*), a fim de aumentar a biossíntese e captação de colesterol pelas células, respectivamente¹³².

LXR são capazes de inibir a expressão de SREBP2 e NPC1L1 (do Inglês, *Niemann Pick C-like-1*), reduzindo a biossíntese e recaptação de colesterol, respectivamente^{133,134}. Consistentemente, no presente estudo, a menor expressão de NPCL1 ocorreu em paralelo com a diminuição da atividade de SREBP2 em pacientes responsivos à homeostase glicêmica. NPC1L1 é um transportador não vesicular de colesterol localizado na membrana apical de enterócitos, para facilitar a reabsorção do colesterol (principalmente proveniente da bile) da luz intestinal para o interior celular¹²⁵. Em conjunto, nossos dados sugerem inibição de captação e síntese de colesterol no duodeno de pacientes do grupo R, em resposta à DGYR.

Outros transportadores de colesterol de membrana incluem os ABCs (do Inglês, *ATP binding cassette transporter*), entretanto, esses são essenciais para o efluxo de colesterol das células. LXRs também são capazes de reduzir o colesterol celular por hiper-regularem transportadores ABCs. ABCA1 regula a formação de HDL, mediando o efluxo de fosfolípidos e de colesterol livre das membranas celulares para apoA-I^{135,136}. De acordo com nossos dados, ABCA1 apresentou-se hiper-expresso no pós-operatório de pacientes com remissão de DM2, sugerindo aumento do efluxo de colesterol.

A possível relação entre inibição da biossíntese do colesterol e remissão de DM2 sugerida por nossos dados pode se relacionar com atenuação de estresse de retículo endoplasmático (ERE), aparentemente presente do pré-operatório de pacientes obesos responsivos à homeostase glicêmica induzida por DGYR. O RE é significativamente sensível à concentração intracelular de

colesterol. Particularmente, o comprometimento do efluxo de colesterol contribui para o acúmulo celular de lipídeos e pode induzir ERE¹³⁷.

Hiperglicemia crônica ou picos glicêmicos pós-prandiais podem modificar macromoléculas e culminar na geração de produtos de glicação avançada (PGA). Albumina modificada por PGA mostrou menor capacidade de remover colesterol em macrófagos por diminuir receptor de ABCA1. Estudo desenvolvido em nosso centro mostrou ainda que a exposição de macrófagos à albumina modificada por PGA de pacientes com DM2 induziu a expressão de proteínas chaperonas de forma tempo-dependente, característica de ERE. Nesse estudo, ERE foi associado à redução em 61% do conteúdo de ABCA1 e em 82% do efluxo de colesterol¹³⁸.

ERE é caracterizado por deficiência na função da organela de dobragem, montagem e secreção de proteínas, gerando o acúmulo de proteínas dobradas ou desdobradas no seu lúmen. Em resposta ao estresse, RE ativa uma via de transdução de sinal conhecida como UPR (do Inglês, *unfolded protein response*), permitindo que a célula lide com a demanda aumentada de proteínas na organela¹³⁹. Consistente com a hipótese de diminuição de estresse de retículo, as análises de vias canônicas destacaram inibição de INSIG como atenuação de resposta UPR.

Evidências robustas sugerem que a ativação das vias UPR pode modular o metabolismo lipídico, por meio do controle da regulação transcricional da lipogênese¹⁴⁰. Um dos principais reguladores da lipogênese é SRBP1¹⁴¹. De acordo com os achados do presente estudo, SRBP1 estava sob inibição preditiva nos pacientes responsivos à homeostase glicêmica. Existem 2 tipos de SREBP1, SREBP1a e SREBP1c, sendo o segundo a isoforma predominante. Enquanto SREBP-1a / -2 aumenta a transcrição de genes de síntese de colesterol, SREBP-1c é responsável pela regulação de genes envolvidos na síntese de ácidos graxos (AG) e triglicérides (TG)¹⁴².

Curiosamente, a clivagem proteolítica de SREBP-1c, necessária para sua transcrição no núcleo, não é afetada pela depleção de esteróis e sim estimulada pela insulina^{143,144}. Embora o mecanismo exato pelo qual a insulina estimula a clivagem de SREBP-1c não seja totalmente compreendido, tem

sido demonstrado que esta leva à fosforilação do SREBP-1c inativo ligado ao retículo endoplasmático (RE), aumentando seu processamento pós-tradução.

DM2 é caracterizado pelo aumento da lipogênese, bem como aumento do ERE e inflamação. LXR é induzido pela insulina e é um regulador chave do metabolismo lipídico. Promove a lipogênese e o efluxo de colesterol, mas inibe estresse e inflamação do retículo endoplasmático. Estudo recente em animais *knockout* para receptores de insulina ou também LXR mostrou que a insulina foi incapaz de induzir a expressão de genes lipogênicos na ausência de LXR, e LXR foi incapaz de induzir a expressão de genes lipogênicos na ausência de insulina. No entanto, a insulina não foi necessária para que LXR modulasse o perfil fosfolipídico, ou inibisse genes do estresse de RE ou de vias de inflamação. Estes dados mostram que a insulina é requerida especificamente para os efeitos lipogênicos de LXR e que a manipulação da via de sinalização de insulina pode dissociar os efeitos benéficos de LXR sobre o efluxo de colesterol, inflamação e *stress* de RE dos efeitos negativos sobre a lipogênese.

Cabe ressaltar que, muito embora a análise de vias canônicas mostrou inibição preditiva da via LXR/RXR, essa predição parece ter sido identificada pela diminuição preditiva da atividade de SRBP-1. Ocorre que SRBP-1 é um fator de transcrição importante para a lipogênese, que tem sua atividade estimulada por LXR/RXR. Por outro lado, marcadores da ativação dessa via também estavam em evidência, dois deles destacados como os mais relevantes (inibição de NCP1 e ativação de ABCA1). Esses dados são coerentes com uma menor ação de a insulina sobre LXR. Embora ambos pacientes R e NR à remissão de DM2 tenham apresentado diminuição sistêmica de insulina, na análise da área sobre a curva, apenas em paciente R essa diminuição foi significativa.

Cabe ressaltar, entretanto, que atividade de SREBP-1c pode também ser induzida por meio do receptor nuclear PPAR γ (do Inglês, peroxisome-proliferator-activated receptor- γ) desempenhando papel crítico na lipogênese¹⁴⁵. O PPAR γ ativado se heterodimeriza com RXR, resultando na expressão dos seus genes-alvo. Curiosamente, a LXR compete com PPAR α

para a heterodimerização de RXR α , reprimindo, assim, a sinalização de RXR α -PPAR α ¹⁴⁶. Nossos dados transcriptômicos sugerem que a via de PPAR está inibida no pós-operatório das pacientes com remissão de DM2, já que os genes marcadores dessa via APOC3, ACSL1 e MMP1 estavam reduzidos. É possível, portanto, que a inibição de SREBP1 possa também ter sido influenciada pela competição de LXR com PPAR para ligação com RXR. Além disso, a expressão gênica de ABCA1 também pode ser estimulada por AMP cíclico, por mecanismos distintos da via do LXR, mas ainda não elucidados^{147,148}. Um preditivo aumento de AMPc foi encontrado no presente estudo, o que pode estar associado à ativação de ABCA1.

Considerando-se que o acúmulo de colesterol intracelular pode levar a ERE e que este se caracteriza por aumento de lipogênese, em conjunto, nossos dados sugerem fortemente que DGYR melhora as concentrações de colesterol no enterócito melhorando ERE, via LXR. A melhora das concentrações intracelulares do colesterol é caracterizada pela diminuição de NCPL1 e aumento de ABCA1 (diminuindo captação e aumentando transporte extracelulares de colesterol, respectivamente) e inibição da atividade de SREBP2 na sua síntese intracelular. Essas alterações parecem contribuir para a homeostase do RE, refletida pela diminuição da lipogênese intracelular, principalmente pela inibição de SREBP1 e de vias que controlam sua ativação.

As alterações transcriptômicas induzidas por DGYR no duodeno de nossos pacientes responsivos à homeostase glicêmica têm coerência com benefícios clínicos pós-operatórios reportados pela literatura e observados parcialmente neste estudo. A primeira delas tem relação com o aumento ABCA1, gene que codifica a molécula responsável por exportar colesterol e iniciar o seu transporte reverso, aumentando a produção de HDL. Isso se correlaciona positivamente com nossos achados clínicos, que, embora a redução de HDL tenha sido significativa no pós-operatório em relação ao pré-operatório, o grupo R apresentou aumento de HDL dos 60 aos 90 dias, quase que voltando aos valores pré-operatórios da DGYR, enquanto o grupo NR apresentou diminuição progressiva dessa lipoproteína.

A segunda se relaciona com o perfil da alteração de marcadores do metabolismo de colesterol nos nossos pacientes responsivos à homeostase glicêmica e seu potencial impacto no aumento da síntese de ácidos biliares, por exemplo: NPC1L1 é capaz de neutralizar a ação de ABCG5 e ABCG8, para diminuir as concentrações de colesterol biliar¹⁴⁹, foi encontrado diminuição de NPC1L1; ABCA1 transfere o colesterol intracelular para partículas HDL que, posteriormente, o transferem para o fígado para síntese de ácidos biliares, foram encontrados aumento de ABCA1. Muito embora não tenha sido analisado a quantidade e o perfil de ácidos biliares em nossos pacientes, a literatura indica que DGYR se acompanha do aumento sistêmico de ácidos biliares e que estes podem estar relacionados com remissão pós-operatória de DM2. Nossos dados sugerem que alterações das concentrações de ácidos biliares podem advir da adaptação duodenal à cirurgia, com modificação do metabolismo do colesterol no enterócito.

Finalmente, evidências crescentes sugerem que os lipídeos plasmáticos são regulados por uma interação entre o metabolismo hepático e intestinal, capazes de sincronizar a homeostase lipídica¹⁴. Estudos indicam que o metabolismo lipídico intestinal de indivíduos com resistência à insulina difere-se de pacientes sensíveis à insulina. Mais especificamente, o duodeno parece ter papel importante na disfunção do metabolismo lipídico intestinal, com aumento da síntese, e secreção de lipídeos e lipoproteínas. Em adição, o duodeno de indivíduos resistentes à insulina apresenta alta expressão do gene SREBP^{150,151} e baixa expressão do gene ABCA1 (*ATP binding cassette transporter A1*), responsável, principalmente, pelo transporte o colesterol livre, diretamente para o sistema porta, por meio da membrana basolateral. Achados adicionais mostraram lipogênese elevada no duodeno de indivíduos com resistência à insulina, maior expressão do receptor LXR, e aumento da síntese de lipídeos e lipoproteínas^{14,150}.

Nossos dados transcritômicos, obtidos no duodeno de pacientes responsivos à remissão pós-operatória de DM2, mostraram uma inversão dessas alterações. Sugere-se, portanto, que a adaptação desse órgão às alterações anatômicas induzidas por DGYR pode estar relacionada com

homeostase glicêmica pós-operatória em pacientes obesos com DM2, por meio da melhora do perfil lipídico sistêmico. Sugere-se, ainda, que as alterações no metabolismo de colesterol e lipogênese identificadas pela análise canônica desse segmento podem ter aliviado estresse de RE nos enterócitos. Em última instância, esse benefício diminui estresse oxidativo e é coerente com aos achados transcriptômicos duodenais (que mostrou inibição preditiva da síntese de espécie reativa de oxigênio).

A diminuição do estresse oxidativo é coerente também com a análise de correlação dos marcadores transcriptômicos com marcadores da homeostase glicêmica sistêmica. Os dados desse estudo, mostraram correlação muito forte entre inibição do gene SLC7A11 e concentrações de HBA1c. Outras fortes correlações também foram encontradas, incluindo diminuição de MMP1 e concentrações de HBA1c, VLDL-c e triglicérides. Curiosamente, a diminuição de MMP1 foi observada apenas no duodeno de pacientes do grupo R, enquanto no duodeno de pacientes NR, a expressão de MMP1 estava aumentada. Durante análise do genoma de células vasculares primárias em resposta à hiperglicemia, Pirola e cols. encontraram um subconjunto de genes responsivos altamente expressos, que incluíram SLC7A11 e MMP1^{152,153}. O gene SLC7A11 codifica um antioxidante, conhecido como sistema Xc ou xCT; já MMP1 codifica a matriz metaloproteinase-1, envolvida na decomposição da matriz extracelular em processos fisiológicos normais; vias intracelulares que envolvem ROS ativam a expressão de MMP1¹⁵³.

5.4 Das limitações

No presente estudo, os dados transcriptômicos analisados nos diferentes segmentos gastrintestinais foram obtidos a partir de um número de biópsias menor do que o inicialmente estimado. Um dos fatores que contribuiu para isso foi a dificuldade de coletá-las no período pós-operatório. É sabido que, após DGYR, pode ocorrer acúmulo de líquido gástrico e do refluxo biliar duodenogástrico, promovendo um declínio do estômago excluído, bem como leve grau de estreitamento, que causa o aumento de aderência de alças

intestinais. Essas alterações podem ter contribuído para a restrição da passagem do enteroscópio em nossas pacientes. Adicionalmente, o próprio quadro de obesidade e o excesso de gordura na região abdominal de nossas pacientes foi um fator determinante na conclusão desta etapa, visto que nos períodos de exame estas ainda apresentavam peso corporal elevado.

Outro fator contribuinte consistiu na necessidade de se obter amostras de RNA adequadas para a avaliação da expressão genética por microarray. O sucesso desse método depende da quantidade e qualidade adequadas de RNA, e controle endógeno de genes. Nesse sentido, no presente estudo, as análises de microarrays foram realizada apenas em amostras com quantidade e qualidade de RNA adequadas (>100 ng/ μ L e número de integridade de RNA [RIN] ≥ 7 , como sugerido pelo fabricante do kit utilizado), obtidas em biópsias pareadas no pré e pós-operatório. Essa abordagem implicou em perdas de mais biópsias gastrintestinais, que não possibilitaram obtenção de RNA adequado para análises de microarray.

Cabe destacar, entretanto, que, para sobrepor a limitação do tamanho de nossa amostra, a análise dos genes obtidos pelo microarray foi feita por RP. RP é amplamente indicado para detecção de DEGs nos ensaios iniciais de microarrays em amostras biológicas pequenas¹⁰⁶. O método mostrou-se particularmente eficiente para este fim quando se analisam amostras heterogêneas, comuns em doenças complexas. A obesidade é uma doença complexa e fatores heterogêneos estão envolvidos em sua fisiopatologia, de modo que a resposta ao RYGB também deve ser diferente entre os indivíduos. Como um método não paramétrico e baseado em *rank*, o RP classifica os genes, com base em comparações múltiplas, e independe de uma estimativa da variância para medi-los^{106,154}. Essa característica confere ao método a capacidade de encontrar genes consistentemente desregulados em apenas um subgrupo de indivíduos¹⁵⁵⁻¹⁵⁸. Portanto, RP é particularmente adequado quando apenas um pequeno número de amostras biológicas está disponível.

Nesse sentido, embora o tamanho da amostra de nossas análises de microarray tenha sido menor do que o previamente definido (especialmente para biópsias gástricas), ele pode ter sido adequado, ao considerarmos que

os resultados obtidos pelo método foram confiáveis. Além disso, alterações de genes de interesse foram confirmadas durante validação numa amostra superior, por RT-qPCR. Esta técnica requer qualidade de RNA menos rigorosa (RIN >5) do que microarray para o seu desenvolvimento adequado, o que permitiu o melhor uso das amostras gastrointestinais.

Outra limitação de nosso estudo é a extensão das mudanças de fold-change nele observadas. Cabe ressaltar, entretanto, que existe muito debate sobre a validade da magnitude de fold-changes. Pelo menos metade de todos os estudos da literatura ignora transcrições com fold-changes menores que algum limiar subjetivamente escolhido, tipicamente cerca de 2-3 vezes¹⁵⁹. No entanto, quando se consideram apenas valores limiares elevados de *fold-change*, podemos perder informações biologicamente relevantes e interpretações biológicas *downstream*¹⁵⁹.

Estudos têm demonstrado que a maioria de RNAs informativos e transcritos diferencialmente expressos pode apresentar fold-changes inferiores a 2, uma vez que o enriquecimento de funções biologicamente relevantes ocorre mesmo sob fold-changes de RNA muito baixos. Um argumento enfoca a complexidade biológica: os tecidos geralmente contêm uma multiplicidade de diferentes tipos de células, cuja resposta a um determinado estímulo pode variar muito. Indivíduos obesos podem responder de forma diferente à DGYR, devido ao seu genótipo individual e à complexidade da doença. Os valores de fold-change relativamente modestos encontrados parecem refletir essa resposta variada¹⁵⁹⁻¹⁶². Além disso, o presente estudo comparou duas situações "normais", já que não há estresse fisiológico significativo após 90 dias de cirurgia. Essa situação difere-se de quando se comparam alterações de genes em tecidos normais e tumorais, que, normalmente, apresentam altos valores de *fold-change*, por exemplo.

Uma observação interessante do presente estudo foi a direção consistente entre os DEGs identificados por microarray e RT-qPCR, ambos com *fold-changes* semelhantes e de baixa magnitude. Microarray e RT-qPCR, muitas vezes, resultam em desacordos¹⁶⁰⁻¹⁶³. Estudos têm relatado que *fold-changes* menores que 1,4 por microarray geralmente apresentam pobre

correlação com RT-qPCR. Além disso, raramente, a correlação dos dados obtidos a partir dessas duas ferramentas, apresentam resultados estatisticamente significativos. Graças a isso, alguns estudos definem "validação" de resultados de microarrays usando seu acordo qualitativo (direção) e quantitativo com RT-qPCR.

No presente estudo, DEGs obtidos pelo microarray concordaram qualitativamente com dados de RT-qPCR, exibindo uma mudança semelhante de grau e direção (aumento/diminuição) em resposta ao RYGB. Os *fold-changes* obtidos por RT-qPCR foram, na maior parte, maiores do que os observados por microarray e ambas as análises (mesmo com baixos *fold-changes*) mostraram a mesma direção de regulação. O menor efeito observado no nível transcricional não exclui um efeito biológico significativo¹⁶⁴. Além disso, os dados mostraram uma significativa correlação de dados transcriptômicos gastrintestinais com marcadores da homeostase glicêmica que não deve ser ignorada.

6 CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Nas condições da presente pesquisa, podemos concluir que:

- Em resposta à DGYR, o transcriptoma gastrointestinal se altera em seus distintos segmentos e entre pacientes responsivos e não responsivos à remissão de DM2.
- Em pacientes responsivos à remissão de DM2, mas não em não responsivos, a alteração da via LXR se correlacionou com a inibição de DM2.
- A alteração da via LXR sugere diminuição de captação e síntese de colesterol, e aumento de seu efluxo; bem como, inibição de lipogênese. Essas alterações são sugestivas de melhora do perfil lipídico local e sistêmico e diminuição de estresse de retículo local, com possível melhora da função mitocondrial e restauração da homeostase glicêmica.

7 ANEXOS

7 ANEXOS

7.1 Anexo A – Aprovação do estudo pela Comissão de Ética para Análises de Projetos de Pesquisas do Hospital das Clínicas da FMUSP (CAPPesq).

APROVAÇÃO

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

Carta datada de 21/01/11:

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

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

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

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

CAPPesq, 24 de Fevereiro de 2011

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

7.2 Anexo B – Mudança de título e desmembramento do projeto temático pela CAPPesq.

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: Dan Linetzky Waitzberg

Área Temática: Genética Humana;

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

Versão: 5

CAAE: 19339913.0.0000.0068

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

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

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Outros

Detalhe: Desmembramento de projeto original em subprojeto para fins de nova pesquisa com

Justificativa: Ilmo. Sr.

Data do Envio: 22/11/2016

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.851.565

Apresentação da Notificação:

Trata-se de tramitação no CEP para desmembramento de projeto previamente aprovado com o título "Alterações na expressão gênica do tecido gástrico e intestinal de pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 2 submetidos à derivação gástrica em Y de Roux" que será apresentado tese de doutorado de Priscila Sala Kobal.

Objetivo da Notificação:

Desmembramento de projeto previamente aprovado para efeito de projeto de tese de doutorado.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Continuação do Parecer: 1.851.565

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Sem modificação.

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

Sem comentários.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Sem outras considerações.

Recomendações:

Sem recomendações adicionais.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Cientes.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	cartadesmembramentoCappesq.pdf	22/11/2016 15:47:51	Dan Linetzky Waitzberg	Acelto

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 06 de Dezembro de 2016

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

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

7.3 Anexo C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

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

II - DADOS SOBRE A PESQUISA

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

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

1 – justificativa e os objetivos da pesquisa

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

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

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

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

3 – Desconfortos e riscos esperados

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

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

4 – Benefícios que poderão ser obtidos

Não há benefício direto para o participante.

5 – Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo

Não há procedimentos alternativos.

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

1 – Garantia de acesso

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

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

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

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

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

3 – Direito de confidencialidade

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

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

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

5 – Despesas e compensações

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

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

Todo material coletado será utilizado exclusivamente para esse estudo.

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

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

VI - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

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

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

_____ Data ____/____/____

Assinatura do paciente/representante legal

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

_____ Data ____/____/____

Assinatura do pesquisador

7.4 Anexo D - Estudo piloto para determinar o número de biópsias necessárias para as análises de expressão gênica pelas técnicas de *microarray* e para a validação dos genes de interesse por RT-qPCR.

O presente estudo piloto foi realizado com amostras de diferentes pacientes que realizaram o exame de EDB como procedimento clínico de rotina e que aceitaram ser voluntários. Inicialmente fizemos o piloto com amostras de duodeno de 4 diferentes voluntários, a partir de 5, 10, 15 e 20 biópsias. Os resultados mostraram que 5 biópsias eram insuficientes para obter a quantidade mínima necessária de RNA para as análises de expressão gênica pela técnica de *microarray* e RT-qPCR. Observamos também que 20 biópsias apresentavam uma quantidade muito superior ao necessário. Dessa forma, já excluimos a opção de 5 ou 20 biópsias (Tabela 1).

A quantidade de 10 a 15 biópsias inicialmente pareceu ser a mais adequada, entretanto, observamos que os pacientes possuem diferentes quantidades de RNA expresso no tecido, como pode ser visto nas amostras 2 e 3 da Tabela 1.

Tabela 1 – Estudo piloto para determinação de quantidade adequada de amostra gastrointestinal, para as análises de expressão gênica do presente estudo.

Amostra	Tecido	Número de biópsias	Quantidade de RNA (ng/ μ L)
1	Duodeno	5	<100
2	Duodeno	10	647
3	Duodeno	15	666
4	Duodeno	20	1046
5	Jejuno	10	579
6	Jejuno	15	583
7	Ileo	10	248
8	Ileo	15	698

Realizamos novamente o piloto em diferentes voluntários, para análise de 10 e 15 biópsias no jejuno e íleo. Observamos novamente que a quantidade de RNA tinha grande variação entre indivíduos. Mesmo com números diferentes de biópsias, a quantidade de RNA foi similar com 10 e 15 biópsias no duodeno e jejuno. Entretanto, no piloto do íleo, observamos que a quantidade de RNA em 10 biópsias foi mais de 50% inferior em relação a

15 biópsias. A partir desses resultados concluímos que a variação entre indivíduos é alta. Dessa forma, optamos por coletar 15 biópsias, para evitar perda devido a diferença entre pacientes. O peso líquido aproximado de 15 biópsias foi de 15-20 mg. É importante ressaltar que durante todo o estudo, os exames foram bem-sucedidos, sem nenhuma intercorrência.

7.5 Anexo E - Estudo piloto para escolha do melhor método de extração e de armazenamento do RNA das biópsias gastrintestinais.

O presente piloto comparou dois diferentes métodos de extração: Trizol (Invitrogen™, EUA) e posterior purificação com o RNeasy Mini Kit (Qiagen™, Germany) vs extração e purificação direta com o Kit RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen™, Germany), para a escolha do método mais adequado para obter-se um RNA de boa qualidade, o mais íntegro possível em nossas amostras. Esse piloto também comparou amostra congelada vs amostra armazenada em produto para estabilização do RNA, o RNAlater (Ambion™, EUA), para identificação do método de armazenamento mais adequado para esse propósito.

Os resultados apresentados na Tabela 2 mostram que a o método de extração com uso do kit RNeasy Mini kit resultou em RNA de melhor integridade do que com o uso do método tradicional por Trizol. A integridade do RNA também pode ser vista na Figura 1, conforme destacado em vermelho, melhor integridade nas amostras 5 a 8.

Embora a quantidade de RNAlater disponível para o piloto tenha sido limitada a somente duas amostras, observamos que o uso de RNAlater não melhorou a integridade das amostras e que o método de congelamento é suficiente para manter boa integridade das amostras armazenadas. Dessa forma, optamos por conduzir o protocolo com o método de congelamento das amostras em freezer -80c e extração de RNA pelo kit mencionado. A qualidade das amostras foi identificada a partir do RIN (*RNA Integrity Number*), que pode variar de 0 a 10, em ordem crescente de integridade.

Tabela 2 - Resultado do estudo piloto para escolha do método de extração e armazenamento de amostras.

Amostra	Método de Extração	Método de Armazenamento	RIN
1	Trizol + Purificação	Congelado	6,5
2	Trizol + Purificação	Congelado	6,1
3	Trizol + Purificação	Congelado	5
4	Trizol + Purificação	RNAlater	1
5	RNeasy Mini Kit	RNAlater	8,8
6	RNeasy Mini Kit	Congelado	8,5
7	RNeasy Mini Kit	Congelado	9,6
8	RNeasy Mini Kit	Congelado	9,9

Figura 1– Integridade das amostras do estudo piloto visualizado por Bionalyzer

7.6 Anexo F - Estudo piloto para determinação do melhor controle endógeno para análises de RT-qPCR

Foi realizado um estudo comparativo para a seleção do gene endógeno mais apropriado para fins da presente pesquisa, no qual foram testados experimentalmente 4 genes de referência: gene 18S, *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH), beta 2 mioglobulina (B2M) e beta actina (ACTB).

Considerou-se o melhor controle endógeno aquele que apresentou menor variação entre as amostras e entre os segmentos. O gene 18S foi o que apresentou pior resultado, por amplificar muito rapidamente. A média de CT para o endógeno 18S foi de 12 e, quando o experimento alcançava o CT de 36, as amostras ficavam saturadas de amplificação não sendo possível calcular o valor de delta CT. Os genes endógenos GAPDH e ACTB apresentaram médias semelhantes de CT de 22, enquanto que o gene endógeno B2M apresentou média de CT de 19 (Figuras 1 a 4 respectivamente). Segundo os resultados do processo de normalização, o gene eleito como melhor endógeno para as amostras gastrintestinais foi o gene ACTB, por ter menor variação (menor escore entre as amostras) avaliados pelo software *Expresson Suíte®* da *Applied Biosystem*.

Gráfico 1 - Amplificação do gene endógeno 18S nas amostras gastrintestinais: A – estômago corpo alto e estômago corpo médio; B – duodeno e jejuno e C – íleo.

Gráfico 2 - Amplificação do gene endógeno GAPDH nas amostras gastrintestinais: A – estômago corpo alto e estômago corpo médio; B – duodeno e jejuno e C – íleo.

Gráfico 3 - Amplificação do gene endógeno B2M nas amostras gastrintestinais: A – estômago corpo alto e estômago corpo médio; B – duodeno e jejuno e C – íleo.

Gráfico 4 - Amplificação do gene endógeno ACTB nas amostras gastrintestinais: A – estômago corpo alto e estômago corpo médio; B – duodeno e jejuno e C – íleo.

7.7 Apêndice G – Medidas descritivas de peso e IMC e comparação dos 4 períodos avaliados (pré e pós-operatório 30, 60 e 90 dias) para os grupos responsivo e não responsivo à DGYR.

	Grupo	Momento	Mediana	Mínimo	Máximo	<i>IQ</i>	Valor p*	Diferença entre grupos Valor p**
Peso	Responsivo	Pré Op	113.2	83.5	143.6	21.33	<0.001	0.46
		30 dias	99.6	73.3	121.4	17.98		
		60 dias	94.9	70.5	116.9	21.88		
		90 dias	90.35	68.2	113.7	18.4		
	Não Responsivo	Pré Op	119.5	97.6	135.2	27.4	<0.001	
		30 dias	106.95	85.5	119.8	23.23		
		60 dias	103.8	82.3	117	24.9		
		90 dias	99.75	80.3	114	21.75		
IMC	Responsivo	Pré Op	46.42	37.11	57.52	7.32	<0.001	0.46
		30 dias	41.52	32.58	48.63	6.04		
		60 dias	39.65	31.33	46.83	6.74		
		90 dias	38.54	30.31	45.55	5.9		
	Não Responsivo	Pré Op	46.22	37.65	52.54	9.82	<0.001	
		30 dias	40.56	32.98	45	9.53		
		60 dias	39.86	31.75	43.87	9.38		
		90 dias	38.21	30.98	42.19	8.87		

* Análise não-paramétrica para medidas repetidas com 1 fator

** Análise não paramétrica para medidas repetidas

Legenda: IMC – índice de massa corporal; Pré Op – pré operatório; *IQ* – amplitude interquartil.
Me confirma depois se precisa, porque eu posso fazer para as outras.

7.8 Anexo H – Medidas descritivas das dosagens das medicações que foram utilizadas apenas no período pré-operatório.

Medicamento	Grupo	n	Mediana	Mínimo	Máximo
Acarbose (mg/dia) Pré Op	Responsivo Não Responsivo	2/12 (16.67%) 1/8 (12.5%)	200.00 600.00	100.00 600.00	300.00 600.00
Gliclazida (mg/dia) Pré Op	Responsivo Não Responsivo	5/12 (41.67%) 2/8 (25%)	60.00 200.00	30.00 80.00	90.00 320.00
Sitagliptina (mg/dia) Pré Op	Responsivo Não Responsivo	1/12 (8.33%) 0/8 (0%)	200.00 -	200.00 -	200.00 -
Ranitidina (mg/dia) Pré Op	Responsivo Não Responsivo	1/12 (8.33%) 0/8 (0%)	336.00 -	336.00 -	336.00 -
Orlistat (mg/dia) Pré Op	Responsivo Não Responsivo	2/12 (16.67%) 1/8 (12.5%)	420.00 360.00	360.00 360.00	480.00 360.00
Sibutramina (mg/dia) Pré Op	Responsivo Não Responsivo	2/12 (16.67%) 1/8 (12.5%)	12.50 15.00	10.00 15.00	15.00 15.00
Domperidona (mg/dia) Pré Op	Responsivo Não Responsivo	1/12 (8.33%) 1/8 (12.5%)	30.00 30.00	30.00 30.00	30.00 30.00
Alopurinol (mg/dia) Pré Op	Responsivo Não Responsivo	1/12 (8.33%) 0/8 (0%)	100.00 -	100.00 -	100.00 -

%; frequência relativa; Teste McNemar - valores apresentados como mediana (mínimo – máximo).

Legenda: mg – miligramas; Pré Op – pré operatório

7.9 Anexo I – Medidas descritivas dos medicamentos que foram usados no período pré-operatório e continuados por pelo menos um período pós-operatório (30 dias, 60 dias e 90 dias).

	Momento	Grupo Responsivo							Grupo Não Responsivo						
		n	Mediana	Mínimo	Máximo	%	Valor p*	Valor p**	n	Mediana	Mínimo	Máximo	%	Valor p*	Valor p**
Metformina (mg/dia)	Pré Op	10	2550.00	1500.00	2550.00	83.33	-	-	6	2550.00	850.00	2550.00	75.00	-	-
	30 dias	0	-	-	-	0.00	0.100	0.100	2	1125.00	750.00	1500.00	25.00	0.125	0.125
	60 dias	0	-	-	-	0.00	0.100	NA	1	1000.00	1000.00	1000.00	12.50	0.063	0.999
	90 dias	0	-	-	-	0.00	0.100	NA	1	1000.00	1000.00	1000.00	12.50	0.063	0.999
Glibenclamida (mg/dia)	Pré Op	4	15.00	10.00	40.00	33.33	-	-	3	10.00	10.00	30.00	37.50	-	-
	30 dias	0	-	-	-	0.00	0.100	0.100	0	-	-	-	0.00	0.200	0.200
	60 dias	0	-	-	-	0.00	0.100	NA	0	-	-	-	0.00	0.200	NA
	90 dias	0	-	-	-	0.00	0.100	NA	1	5.00	5.00	5.00	12.50	0.500	NA
Medicação para hipertensão (mg/dia)	Pré Op	11	80.00	40.40	640.00	91.67	-	-	7	130.00	25.00	200.00	87.50	-	-
	30 dias	7	90.40	50.00	260.00	58.33	0.125	0.125	3	50.00	20.00	200.00	37.50	0.125	0.125
	60 dias	6	100.20	60.00	190.00	50.00	0.063	0.999	3	50.00	20.00	75.00	37.50	0.125	0.999
	90 dias	5	110.00	60.00	150.00	41.67	0.031	0.500	3	50.00	20.00	100.00	37.50	0.125	0.999
Medicação para colesterol/TG (mg/dia)	Pré Op	6	45.00	20.00	120.00	50.00	-	-	3	20.00	20.00	40.00	37.50	-	-
	30 dias	2	50.00	20.00	80.00	16.67	0.125	0.125	1	20.00	20.00	20.00	12.50	0.5	0.500
	60 dias	1	20.00	20.00	20.00	8.33	0.063	0.999	1	20.00	20.00	20.00	12.50	0.5	0.999
	90 dias	1	20.00	20.00	20.00	8.33	0.063	0.999	1	20.00	20.00	20.00	12.50	0.5	0.999
Inibidores da bomba de prótons (mg/dia)	Pré Op	7	40.00	20.00	40.00	58.33	-	-	2	20.00	20.00	20.00	25.00	-	-
	30 dias	12	20.00	20.00	40.00	100.00	0.044	0.044	6	40.00	20.00	40.00	75.00	0.219	0.219
	60 dias	10	30.00	20.00	40.00	83.33	0.375	0.4608	5	40.00	20.00	40.00	62.50	0.375	0.999
	90 dias	9	20.00	20.00	40.00	75.00	0.625	0.999	3	40.00	20.00	40.00	37.50	0.999	0.500
Aspirina (mg/dia)	Pré Op	8	100.00	100.00	100.00	66.67	-	-	3	100.00	100.00	100.00	37.50	-	-
	30 dias	0	-	-	-	0.00	0.002	NA	1	100.00	100.00	100.00	12.50	0.500	0.500
	60 dias	0	-	-	-	0.00	0.002	NA	1	100.00	100.00	100.00	12.50	0.500	0.999
	90 dias	0	-	-	-	0.0	0.002	NA	1	100.00	100.00	100.00	12.50	0.500	0.999
Fluoxetina ou medicação para depressão (mg/dia)	Pré Op	5	20.00	20.00	50.00	41.67	-	-	3	40.00	20.00	40.00	37.50	-	-
	30 dias	1	20.00	20.00	20.00	8.33	0.125	0.125	2	30.00	20.00	40.00	25.00	0.99	0.999
	60 dias	0	-	-	-	0.00	0.044	0.999	2	55.50	40.00	71.00	25.00	0.999	0.999
	90 dias	1	20.00	20.00	20.00	8.33	0.125	0.999	2	45.00	20.00	70.00	25.00	0.999	0.999
Tratamento para asma (vezes/dia)	Pré Op	3	3.00	1.00	6.00	25.00	-	-	0	-	-	-	0.00	-	-
	30 dias	2	2.00	1.00	3.00	16.67	0.999	0.999	0	-	-	-	0.00	NA	NA
	60 dias	2	2.00	1.00	3.00	16.67	0.999	0.999	0	-	-	-	0.00	NA	NA
	90 dias	1	1.00	1.00	1.00	8.33	0.5	0.999	0	-	-	-	0.00	NA	NA
Vit A e D Adtil (gotas/dia)	Pré Op	2	6.00	4.00	8.00	16.67	-	-	0	-	-	-	0.00	-	-
	30 dias	5	10.00	10.00	10.00	41.67	0.453	0.453	3	10.00	10.00	10.00	37.50	0.200	0.200
	60 dias	4	10.00	10.00	10.00	33.33	0.687	0.999	4	10.00	10.00	30.00	50.00	0.083	0.999
	90 dias	4	10.00	10.00	15.00	33.33	0.687	0.999	4	12.50	10.00	30.00	50.00	0.083	0.999
Sulfato Ferroso (mg/dia)	Pré Op	1	80.00	80.00	80.00	8.33	-	-	0	-	-	-	0.00	-	-
	30 dias	10	40.00	40.00	40.00	83.33	0.004	0.004	5	40.00	40.00	40.00	62.50	0.031	0.031
	60 dias	10	40.00	40.00	80.00	83.33	0.004	0.999	5	40.00	40.00	80.00	62.50	0.031	0.999
	90 dias	11	40.00	40.00	80.00	91.67	0.002	0.999	6	40.00	40.00	80.00	75.00	0.009	0.999

* Teste da comparação com o momento pré-operatório;

** Teste da comparação com o momento imediatamente anterior. Em preto: teste de McNemar para comparação de dois momentos pareados; em vermelho: teste para comparação de duas proporções; NA: não foi possível realizar a comparação pois nenhum indivíduo fez uso de medicamento em nenhum dos dois momentos em avaliação.

7.10 Anexo J – Medidas descritivas do consumo de macronutrientes e comparação dos períodos pré e 90 dias pós-operatório para os grupos responsivo e não responsivo à DGYR

	Grupo	Mediana	Mínimo	Máximo	IQ	Valor p*	Diferença entre grupos Valor p**
CAL	Responsivo Pré Op	1744.40	972.33	2370.71	560.97	<0.001	0.57
	Responsivo Pós Op 90 dias	1073.92	666.92	1382.85	353.00		
CAL	Não Responsivo Pré Op	1604.09	1172.43	2625.03	652.42	<0.001	
	Não Responsivo Pós Op 90 dias	921.08	514.93	1239.73	272.18		
CHO (g)	Responsivo Pré Op	203.33	120.13	287.69	44.95	<0.001	0.96
	Responsivo Pós Op 90 dias	103.11	70.70	166.20	57.30		
CHO (g)	Não Responsivo Pré Op	203.83	150.28	348.52	81.27	<0.001	
	Não Responsivo Pós Op 90 dias	100.17	65.66	134.41	48.63		
PTN (g)	Responsivo Pré Op	74.62	43.02	96.69	37.07	0.0025	0.28
	Responsivo Pós Op 90 dias	52.40	31.13	79.58	25.49		
PTN (g)	Não Responsivo Pré Op	67.78	47.98	77.00	13.53	0.002	
	Não Responsivo Pós Op 90 dias	40.49	22.54	82.70	13.87		
GORDTOT (g)	Responsivo Pré Op	63.85	34.83	95.42	25.20	<0.0001	0.41
	Responsivo Pós Op 90 dias	40.33	28.22	52.89	16.51		
GORDTOT (g)	Não Responsivo Pré Op	60.14	36.64	99.52	29.04	<0.0001	
	Não Responsivo Pós Op 90 dias	34.81	19.11	44.01	16.20		
GMONO (g)	Responsivo Pré Op	16.71	8.19	33.08	8.20	0.0045	0.20
	Responsivo Pós Op 90 dias	12.75	7.21	17.23	6.44		
GMONO (g)	Não Responsivo Pré Op	15.16	11.24	26.28	9.96	0.00116	
	Não Responsivo Pós Op 90 dias	11.30	4.72	13.09	6.21		
GPOLI (g)	Responsivo Pré Op	12.25	7.43	16.65	5.35	<0.0001	0.96
	Responsivo Pós Op 90 dias	8.51	5.73	10.49	2.79		
GPOLI (g)	Não Responsivo Pré Op	12.65	6.51	18.26	6.63	<0.0001	
	Não Responsivo Pós Op 90 dias	8.89	5.73	10.29	3.63		
continua							

continua

						conclusão
	Grupo	Mediana	Mínimo	Máximo	<i>IQ</i>	Valor p*
						Diferença entre grupos Valor p**
GSAT (g)	Responsivo Pré Op	15.70	8.08	28.16	8.13	0.0027
	Responsivo Pós Op 90 dias	9.46	6.33	17.29	6.17	
GSAT (g)	Não Responsivo Pré Op	16.45	11.33	25.38	9.73	<0.0001
	Não Responsivo Pós Op 90 dias	7.69	5.20	13.44	5.46	
FTOTAIS (g)	Responsivo Pré Op	14.79	6.46	24.57	9.42	<0.0001
	Responsivo Pós Op 90 dias	8.68	4.07	16.49	6.00	
FTOTAIS (g)	Não Responsivo Pré Op	13.24	10.20	31.13	9.27	<0.0001
	Não Responsivo Pós Op 90 dias	8.41	4.75	11.90	5.12	

* análise não paramétrica para medidas repetidas com 1 fator

** análise não paramétrica para medidas repetidas

Legenda: CAL – calorias; CHO – carboidratos; PTN – proteínas; GORDTOT – gorduras totais; GMONO – gorduras monoinsaturadas; GPOLI – gorduras poli-insaturadas; GSAT – gorduras saturadas; FTOTAIS – fibras totais; g – gramas; Pré Op – pré operatório; IQ – amplitude interquartil

7.11 Anexo K – Medidas descritivas das variáveis bioquímicas e os testes para a comparação dos períodos para os grupos responsivo e não responsivo à DGYR.

	Grupo	Momentos	n	Mediana	Mínimo	Máximo	IQ	Valor p*	Comparação com pré op**	Comparação com momento anterior**
Glicose	R	Pré Op	20	200	77	321	88.75	<0.001		
		30 dias	20	121	101	167	21		0.0017	0.0017
		60 dias	20	107	81	135	25.75		<0.001	<0.001
		90 dias	20	91.5	75	153	18.5		<0.001	0.0229
	NR	Pré Op	20	216	166	338	148.5	<0.001		
		30 dias	20	119	96	226	74.25		<0.001	<0.001
		60 dias	20	93.5	64	202	66.25		<0.001	0.0015
		90 dias	20	111.5	87	159	37.75		<0.001	0.066

* Análise não paramétrica para medidas repetidas com 1 fator ** teste não-paramétrico para medidas repetidas. Legenda: R – responsivo; NR – não responsivo; Pré Op – pré-operatório; IQ – amplitude interquartil

	Grupo	Momentos	n	Mediana	Mínimo	Máximo	IQ	Valor p*	Comparação com pré op**	Comparação com momento anterior**
HbA1c	R	Pré op	12	8.60	6.30	12.80	2.78	<0.001		
		Pós Op 90 dias	11	6.20	5.10	6.60	0.80		<0.001	<0.001
	NR	Pré Op	8	9.70	7.90	11.00	2.48	<0.001		
		Pós Op 90 dias	8	6.10	5.80	7.30	0.80		<0.001	<0.001

* Análise não paramétrica para medidas repetidas com 1 fator ** teste não-paramétrico para medidas repetidas. Legenda: R – responsivo; NR – não responsivo; Pré Op – pré-operatório; IQ – amplitude interquartil

	Grupo	Momentos	N	Mediana	Mínimo	Máximo	IQ	Valor p*	Comparação com pré op**	Comparação com momento anterior**
Insulina	R	Pré Op	11	18.1	13.4	51.5	9.8	<0.001		
		30 dias	12	12.15	6.3	26	7.03		<0.001	<0.001
		60 dias	12	8.75	4.7	12.1	4.4		<0.001	<0.001
		90 dias	11	7.5	4.1	16.7	5.8		<0.001	0.8197
	NR	Pré Op	8	12.9	5	43.6	6.73	0.3948		
		30 dias	7	10.6	4.5	16.5	8			
		60 dias	8	9.95	5	19.2	6.48			
		90 dias	6	7.85	5.4	14.9	4.1			

* Análise não paramétrica para medidas repetidas com 1 fator ** teste não-paramétrico para medidas repetidas. Legenda: R – responsivo; NR – não responsivo; Pré Op – pré-operatório; IQ – amplitude interquartil

	Grupo	Momentos	N	Mediana	Mínimo	Máximo	IQ	Valor p*	Comparação com pré op**	Comparação com momento anterior**
Peptídeo C	R	Pré Op	11	4.2	2.6	7.3	1.8	<0.001		
		30 dias	12	3.75	2.7	5.9	1.03		0.3793	0.3793
		60 dias	12	3.05	2.1	6	1.2		0.0742	0.0065
		90 dias	11	2.5	2.1	3.3	1		0.0144	0.0176
	NR	Pré Op	8	3.45	1.8	5.3	2.98	0.3140		
		30 dias	7	3.8	1.5	5	1.8			
		60 dias	8	3.1	1.4	3.9	1.68			
		90 dias	6	2.75	1.5	3.9	1.28			

* Análise não paramétrica para medidas repetidas com 1 fator ** teste não-paramétrico para medidas repetidas. Legenda: R – responsivo; NR – não responsivo; Pré Op – pré-operatório; IQ – amplitude interquartil

	Grupo	Momentos	n	Mediana	Mínimo	Máximo	IQ	Valor p*	Comparação com pré op**	Comparação com momento anterior**
Colesterol Total	R	Pré Op	12	161	139	318	38	0.0066		
		30 dias	12	182	91	237	41		0.2125	0.2125
		60 dias	12	160	124	255	44		0.0441	0.2085
		90 dias	12	137.5	116	260	48		0.0032	0.0161
	NR	Pré Op	8	192	173	240	22	<0.001		
		30 dias	7	175	140	270	26		0.0736	0.0736
		60 dias	8	164.5	132	254	75		0.019	0.3063
		90 dias	8	154.5	125	229	22		<0.001	0.084

* Análise não paramétrica para medidas repetidas com 1 fator ** teste não-paramétrico para medidas repetidas

	Grupo	Momentos	n	Mediana	Mínimo	Máximo	IQ	Valor p*	Comparação com pré op**	Comparação com momento anterior**
HDL-c	R	Pré Op	12	47.00	27.00	62.00	20.75	0.023		
		30 dias	12	44.00	22.00	52.00	14.50		0.0017	0.0017
		60 dias	12	41.50	21.00	64.00	21.00		0.2295	0.1428
		90 dias	12	46.00	24.00	58.00	17.25		0.3741	0.5752
	NR	Pré Op	8	42.50	37.00	65.00	11.00	0.002		
		30 dias	7	40.00	31.00	58.00	10.00		0.3204	0.3204
		60 dias	8	43.50	31.00	63.00	18.25		0.627	0.627
		90 dias	8	39.50	31.00	60.00	19.50		0.3589	0.3232

* Análise não paramétrica para medidas repetidas com 1 fator ** teste não-paramétrico para medidas repetidas. Legenda: R – responsivo; NR – não responsivo; Pré Op – pré-operatório; IQ – amplitude interquartil

	Grupo	Momentos	n	Mediana	Mínimo	Máximo	IQ	Valor p*	Comparação com pré op**	Comparação com momento anterior**
LDL-c	R	Pré Op	12	110.50	31.00	149.00	29.75	0.0257		
		30 dias	12	96.00	68.00	230.00	36.75		0.1463	0.1463
		60 dias	12	90.00	63.00	161.00	26.75		0.0742	0.5955
		90 dias	12	72.00	64.00	167.00	45.00		0.0144	0.0144
	NR	Pré Op	8	115.50	97.00	172.00	28.75	0.0011		
		30 dias	7	100.00	81.00	210.00	32.00		0.2049	0.2049
		60 dias	8	100.00	72.00	179.00	77.75		0.1837	0.6046
		90 dias	8	86.50	72.00	155.00	28.00		0.004	0.065

* Análise não paramétrica para medidas repetidas com 1 fator ** teste não-paramétrico para medidas repetidas. Legenda: R – responsivo; NR – não responsivo; Pré Op – pré-operatório; IQ – amplitude interquartil

	Grupo	Momentos	n	Mediana	Mínimo	Máximo	IQ	Valor p*	Comparação com pré op**	Comparação com momento anterior**
VLDL-c	R	Pré Op	12	27.50	16.00	40.00	12.00	0.003		
		30 dias	12	30.00	20.00	42.00	17.00		0.2332	0.2332
		60 dias	12	24.00	15.00	40.00	11.00		0.317	<0.001
		90 dias	12	21.00	11.00	46.00	5.00		0.0142	0.0956
	NR	Pré Op	8	27.00	17.00	43.00	17.00	0.0224		
		30 dias	7	27.00	19.00	45.00	17.00		0.6677	0.6677
		60 dias	8	20.00	16.00	35.00	13.00		0.0638	0.004
		90 dias	8	20.50	12.00	37.00	7.00		0.0465	0.8959

* Análise não paramétrica para medidas repetidas com 1 fator ** teste não-paramétrico para medidas repetidas. Legenda: R – responsivo; NR – não responsivo; Pré Op – pré-operatório; IQ – amplitude interquartil

	Grupo	Momentos	n	Mediana	Mínimo	Máximo	IQ	Valor p *	Comparação com pré op **	Comparação com momento anterior **
TG	R	Pré Op	12	136.00	81.00	199.00	59.25	0.0031		
		30 dias	12	151.50	101.00	211.00	83.25		0.2247	0.2247
		60 dias	12	120.00	77.00	199.00	57.25		0.3438	<0.001
		90 dias	12	104.50	57.00	232.00	28.00		0.0139	0.0902
	NR	Pré Op	8	135.50	84.00	215.00	84.75	0.0277		
		30 dias	7	137.00	95.00	226.00	85.00		0.8079	0.8079
		60 dias	8	101.50	82.00	177.00	65.75		0.0918	0.0044
		90 dias	8	102.50	60.00	185.00	35.25		0.0767	0.9738

* Análise não paramétrica para medidas repetidas com 1 fator ** teste não-paramétrico para medidas repetidas. Legenda: R – responsivo; NR – não responsivo; Pré Op – pré-operatório; IQ – amplitude interquartil; TG – triglicerídeos

7.12 Anexo L – Medidas descritivas de glicose e insulina e comparação dos 5 tempos do teste de refeição pré-operatório e pós-operatório de 90 dias da DGYR.

Grupo	Instante	Momentos	n	Mediana	Mínimo	Máximo	IQ	Valor p *
Glicose Responsivo	0 min	Pré Op	11	210	145	321	93	0.002
		Pós Op 90 dias	10	91.5	75	153	14.25	
	30 min	Pré Op	11	248	187	403	76	0.002
		Pós Op 90 dias	10	188	119	272	41.75	
	60 min	Pré Op	11	265	206	415	109	0.002
		Pós Op 90 dias	10	129	101	223	59.5	
	90 min	Pré Op	11	277	185	397	105	0.002
		Pós Op 90 dias	10	109.5	73	255	41.75	
	120 min	Pré Op	11	254	159	394	66	0.002
		Pós Op 90 dias	10	97.5	74	169	26.5	
Glicose Não Responsivo	0 min	Pré Op	6	262.5	166	338	167.5	0.031
		Pós Op 90 dias	6	110	87	159	37.5	
	30 min	Pré Op	6	321	203	373	149.75	0.063
		Pós Op 90 dias	6	214	167	243	40.75	
	60 min	Pré Op	6	336	230	427	170	0.031
		Pós Op 90 dias	6	179.5	156	241	76	
	90 min	Pré Op	6	324	228	431	173	0.031
		Pós Op 90 dias	6	143.5	98	210	59.5	
	120 min	Pré Op	6	302	194	394	164.75	0.031
		Pós Op 90 dias	6	123	89	181	61.25	

continua

conclusão

Grupo	Instante	Momentos	n	Mediana	Mínimo	Máximo	IQ	Valor p
Insulina Responsivo	0 min	Pré Op	10	17.45	13.4	51.5	11.98	0.008
		Pós Op 90 dias	9	7.8	4.1	16.7	8.75	
	30 min	Pré Op	11	38.5	20.1	70.6	29.8	0.002
		Pós Op 90 dias	10	87	31.8	177.3	67.15	
	60 min	Pré Op	11	38.1	17.2	102.5	30.8	0.492
		Pós Op 90 dias	10	42.8	21.2	64.6	31.28	
	90 min	Pré Op	11	35.1	14	104.8	35.4	0.160
		Pós Op 90 dias	10	14.5	9.3	159.6	10.75	
	120 min	Pré Op	10	32.5	15.9	59.3	26	0.012
		Pós Op 90 dias	10	9.95	6.3	30.5	5.05	
Insulina Não Responsivo	0 min	Pré Op	6	11.85	5	15.4	7.48	0.188
		Pós Op 90 dias	5	7.8	5.4	8.6	2.4	
	30 min	Pré Op	6	26.75	11.4	58.4	30.65	0.031
		Pós Op 90 dias	6	71.65	21.9	147.3	65.85	
	60 min	Pré Op	6	27.2	19	53.5	21.68	0.031
		Pós Op 90 dias	6	52.35	28.2	103.1	41.75	
	90 min	Pré Op	6	28.7	14.9	47.3	20.78	0.313
		Pós Op 90 dias	6	23.15	12.5	40.8	24.55	
	120 min	Pré Op	6	21.3	12.5	30	16.75	0.031
		Pós Op 90 dias	6	13.05	10	23.9	12.18	

* Testes não-paramétrico de Wilcoxon Legenda: min - minutos; Pré Op – pré operatório; Pós Op – pós-operatório; IQ – amplitude interquartil

7.13 Anexo M - Medidas descritivas das variáveis hormonais e análise de comparação dos períodos (pré-operatório e pós-operatório 90 dias) em cada tempo do teste de alimentação.

	Instantes	Momentos	n	Mediana	Mínimo	Máximo	<i>IQ</i>	Valor p *
Grelina Responsivo	0 min	Pré Op	11	26.953	19.574	72.713	29.864	0.999
		Pós Op 90 dias	11	31.846	16.695	187.850	18.229	
	30 min	Pré Op	11	38.001	17.120	125.263	29.268	0.770
		Pós Op 90 dias	10	28.451	16.885	189.204	24.348	
	60 min	Pré Op	11	35.462	17.960	81.833	31.955	0.492
		Pós Op 90 dias	10	27.285	12.930	139.220	14.927	
	90 min	Pré Op	11	28.250	19.176	64.045	24.540	0.846
		Pós Op 90 dias	10	25.315	18.597	204.850	43.501	
	120 min	Pré Op	11	31.189	18.597	66.548	26.319	0.999
		Pós Op 90 dias	10	22.443	8.010	188.896	44.797	
Grelina Não Responsivo	0 min	Pré Op	6	28.760	22.121	63.444	36.123	0.688
		Pós Op 90 dias	6	35.466	19.230	108.407	34.823	
	30 min	Pré Op	6	27.276	24.205	65.948	33.283	0.563
		Pós Op 90 dias	6	33.651	14.810	122.879	61.892	
	60 min	Pré Op	6	37.266	23.832	62.558	34.155	0.844
		Pós Op 90 dias	6	33.498	19.960	260.213	121.168	
	90 min	Pré Op	6	33.197	23.832	61.103	29.879	0.438
		Pós Op 90 dias	6	31.855	18.600	113.476	84.372	
	120 min	Pré Op	6	33.183	22.497	61.680	29.131	0.219
		Pós Op 90 dias	6	27.875	14.180	52.610	15.960	

continua

continuação

	Instantes	Momentos	n	Mediana	Mínimo	Máximo	<i>IQ</i>	Valor p *
GIP Responsivo	0 min	Pré Op	11	244.767	64.763	711.649	166.744	0.067
		Pós Op 90 dias	11	184.536	27.190	265.639	174.660	
	30 min	Pré Op	11	1576.000	234.459	2074.000	636.000	0.695
		Pós Op 90 dias	10	1288.618	290.861	2508.500	1027.297	
	60 min	Pré Op	11	1164.000	278.448	1982.500	926.805	0.049
		Pós Op 90 dias	10	686.620	200.279	1067.000	309.973	
	90 min	Pré Op	11	679.804	276.140	1604.500	602.080	0.105
		Pós Op 90 dias	10	497.383	183.033	1100.324	295.739	
	120 min	Pré Op	11	679.951	320.849	1283.500	526.824	0.006
		Pós Op 90 dias	10	356.813	109.285	754.260	157.373	
GIP Não Responsivo	0 min	Pré Op	6	219.144	68.245	935.288	593.806	0.063
		Pós Op 90 dias	6	110.320	22.554	189.574	113.725	
	30 min	Pré Op	6	1449.500	813.776	1757.000	720.306	0.844
		Pós Op 90 dias	6	1181.112	769.370	2077.500	1181.973	
	60 min	Pré Op	6	1189.250	560.764	1411.000	692.417	0.094
		Pós Op 90 dias	6	544.205	290.560	1076.000	533.883	
	90 min	Pré Op	6	1104.750	577.568	1540.000	672.190	0.031
		Pós Op 90 dias	6	515.729	242.720	1105.000	751.462	
	120 min	Pré Op	6	480.717	129.846	972.093	550.340	0.156
		Pós Op 90 dias	6	310.995	179.680	408.060	218.888	

continua

continuação

	Instantes	Momentos	n	Mediana	Mínimo	Máximo	IQ	Valor p *
GLP-1 Responsivo	0 min	Pré Op	11	4.829	2.140	8.550	3.482	0.206
		Pós Op 90 dias	11	3.181	.980	12.520	3.947	
	30 min	Pré Op	11	9.075	4.330	13.363	7.351	0.010
		Pós Op 90 dias	10	25.079	4.083	51.580	30.841	
	60 min	Pré Op	11	6.670	2.641	10.362	5.756	0.020
		Pós Op 90 dias	10	11.482	2.319	27.386	10.390	
	90 min	Pré Op	11	5.926	3.270	14.390	4.428	0.625
		Pós Op 90 dias	10	7.037	2.028	22.538	5.830	
	120 min	Pré Op	11	6.484	2.779	17.960	8.570	0.557
		Pós Op 90 dias	10	6.960	1.700	15.002	7.671	
GLP-1 Não Responsivo	0 min	Pré Op	6	4.365	2.140	8.553	2.500	0.094
		Pós Op 90 dias	6	2.505	1.230	9.206	3.224	
	30 min	Pré Op	6	6.617	5.815	43.513	10.560	0.156
		Pós Op 90 dias	6	34.263	5.630	44.718	24.790	
	60 min	Pré Op	6	4.930	3.570	19.976	4.284	0.844
		Pós Op 90 dias	6	5.945	2.700	17.403	5.544	
	90 min	Pré Op	6	5.691	4.363	12.491	5.317	0.999
		Pós Op 90 dias	6	5.490	1.770	25.146	7.188	
	120 min	Pré Op	6	4.765	2.537	8.960	2.550	0.438
		Pós Op 90 dias	6	2.856	2.060	12.780	4.129	

continua

continuação

	Instantes	Momentos	n	Mediana	Mínimo	Máximo	<i>IQ</i>	Valor p *
Glucagon Responsivo	0 min	Pré Op	11	147.274	53.490	249.594	90.230	0.001
		Pós Op 90 dias	11	44.575	22.550	79.190	25.180	
	30 min	Pré Op	11	189.651	95.110	439.730	127.260	0.084
		Pós Op 90 dias	10	103.521	40.140	243.478	62.924	
	60 min	Pré Op	11	160.827	44.790	340.358	101.646	0.037
		Pós Op 90 dias	10	82.751	40.689	139.479	57.522	
	90 min	Pré Op	11	153.675	41.959	241.135	107.353	0.037
		Pós Op 90 dias	10	74.289	40.132	129.980	69.496	
	120 min	Pré Op	11	109.722	34.120	235.560	65.865	0.020
		Pós Op 90 dias	10	61.998	24.430	131.223	59.318	
Glucagon Não Responsivo	0 min	Pré Op	6	132.359	49.382	211.147	103.800	0.031
		Pós Op 90 dias	6	36.315	26.330	103.830	29.034	
	30 min	Pré Op	6	184.880	67.867	368.780	154.888	0.063
		Pós Op 90 dias	6	109.053	41.932	199.861	84.860	
	60 min	Pré Op	6	141.039	60.540	383.310	159.231	0.063
		Pós Op 90 dias	6	71.949	29.220	88.770	32.752	
	90 min	Pré Op	6	128.626	63.751	315.996	99.874	0.063
		Pós Op 90 dias	6	87.319	22.550	155.935	100.557	
	120 min	Pré Op	6	126.610	32.147	223.416	120.235	0.094
		Pós Op 90 dias	6	45.015	24.902	139.220	97.857	

continua

conclusão

	Instantes	Momentos	n	Mediana	Mínimo	Máximo	<i>IQ</i>	Valor p *
PYY Responsivo	0 min	Pré Op	11	283.130	146.664	949.031	614.204	0.002
		Pós Op 90 dias	11	119.230	20.960	207.493	142.739	
	30 min	Pré Op	11	652.825	229.167	1230.000	668.737	0.999
		Pós Op 90 dias	10	592.190	110.890	1082.000	450.726	
	60 min	Pré Op	11	444.610	241.171	1399.000	528.140	0.432
		Pós Op 90 dias	10	558.793	367.304	833.470	326.646	
	90 min	Pré Op	11	604.575	199.640	1158.500	423.300	0.846
		Pós Op 90 dias	10	429.254	165.290	697.441	253.652	
	120 min	Pré Op	11	497.984	186.400	1310.000	436.044	0.232
		Pós Op 90 dias	10	413.157	84.410	576.287	400.551	
PYY Não Responsivo	0 min	Pré Op	6	267.390	91.420	565.195	231.205	0.156
		Pós Op 90 dias	6	121.603	7.020	349.307	210.952	
	30 min	Pré Op	6	322.790	214.338	1122.000	500.449	0.844
		Pós Op 90 dias	6	540.405	206.620	981.890	387.106	
	60 min	Pré Op	6	278.821	159.925	864.940	499.729	0.999
		Pós Op 90 dias	6	402.285	91.420	695.121	326.196	
	90 min	Pré Op	6	330.871	193.020	776.160	535.616	0.844
		Pós Op 90 dias	6	398.622	110.890	559.186	301.380	
	120 min	Pré Op	6	256.070	158.495	652.670	262.073	0.563
		Pós Op 90 dias	6	189.655	61.680	380.255	116.964	

* Teste não paramétrico de Wilcoxon

7.14 Anexo N - Medidas descritivas e teste AUC dos hormônios gastrintestinais.

Variáveis	Grupos	Momentos	n	Mediana	Mínimo	Máximo	IQ	Valor p*
AUC grelina	Respondedores	Pré Op	10	3745.140	2253.300	8029.553	3814.204	0.3001
		Pós Op 90 dias	10	3125.738	2186.445	21649.395	4214.383	
	Não respondedores	Pré Op	6	4008.450	2867.565	7565.100	3698.709	0.3498
		Pós Op 90 dias	6	5512.200	2140.673	12589.140	8366.869	
AUC GIP	Respondedores	Pré Op	10	111351.455	29455.560	175403.650	56999.230	0.0424
		Pós Op 90 dias	10	84126.660	22884.230	144267.320	38688.858	
	Não respondedores	Pré Op	6	117471.235	81004.010	158563.640	50449.703	0.0190
		Pós Op 90 dias	6	79285.320	45166.180	121001.240	70567.248	
AUC GLP-1 Ativo	Respondedores	Pré Op	10	769.358	398.168	1334.850	618.064	0.0109
		Pós Op 90 dias	10	1649.468	293.085	2869.320	1437.878	
	Não respondedores	Pré Op	6	650.753	564.278	2542.080	617.109	0.1906
		Pós Op 90 dias	6	1528.065	355.463	2352.315	1260.529	
AUC Glucagon	Respondedores	Pré Op	10	18023.940	7390.755	35757.397	13538.085	0.0017
		Pós Op 90 dias	10	10782.379	5050.665	17024.182	4439.905	
	Não respondedores	Pré Op	6	17193.529	6987.675	38561.003	12990.825	<0.0001
		Pós Op 90 dias	6	9889.227	3641.648	14672.970	6936.627	
AUC PYY	Respondedores	Pré Op	10	59940.150	27720.350	103080.260	57277.835	0.6956
		Pós Op 90 dias	10	55446.550	30606.750	74483.210	23735.505	
	Não respondedores	Pré Op	6	35114.060	23423.050	101160.970	52553.055	0.8986
		Pós Op 90 dias	6	46230.600	13298.400	75219.150	29495.970	

* Análise não paramétrica para medidas repetidas

7.15 Anexo O - Resultado da normalização de dados por segmento gastrointestinal separado por grupo responsivo e não responsivo. Legenda: figura da esquerda antes do processo de normalização dos dados; figura da direita depois do processo de normalização dos dados.

Grupo Responsivo

Não Responsivo

Legenda – Processo de normalização por segmento GI nos grupos R e NR. Nota-se que não foi realizada normalização nos segmentos ECA e ECM do grupo NR, pois nenhuma amostra ECM corresponde ao grupo NR e apenas uma amostra do ECA corresponde ao grupo NR.

7.16 Anexo P – Classificação dos processos biológicos com base nos termos do Gene Ontology (GO-Slim) para os genes diferencialmente expressos identificados no duodeno em ambos os grupos.

DUODENO - RESPONSIVOS			DUODENO - NÃO RESPONSIVOS		
Processo Biológico (GO)	Genes	AdjP	Processo Biológico (GO)	Genes	AdjP
Metabolismo do colesterol (GO:0008203)	9	2,38E-07	Transporte de íons (GO:0006811)	8	5,50E-03
Metabolismo do esteroide (GO:0016125)	9	2,38E-07	Estabelecimento de localização (GO: 0051234)	12	1,43E-02
Biossíntese do colesterol (GO:0006695)	6	3,21E-06	Reprodução (GO:0007620)	2	1,43E-02
Biossíntese de esteroide (GO:0016126)	6	4,26E-06	Comportamento reprodutivo de organismo unicelulares (GO:0044704)	3	1,43E-02
Metabolismo de álcool (GO:0006066)	11	4,26E-06	Transporte (GO:0006810)	12	1,43E-02
Biossíntese de pequenas moléculas (GO:0044283)	12	5,21E-06	Regulação biológica (GO:0065008)	10	1,43E-02
Biossíntese de organismo unicelulares (GO:0044711)	12	6,06E-06	Localização (GO:0051179)	13	1,43E-02
Metabolismo de esteróide (GO:0008202)	10	6,31E-06	Resposta ao estímulo de hexose (GO:0009746)	3	1,43E-02
Biossíntese de lipídeo (GO:0008610)	13	6,31E-06	Comportamento reprodutivo (GO:0019098)	3	1,43E-02
Metabolismo de lipídeo (GO:0006629)	17	3,67E-05	Transporte de vitaminas (GO:0051180)	2	1,43E-02
Função Molecular (GO)	Genes	AdjP	Função Molecular (GO)	Genes	AdjP
Hidrogênio-potássio-ATPase (GO:0008900)	2	6,20E-03	Co-transporte de solutos:cátions (GO:0015294)	3	5,60E-03
Transporte transmembrana de ânions (GO:0008509)	6	1,10E-02	Co-transporte (GO:0015293)	3	7,80E-03
Transporte transmembrana substrato-específico (GO:0022891)	11	1,10E-02	Co-transporte de ânions:cátions (GO:0015296)	2	7,80E-03
NADH NADPH Oxirredutases (GO:0016709)	3	1,10E-02	Transporte transmembrana de sódio (GO:0015081)	3	7,80E-03
Transporte transmembrana (GO:0022857)	11	1,68E-02	Ligação a vitaminas (GO:0019842)	3	7,80E-03
ATPase transportadora de potássio (GO:0008556)	11	1,68E-02	Transporte transmembrana ativo secundário (GO:0015291)	3	1,49E-02
Transporte transmembrana de íons (GO:0015075)	10	1,68E-02	Atividade transportadora (GO:0005215)	6	2,00E-02
Transporte substrato-específico (GO:0022892)	11	1,84E-02	Transporte transmembrana de ânions (GO:0008509)	3	2,31E-02
Oxidoredutase (GO:0016491)	9	1,91E-02	Transporte transmembrana ativo (GO:0022804)	3	3,81E-02
Ligação a receptores de quimiocinas (GO:0042379)	3	1,91E-02	Transporte transmembrana de cátions inorgânico monovalente (GO:0015077)	3	3,81E-02
Componente Celular (GO)	Genes	AdjP	Componente Celular (GO)	Genes	AdjP

continua

conclusão

DUODENO - RESPONSIVOS			DUODENO - NÃO RESPONSIVOS		
Parte da região extracelular (GO: 0044421)	14	1,10E-03	Extrínseco para o lado externo da membrana plasmática (GO:0031232)	2	6,00E-04
Membrana plasmática apical (GO:0016324)	7	1,10E-03	Região apical da célula (GO:0045177)	5	6,00E-04
Espaço extracelular (GO:0005615)	12	1,20E-03	Borda em escova (GO:0005903)	3	9,00E-04
Região apical da célula (GO:0045177)	7	1,70E-03	Membrana plasmática apical (GO:0016324)	4	1,30E-03
Membrana reticular endoplasmática (GO:0005789)	10	3,00E-03	Parte da membrana plasmática (GO:0044459)	9	1,30E-03
Componente integral da membrana (GO:0016021)	32	3,00E-03	Periferia celular (GO:0071944)	13	1,80E-03
Membrana plasmática (GO:0005886)	28	3,00E-03	Membrana plasmática (GO:0005886)	13	1,80E-03
Lipoproteína plasmática (GO:0034358)	3	3,00E-03	Espaço extracelular (GO:0005615)	6	2,40E-03
Membrana nuclear-retículo endoplasmático (GO:0042175)	10	3,00E-03	Membrana da borda em escova (GO:0031526)	2	6,40E-03
Região extracelular (GO:0005576)	18	3,00E-03	Parte da região extracelular (GO: 0044421)	6	8,30E-03

7.17 Anexo Q – Classificação dos processos biológicos com base nos termos do Gene Ontology (GO-Slim) para os genes diferencialmente expressos identificados no jejuno em ambos os grupos.

JEJUNO RESPONSIVOS			JEJUNO NÃO RESPONSIVOS		
Processo Biológico (GO)	Genes	AdjP	Processo Biológico (GO)	Genes	AdjP
Proliferação celular (GO:0008283)	67	1,37E-12	Metabolismo de álcool (GO:0006066)	10	2,63E-06
Resposta a estímulos químicos (GO:0042221)	94	1,37E-12	Metabolismo de pequenas moléculas (GO:0044281)	21	1,75E-05
Resposta fisiológica a ferimentos (GO:0009611)	55	2,46E-12	Metabolismo de lipídeo (GO:0006629)	14	5,96E-05
Resposta ao estresse (GO:0006950)	96	5,48E-12	Metabolismo de esteróide (GO:0008202)	7	8,00E-04
Metabolismo de esteróide (GO:0008202)	27	1,09E-11	Metabolismo de vitaminas (GO:0006766)	5	1,30E-03
Resposta a estímulos externos (GO:0009605)	59	1,09E-11	Desenvolvimento do tecido adiposo (GO:0060612)	3	1,30E-03
Biossíntese do colesterol (GO:0006695)	13	2,10E-11	Transporte de vitaminas (GO:0051180)	3	1,60E-03
Regulação da proliferação celular (GO:0042127)	54	3,88E-11	Metabolismo lipídico celular (GO:0044255)	10	1,70E-03
Metabolismo do colesterol (GO:0008203)	18	3,88E-11	Metabolismo de cofatores (GO:0051186)	6	1,90E-03
Resposta a estímulos (GO:0050896)	156	4,94E-11	Resposta a droga (GO:0042493)	7	1,90E-03
Função Molecular (GO)	Genes	AdjP	Função Molecular (GO)	Genes	AdjP
Ligação a glicosaminoglicanos (GO:0005539)	17	2,57E-07	Acetil-CoA C-Acitransferase (GO:0003988)	2	4,00E-03
Ligação a derivados de carboidratos (GO:0097367)	17	4,61E-07	Transporte de ácido fólico (GO:0008517)	2	4,00E-03
Ligação a receptores (GO:0005102)	43	5,02E-06	Transporte de cofatores (GO:0051184)	2	9,90E-03
Ligação ao fator de crescimento endotelial vascular (GO:0038085)	3	3,00E-04	Ligação a vitaminas (GO:0019842)	4	9,90E-03
Oxidoredutase (GO:0016491)	26	1,20E-03	C-Acitransferase (GO:0016408)	2	9,90E-03
Ligação a heparina (GO:0008201)	10	1,30E-03	Atividade transportadora de vitaminas (GO:0051183)	2	9,90E-03
Quimiocinas (GO:0008009)	6	2,40E-03	Ligação a ácido fólico (GO:0005542)	2	9,90E-03
Citocinas (GO: 0005125)	12	2,40E-03	Atividade transferase (GO:0016746)	4	2,60E-02
Ligação a hemoglobina (GO:0030492)	3	2,40E-03	Atividade transportadora (GO:0005215)	8	4,49E-02
Ligação a colágenos (GO:0005518)	6	3,00E-03	Ligação a nucleotídeos NAD (GO:0051287)	2	4,49E-02

continua

conclusão

JEJUNO RESPONSIVOS			JEJUNO NÃO RESPONSIVOS		
Componente Celular (GO)	Genes	AdjP	Componente Celular (GO)	Genes	AdjP
Parte da região extracelular (GO:0044421)	59	3,55E-18	Membrana plasmática apical (GO:0016324)	6	7,00E-04
Espaço extracelular (GO:0005615)	50	8,10E-17	Região apical da célula (GO:0045177)	6	1,60E-03
Região extracelular (GO:0005576)	76	3,15E-14	Espaço extracelular (GO:0005615)	8	6,70E-03
Superfície celular (GO:0009986)	29	1,71E-19	Borda em escova (GO:0005903)	3	6,70E-03
Matriz extracelular (GO:0021012)	26	6,34E-09	Parte da região extracelular (GO:0044421)	9	6,70E-03
Parte da membrana plasmática (GO:0044459)	59	3,01E-08	Parte da membrana plasmática (GO:0044459)	11	2,66E-02
Lado externo da membrana plasmática (GO:0009897)	17	7,44E-08	Membrana da borda em escova (GO:0031526)	2	3,72E-02
Periferia celular (GO:0071944)	98	4,72E-07	Integral a membrana plasmática (GO:0005887)	8	4,20E-02
Matriz extracelular proteináceo (GO:00005578)	21	4,99E-07	Intrínscico a membrana plasmática (GO:0031226)	8	4,20E-02
Membrana plasmática (GO:0005886)	96	6,13E-07	Região extracelular (GO:0005576)	11	4,20E-02

7.18 Anexo R – Classificação dos processos biológicos com base nos termos do Gene Ontology (GO-Slim) para os genes diferencialmente expressos identificados no íleo em ambos os grupos.

ILEO RESPONSIVOS			ILEO NÃO RESPONSIVOS			
Processo Biológico (GO)	Genes	AdjP	Processo Biológico (GO)	Genes	AdjP	
Resposta a estímulos químicos (GO:0042221)	27	0,0007	Resposta celular ao peróxido de hidrogênio (GO:0070301)	2	0,0194	
Processo homeostático (GO:0042592)	16	0,0022	Desmontagem da matriz extracelular (GO:0022617)	2	0,0194	
Regulação da qualidade biológica (GO:0065008)	24	0,0022	Resposta celular a espécie reativa de oxigênio (GO:0034614)	2	0,0259	
Resposta a estímulo extracelular (GO:0009991)	9	0,004	Resposta celular ao estresse oxidativo (GO:0034599)	2	0,0291	
Resposta a estímulos externos (GO:0009605)	16	0,004	Resposta ao peróxido de hidrogênio (GO:0042542)	2	0,0291	
Metabolismo do ácido araquidônico (GO:0019369)	3	0,004	Transporte de íons (GO:0006811)	4	0,0291	
Transporte de colesterol (GO:0030301)	4	0,0049	Localização (GO:0051179)	7	0,0376	
Resposta aos lipídeos (GO:0033993)	10	0,0049	Resposta a espécie reativa de oxigênio (GO:0000302)	2	0,0376	
Transporte de esteróide (GO:0015918)	4	0,0049	Regulação dos níveis de fluídos corporais (GO:0050878)	3	0,0485	
Homeostase química (GO:0048878)	12	0,0049	Estabelecimento de localização (GO: 0051234)	6	0,0485	
Função Molecular (GO)	Genes	AdjP	Função Molecular (GO)	Genes	AdjP	
Ligação tetrapirrólica (GO:0046906)	7	0,0001	Atividade transportadora (GO:0005215)	5	0,0056	
Ligação heme (GO:0020037)	6	0,0007	Transporte transmembrana de ânions (GO:0008509)	3	0,0056	
Ligação a íons de ferro (GO:0005506)	6	0,002	Co-transporte de solutos:cátions (GO:0015294)	2	0,0123	
Transporte transmembrana de fosfato dependente de sódio (GO:0015321)	2	0,0029	Transporte transmembrana de ânions inorgânicos (GO:0015103)	2	0,0127	
Receptor de carga (GO:0038024)	4	0,0029	Co-transporte (GO:0015293)	2	0,0127	
Ligação a hemoglobina (GO:0030492)	2	0,0042	Transporte transmembrana de sódio (GO:0015081)	2	0,0127	
Co-transporte de ânions:cátions (GO:0015296)	3	0,0042	Transporte substrato-específico (GO:0022892)	4	0,0127	

continua

conclusão

ILEO RESPONSIVOS			ILEO NÃO RESPONSIVOS			
Oxidoreductase (GO:0016491)	10	0,0049	Ligação a íons de ferro (GO:0005506)	2	0,019	
Co-transporte de solutos:cátions (GO:0015294)	4	0,0049	Transporte transmembrana ativo secundário (GO:0015291)	2	0,0218	
Oxidoreductase, com incorporação ou redução de O2 molecular (GO:0016705)	5	0,0053	Transporte transmembrana de íons (GO:0015075)	3	0,0333	
Componente Celular (GO)	Genes	AdjP	Componente Celular (GO)	Genes	AdjP	
Borda em escova (GO:0005903)	6	5,73E-06	Região extracelular (GO:0005576)	5	0,09	
Parte da região extracelular (GO:0044421)	16	4,45E-05	Intrínscio a membrana (GO:0031224)	4	0,7547	NS
Membrana da borda em escova (GO:0031526)	4	0,0003	Parte da região extracelular (GO:0044421)	2	0,7547	NS
Parte da membrana plasmática (GO:0044459)	19	5,00E-04	Complexo macromolecular (GO:0032991)	3	0,7547	NS
Espaço extracelular (GO:0005615)	12	8,00E-04	Parte da membrana plasmática (GO:0044459)	2	0,7547	NS
Região extracelular (GO:0005576)	19	1,60E-03	Citosol (GO:0005829)	2	0,7547	NS
Superfície celular (GO:0009986)	8	4,80E-03	Projeção celular (GO:0042995)	2	0,7547	NS
Periferia celular (GO:0071944)	28	5,60E-03	Complexo proteico (GO:0043234)	3	0,7547	NS
Projeção da membrana celular (GO:0031253)	5	6,10E-03	Periferia celular (GO:0071944)	4	0,7547	NS
Região apical da célula (GO:0045177)	6	6,10E-03	Membrana plasmática (GO:0005886)	4	0,7547	NS

7.19 Anexo S – Classificação dos processos biológicos com base nos termos do Gene Ontology (GO-Slim) para os genes diferencialmente expressos identificados nos segmentos ECA e ECM dos pacientes responsivos à remissão do DM2.

ECA RESPONSIVOS		
Processo Biológico (GO)	Genes	AdjP
Digestão (GO:0007586)	13	1,45E-10
Transporte de ânions (GO:0006820)	15	2,77E-07
Resposta a estímulos químicos (GO:0042221)	39	1,09E-05
Transporte orgânico de ânions (GO:0015711)	12	1,43E-05
Metabolismo de pequenas moléculas (GO:0044281)	36	2,23E-05
Absorção (GO:0050892)	5	2,23E-05
Resposta a substância inorgânica (GO:0044281)	14	3,05E-05
Metabolismo lipídico (GO:0006638)	8	3,90E-05
Transporte de íons (GO:0006811)	20	8,21E-05
Transporte de ácido carboxílico (GO:0046942)	10	8,21E-05
Função Molecular (GO)	Genes	AdjP
Ligação a ácido carboxílico (GO:0031406)	10	2,21E-05
Ligação lipídica (GO:0008289)	18	2,21E-05
Ligação a ácido monocarboxílico (GO:0033293)	6	8,75E-05
Atividade endopeptidase (GO:0004175)	12	9,38E-05
Transporte de lipídeo (GO:0005319)	6	3,00E-04
Transporte transmembrana de ânions (GO:0008509)	9	4,00E-04
Transporte substrato-específico (GO:0022892)	18	4,00E-04
Atividade peptidase em L-aminoácidos (GO:0070011)	13	5,00E-04
Atividade peptidase (GO:0008233)	13	6,00E-04
Ligação a ácidos graxos (GO:0005504)	4	6,00E-04
Componente Celular (GO)	Genes	AdjP
Parte da membrana plasmática (GO:0044459)	36	1,86E-09
Borda em escova (GO:0005903)	9	2,22E-09
Região apical da célula (GO:0045177)	14	4,37E-08
Membrana plasmática apical (GO:0016324)	12	1,53E-07
Região extracelular (GO:0005576)	33	5,96E-07
Membrana da borda em escova (GO:0031526)	6	1,30E-06
Periferia celular (GO:0071944)	49	1,30E-06
Membrana plasmática (GO:0005886)	48	1,65E-06
Parte do retículo endoplasmático (GO:0044432)	19	1,00E-05
Integral a membrana plasmática (GO:0005887)	22	1,02E-05

ECM RESPONSIVOS		
Processo Biológico (GO)	Genes	AdjP
Digestão (GO:0007586)	5	0,0005
Resposta a nutrientes (GO:0031667)	6	0,0034
Metabolismo dos carboidratos (GO:0005975)	8	0,0034
Resposta a estímulo extracelular (GO:0009991)	6	0,0038
Regulação positiva da acetilação do aminoácido lisina (GO:2000758)	2	0,0117
Regulação positiva da acetilação de histonas (GO:0035066)	2	0,0117
Resposta a composto orgânico cíclico (GO:0014070)	6	0,0117
Sinapse (GO:0007416)	3	0,0117
Metabolismo de carboidratos de organismo unicelulares (GO:0044723)	6	0,0117
Regulação da interleucina-6 (GO:0045408)	2	0,0117
Função Molecular (GO)	Genes	AdjP
Ligação ao hormônio IGF1 (GO:0031994)	2	0,0025
Ligação a receptores (GO:0005102)	8	0,0061
Ligação ao hormônio IGF (GO:0005520)	2	0,0122
Quimiocinas (GO:0008009)	2	0,0259
Citocinas (GO:0005125)	3	0,0259
Ligação a receptores de citocinas (GO:0005126)	3	0,0259
Ligação ao receptor acoplado à proteína G (GO:0001664)	3	0,0259
Ligação a receptores de quimiocinas (GO:0042379)	2	0,0259
Atividade tirosina quinase (GO:0004714)	2	0,0278
Atividade quinase (GO:0019199)	2	0,036
Componente Celular (GO)	Genes	AdjP
Região extracelular (GO:0005576)	12	0,0005
Parte da membrana plasmática (GO:0044459)	10	0,002
Espaço extracelular (GO:0005615)	7	0,002
Parte da região extracelular (GO:0044421)	7	0,0089
Ancorada a membrana (GO:0031225)	3	0,0118
Borda em escova (GO:0005903)	2	0,0295
Golgi (GO:0005796)	2	0,0438
Projeção celular (GO:0042995)	6	0,045

7.20 Anexo T – Valores individuais das variáveis clínicas e bioquímicas dos pacientes R e NR ante e após 90 dias da DGYR

	PRÉ OPERATÓRIO																			
VARIÁVEL	Resp_P02	Resp_P03	Resp_P07	Resp_P08	Resp_P10	Resp_P11	Resp_P12	Resp_P14	Resp_P15	Resp_P16	Resp_P18	Resp_P20	NResp_P01	NResp_P04	NResp_P05	NResp_P06	NResp_P09	NResp_P13	NResp_P17	NResp_P19
Peso (kg)	121,2	103,5	98,6	136,2	94,6	103,8	143,6	106,1	83,5	120,5	120,3	121	126,7	109,8	135,2	103,6	118,4	97,6	134,5	120,6
Estatura (m)	1,51	1,53	1,53	1,68	1,42	1,51	1,58	1,52	1,5	1,59	1,62	1,51	1,62	1,57	1,68	1,65	1,65	1,61	1,6	1,56
IMC (Kg/m2)	53,16	44,21	42,12	48,26	46,92	45,52	57,52	45,92	37,11	47,66	45,84	53,07	48,28	44,55	47,90	38,05	43,49	37,65	52,54	49,56
Glicose mg/dL	210	263	179	77	321	217	145	169	244	190	298	171	203	338	226	333	166	299	167	206
HbA1c (%)	8,1	10,6	6,3	10,2	12,8	8,4	7,4	7,4	8,8	9,7	10,4	8,2	8,5	10,7	7,9	8,1	9,3	11	10,1	10,6
Insulina (μU/mL)	13,5	NA	15,9	18,1	13,6	32	16,5	20,9	51,5	23,4	18,4	13,4	12,7	10,6	13,1	14,1	15,4	7,6	5	43,6
Peptídeo C (ng/mL)	3,8	NA	4,2	4	5,2	5,3	3,4	4,6	7,3	4,5	2,6	2,8	2,7	1,8	4,2	5	5,3	1,8	2,4	4,7
Colesterol Total (mg/dL)	91	205	161	173	206	191	152	198	237	165	193	167	173	192	201	240	192	198	186	176
LDL-c (mg/dL)	31	136	115	106	123	103	92	117	149	94	120	91	97	109	114	172	125	141	117	108
HDL-c (mg/dL)	29	40	27	48	51	62	44	59	55	31	48	46	39	40	65	48	37	40	45	51
VLDL-c (mg/dL)	31	29	19	19	32	26	16	22	33	40	25	30	37	43	22	20	30	17	24	37
Triglicerídeos (mg/dL)	157	143	94	95	158	129	81	109	166	199	127	151	186	215	108	98	149	84	122	183
	PÓS OPERATÓRIO 90 DIAS																			
VARIÁVEL	Resp_P02	Resp_P03	Resp_P07	Resp_P08	Resp_P10	Resp_P11	Resp_P12	Resp_P14	Resp_P15	Resp_P16	Resp_P18	Resp_P20	NResp_P01	NResp_P04	NResp_P05	NResp_P06	NResp_P09	NResp_P13	NResp_P17	NResp_P19
Peso (kg)	98,5	85,2	85	111,3	77,7	87,9	113,7	87,6	68,2	92,8	105,1	98,4	105,3	86,1	114	85,4	98,8	80,3	108	100,7
IMC (Kg/m2)	43,20	36,40	36,31	39,43	38,53	38,55	45,55	37,92	30,31	36,71	40,05	43,16	40,12	34,93	40,39	31,37	36,29	30,98	42,19	41,38
Glicose mg/dL	81	105	94	84	75	91	88	92	114	87	153	98	144	128	159	117	87	106	102	103
HbA1c (%)	5,1	6,3	5,5	6,2	5,9	NA	5,60	6,5	6,6	6,4	6,2	6,4	7,3	6,5	6,8	5,9	6	6,1	6,1	5,8
Insulina (μU/mL)	4,2	NA	12,1	6,3	4,1	7,0	16,6	7,8	6,8	8,6	16,7	7,5	HB	6,3	HB	7,9	8,6	5,4	8	14,9
Peptídeo C (ng/mL)	2,3	NA	2,5	2,1	2,9	2,1	3,3	2,5	3,3	2,7	3,3	2,3	HB	2,2	HB	3,1	3,9	1,5	2,4	3,1
Colesterol Total (mg/dL)	154	181	116	204	132	138	125	137	260	137	146	124	153	143	229	156	125	165	143	165
LDL-c (mg/dL)	99	116	71	128	69	73	66	66	167	86	69	64	76	85	155	98	72	88	85	109
HDL-c (mg/dL)	35	38	24	54	47	54	45	50	47	30	58	38	40	46	54	37	31	60	39	31
VLDL-c (mg/dL)	20	27	21	22	16	11	14	21	46	21	19	22	37	12	20	21	22	17	19	25
Triglicerídeos (mg/dL)	100	136	106	110	79	57	72	103	232	106	94	111	185	60	102	103	112	85	94	126

7.21 Anexo U - Valores individuais de fold change do segmento duodeno

DUODENO															
ENTREZ ID	GENE	Resp_P07	Resp_P11	Resp_P12	Resp_P14	Resp_P15	Resp_P16	Resp_P18	Resp_P20	MÉDIA R	NResp_P01	NResp_P05	NResp_P09	NResp_P13	MÉDIA NR
19	ABCA1	0,633	1,040	0,390	0,478	0,736	0,996	0,079	0,495	0,606	-0,452	0,019	0,014	0,414	-0,001
1244	ABCC2	0,598	-0,391	-0,934	-0,938	-0,263	-0,769	-0,466	-0,392	-0,444	-0,177	0,851	-0,946	-0,509	-0,196
2180	ACSL1	-1,250	-1,072	-0,448	-0,307	-1,063	-1,981	-0,721	-0,469	-0,914	-0,686	-0,725	-0,385	-0,449	-0,561
100	ADA	-0,323	-0,157	0,037	0,210	-1,103	-0,209	0,016	-0,046	-0,197	-4,623	-4,542	0,606	-0,526	-2,271
127	ADH4	0,163	-0,698	-0,095	0,164	-0,180	-0,536	-0,470	-0,590	-0,280	-3,943	-2,682	-0,064	-0,074	-1,691
230	ALDOC	-0,075	-1,122	-0,891	-0,506	-0,419	-1,168	0,079	-0,135	-0,530	0,107	0,941	-0,688	-0,370	-0,003
279	AMY2A	0,856	0,664	1,307	-0,582	0,351	0,628	-0,509	0,754	0,434	0,378	-0,235	0,319	0,159	0,155
256006	ANKRD31	0,817	-0,004	1,357	0,345	1,015	0,907	-0,037	0,321	0,590	0,260	0,310	0,699	0,181	0,363
11199	ANXA10	-3,631	-1,611	0,089	0,719	0,203	-1,921	0,396	-0,311	-0,758	0,003	-4,391	3,300	0,060	-0,257
345	APOC3	-0,661	-0,917	-0,367	-0,918	-0,073	-1,315	-0,282	-0,345	-0,610	0,190	0,541	-0,321	-0,498	-0,022
384	ARG2	-1,762	-1,683	-1,549	-0,818	-0,718	-0,970	-0,192	-0,899	-1,074	1,598	2,735	-0,655	0,102	0,945
495	ATP4A	0,033	-2,293	-0,747	-0,119	-0,272	-2,177	0,027	-0,417	-0,746	-0,039	-0,879	0,203	0,136	-0,145
496	ATP4B	-0,271	-3,334	-0,347	-0,077	-0,212	-2,974	0,136	0,168	-0,864	-0,122	-0,904	0,544	-0,265	-0,187
7917	BAG6	-0,023	3,623	-0,609	0,598	-1,370	1,108	-0,527	0,534	0,417	-0,423	-1,351	0,450	-0,844	-0,542
760	CA2	0,443	-0,066	0,073	0,015	0,064	0,098	0,203	-0,101	0,091	-4,238	-3,313	0,402	0,042	-1,777
838	CASP5	0,934	0,171	1,374	0,762	0,724	0,093	0,343	1,188	0,699	1,884	1,133	0,037	1,484	1,134
4680	CEACAM6	-0,595	-0,668	-0,269	-0,255	-0,903	-0,682	-0,308	-0,031	-0,464	-1,241	-1,311	-0,090	-0,904	-0,887
6362	CCL18	-1,303	-1,110	-0,662	0,684	-1,598	-1,449	-0,684	1,368	-0,594	0,226	0,451	-0,747	-0,233	-0,076
1192	CLIC1	0,371	-1,201	0,661	0,367	0,925	1,743	-1,075	0,818	0,326	0,810	0,788	1,133	0,090	0,705
1356	CP	-1,445	-0,343	0,303	-0,258	-0,939	-0,651	-0,683	-0,135	-0,519	-0,765	-1,347	-0,363	-1,055	-0,883
1380	CR2	-0,431	0,712	1,079	0,699	1,412	0,461	0,476	0,154	0,570	0,175	0,314	0,064	-0,039	0,128
8029	CUBN	0,355	0,280	-0,397	-0,113	1,812	-0,168	-0,056	-0,151	0,195	4,870	4,765	-0,268	0,268	2,409
3627	CXCL10	-0,219	-0,775	0,025	-0,344	1,022	-1,052	-0,473	-1,149	-0,371	-0,083	-0,601	-1,214	-0,244	-0,536
1543	CYP1A1	-3,576	-2,362	-1,872	-2,657	-0,328	-2,967	-0,580	-0,495	-1,855	-0,535	-0,007	-1,490	0,060	-0,493
3491	CYR61	-0,488	-0,842	0,405	1,093	1,003	1,802	-0,541	1,018	0,431	0,905	0,721	-0,431	0,425	0,405
780	DDR1	-1,332	-0,861	-1,495	0,049	-1,318	-0,280	-2,509	-1,248	-1,124	-0,090	-0,159	-0,852	-1,076	-0,544
7919	DDX39B	0,410	-0,102	-0,710	-0,478	0,905	0,931	0,381	0,391	0,216	-0,074	-1,714	-0,165	-1,907	-0,965
1717	DHCR24	-1,288	-1,217	-0,270	-0,013	-0,227	-1,595	-0,299	-0,099	-0,626	-0,138	-0,611	-0,070	0,206	-0,153
1718	DHCR7	-1,315	-0,745	-0,396	0,056	-0,166	-1,668	-0,258	-0,100	-0,574	-0,074	-0,153	0,142	0,350	0,066
54769	DIRAS2	1,063	0,634	0,694	0,934	-0,186	0,325	0,001	0,419	0,485	-0,319	0,298	-0,058	-0,019	-0,024
135656	DPCR1	-1,687	-1,554	-0,711	0,001	0,901	-1,068	0,460	0,026	-0,454	-0,321	-3,666	0,962	0,254	-0,693

1958	EGR1	-0,138	0,956	0,256	1,723	-0,622	1,168	-0,448	1,144	0,505	1,825	0,896	0,592	1,792	1,276
60481	ELOVL5	-1,616	-0,722	-0,626	-0,112	-0,263	-1,412	-0,354	-0,111	-0,652	-0,636	-0,535	-0,578	-0,235	-0,496
339221	ENPP7	0,383	-0,182	-1,094	-1,594	0,215	-1,037	-0,146	-0,348	-0,475	0,930	1,585	-0,964	-0,434	0,279
2171	FABP5	-1,443	-0,162	0,076	-0,340	0,278	0,006	0,099	0,208	-0,160	-1,643	-1,082	-0,827	-0,602	-1,038
3992	FADS1	-1,747	-0,895	-0,046	-0,296	-0,331	-1,213	-0,621	-0,182	-0,666	-0,394	-0,441	-0,132	-0,018	-0,246
2212	FCGR2A	-0,648	-0,233	-0,271	-0,464	-1,004	-1,073	-0,910	0,566	-0,505	-0,680	0,020	-0,756	-0,867	-0,571
2353	FOS	0,613	0,709	0,633	1,787	0,742	1,123	0,051	1,779	0,930	2,664	2,173	0,754	1,015	1,652
2568	GABRP	0,051	0,335	1,324	0,638	0,585	0,521	0,007	0,756	0,527	0,166	-0,153	-0,030	0,427	0,103
2641	GCG	1,816	-0,270	-1,233	-1,062	0,504	-0,691	-0,294	0,351	-0,110	2,627	3,664	-1,183	1,083	1,548
2730	GCLM	-1,072	-0,503	-0,512	-0,688	0,287	-0,262	-0,631	-0,616	-0,500	-0,114	0,297	0,315	-0,333	0,041
2694	GIF	-0,261	-3,172	-0,570	-0,313	-0,206	-4,012	-0,240	0,137	-1,080	-0,281	-1,189	0,232	0,001	-0,309
1839	HBEGF	-0,400	0,492	-0,334	1,884	0,501	0,973	-0,353	1,081	0,481	2,248	1,176	0,433	0,918	1,194
3638	INSIG1	-2,303	-1,898	-0,317	-0,109	0,095	-2,383	-0,476	-0,578	-0,996	-0,155	0,050	-0,305	-0,043	-0,113
3934	LCN2	0,120	0,306	1,261	1,842	0,202	-0,243	0,248	2,082	0,727	0,857	0,104	0,539	1,077	0,644
3949	LDLR	-2,939	-1,427	-0,674	0,125	0,889	-1,851	-0,636	-0,459	-0,872	-0,637	0,179	0,191	-0,641	-0,227
8549	LGR5	-0,741	0,691	1,566	0,951	0,902	0,786	0,272	0,161	0,574	0,754	0,126	0,079	0,651	0,402
150094	SIK1	-0,159	0,520	-0,120	1,908	-0,177	1,022	-0,346	0,355	0,375	1,477	0,909	0,798	0,720	0,976
80741	LY6G5C	-0,562	0,138	-1,398	-0,465	-0,927	-0,412	0,694	-0,775	-0,463	0,325	1,054	1,024	0,070	0,619
80740	LY6G6C	0,080	0,758	0,320	0,178	0,236	0,468	0,121	-0,366	0,224	0,069	-1,352	-1,735	-0,699	-0,929
4199	ME1	-0,657	-0,820	-0,410	-0,374	-0,303	-0,937	-0,581	-0,483	-0,571	-0,946	-0,138	-0,148	0,241	-0,248
8076	MFAP5	-1,319	-1,042	0,285	-0,294	0,070	-1,351	-1,059	0,870	-0,480	0,709	0,183	-0,703	0,159	0,087
4312	MMP1	-1,794	-2,499	-3,022	-0,463	1,050	-1,764	-0,855	0,234	-1,139	1,303	0,251	1,905	0,207	0,917
4340	MOG	-0,452	0,118	-1,227	-0,246	-0,583	0,018	-0,393	-1,479	-0,531	0,085	0,210	0,284	-0,451	0,032
112609	MRAP2	0,416	-0,162	0,884	0,938	0,661	-0,002	0,370	0,906	0,501	1,312	0,062	0,326	1,056	0,689
931	MS4A1	-0,094	-0,341	1,386	-1,535	0,679	0,487	0,315	2,621	0,440	-0,826	0,024	-0,607	0,089	-0,330
6307	MSMO1	-1,572	-1,228	-0,230	-0,250	-0,395	-1,726	-0,430	-0,225	-0,757	-0,101	-0,099	-0,141	-0,074	-0,104
29881	NPC1L1	-1,135	-1,146	-1,062	-0,678	-0,449	-1,410	-0,506	-0,489	-0,859	0,171	1,090	-0,762	-0,655	-0,039
1728	NQO1	-0,512	-0,986	-0,495	-0,449	-0,221	-0,891	-0,243	-0,346	-0,518	-0,165	-0,356	0,540	-0,547	-0,132
7941	PLA2G7	-0,616	-0,340	-0,380	-0,389	-0,895	-1,045	-0,962	0,108	-0,565	-0,738	-0,155	-0,847	-0,130	-0,467
5376	PMP22	-0,144	-1,081	-1,256	-0,430	0,376	-0,790	-0,154	-0,123	-0,450	0,322	1,978	-1,371	-0,643	0,071
8490	RGS5	-1,101	-0,356	-0,205	-0,499	-0,386	-0,669	-0,220	0,532	-0,363	-0,801	-0,721	-1,163	-0,681	-0,841
6337	SCNN1A	-1,369	-1,247	-1,049	-0,947	-0,713	-1,532	-0,527	-0,610	-0,999	-0,515	-0,827	-0,115	-0,738	-0,549
5270	SERPINE2	0,298	-0,075	-0,355	-0,136	-0,430	-0,125	-0,354	-0,114	-0,161	-1,735	-1,912	-0,269	-0,458	-1,094
2810	SFN	-1,057	-0,943	-1,382	-0,156	-0,526	-1,127	-0,181	-0,480	-0,732	-0,363	-0,222	-0,218	-0,729	-0,383
6462	SHBG	0,387	-0,597	-1,205	-0,901	0,149	-1,212	-0,267	-0,164	-0,476	0,568	1,502	-0,756	-0,104	0,302
6555	SLC10A2	-1,045	-0,445	-0,323	-0,010	-0,044	0,456	-0,603	-0,228	-0,280	-1,052	-2,368	0,221	-1,114	-1,078

6561	SLC13A1	0,541	0,431	1,120	-0,163	1,884	0,080	0,166	-0,659	0,425	3,742	3,127	-0,238	0,554	1,796
6518	SLC2A5	-0,382	-0,406	-0,989	-0,617	-0,534	-0,704	-0,377	-0,542	-0,569	-0,058	0,327	-0,246	-0,500	-0,119
10568	SLC34A2	-0,515	0,691	1,972	2,774	0,186	1,492	0,400	0,696	0,962	0,265	-1,556	2,112	1,609	0,607
113235	SLC46A1	-0,347	-0,235	-0,084	-0,202	-0,504	-0,472	-0,212	-0,145	-0,275	-1,905	-1,483	-0,202	-0,553	-1,036
23657	SLC7A11	-0,823	-0,963	-1,204	0,163	0,763	-0,615	-0,661	-0,094	-0,429	-0,155	-1,280	0,895	0,132	-0,102
6713	SQLE	-2,167	-2,181	0,170	-0,215	0,112	-2,231	-0,554	-0,248	-0,914	-0,608	-0,577	0,023	0,270	-0,223
7032	TFF2	-4,395	-1,392	3,859	-0,012	0,287	-1,861	0,365	0,022	-0,391	-0,135	-4,524	3,732	-0,031	-0,240
5651	TMPRSS15	-0,807	-0,046	0,342	0,168	-0,199	0,234	-0,422	-0,145	-0,109	-3,355	-2,721	0,616	-0,637	-1,524
64699	TMPRSS3	0,640	0,582	1,252	0,987	-0,015	0,446	0,189	0,314	0,549	0,067	-0,956	0,619	0,728	0,115
140803	TRPM6	1,010	0,716	0,629	0,520	0,999	0,340	-0,075	-0,046	0,512	0,202	0,791	0,128	0,319	0,360
51733	UPB1	-0,252	-0,902	-0,616	-0,720	-0,056	-0,620	-0,471	-0,784	-0,553	-0,992	0,085	-0,726	-0,653	-0,571

7.22 Anexo V - Valores individuais de fold change do segmento jejuno

JEJUNO																			
ENTREZ ID	GENE	Resp_P03	Resp_P07	Resp_P08	Resp_P10	Resp_P11	Resp_P12	Resp_P14	Resp_P15	Resp_P16	Resp_P18	Resp_P20	MÉDIA R	NResp_P04	NResp_P09	NResp_P13	NResp_P17	NResp_P19	MÉDIA NR
10157	AASS	0,971	0,303	0,565	0,644	0,259	0,724	0,006	0,387	0,457	0,728	0,554	0,509	0,434	0,755	0,509	1,273	0,509	0,696
10351	ABCA8	0,366	0,046	-0,199	-0,762	-0,603	-0,955	-1,083	-0,074	-1,106	-0,321	-0,089	-0,435	-0,652	-0,573	-0,621	0,467	0,017	-0,272
1244	ABCC2	-0,551	-0,416	-0,763	-0,674	-0,549	-0,671	-0,557	-0,304	-0,790	-0,525	-0,441	-0,567	0,216	0,098	-0,043	-0,750	-0,439	-0,183
9619	ABCG1	-1,075	0,563	0,312	-0,681	-0,636	-0,388	-0,608	0,290	-0,338	-0,041	-1,041	-0,331	-0,438	0,052	-0,357	-0,684	-0,137	-0,313
30	ACAA1	-0,729	-0,161	-0,203	-0,493	-0,285	-0,596	-0,785	-0,257	-0,838	-0,790	-0,507	-0,513	-0,670	-0,410	-0,234	-0,991	-0,840	-0,629
38	ACAT1	-0,188	-0,069	-0,555	-0,091	-0,328	-0,570	-0,814	-0,375	0,033	-0,267	-0,339	-0,324	-0,856	-0,325	-0,190	-0,836	-0,903	-0,622
39	ACAT2	0,496	-0,052	-0,033	1,010	1,045	0,398	0,567	0,323	0,454	0,367	0,922	0,500	-0,025	0,375	0,435	0,576	0,622	0,396
2182	ACSL4	0,699	0,105	0,005	0,569	0,462	0,271	0,383	0,018	0,493	0,210	0,562	0,343	0,037	0,458	0,095	0,322	0,561	0,295
100	ADA	-3,085	-0,921	0,393	-1,160	-2,863	-3,738	-0,283	-2,045	-1,404	-1,904	-1,989	-1,727	-0,453	1,060	-0,115	-2,382	-3,377	-1,053
27299	ADAMDEC1	-0,154	0,353	-0,355	-1,107	-0,514	-0,378	-0,789	-0,299	-0,916	-0,663	-0,307	-0,466	-0,253	-0,109	-0,610	0,361	-0,047	-0,132
56999	ADAMTS9	0,921	0,408	0,489	0,721	0,251	0,978	0,612	0,411	-0,336	0,321	0,014	0,435	0,395	0,680	0,192	0,235	0,261	0,353
127	ADH4	-1,067	-0,163	-0,661	-0,097	-2,809	-1,769	0,123	-0,001	-0,414	-0,693	-1,850	-0,855	-0,655	0,009	0,247	-0,971	-2,918	-0,858
10551	AGR2	0,801	0,176	0,416	0,520	0,397	0,183	-0,043	0,355	0,768	0,849	0,389	0,437	0,446	0,428	0,131	0,385	0,536	0,385
122481	AK7	0,535	0,456	0,319	0,642	0,691	0,602	0,365	0,507	0,587	0,422	0,435	0,506	0,194	0,477	0,546	0,942	0,522	0,536
220	ALDH1A3	-0,033	0,244	-0,384	-0,689	-0,679	-0,902	-1,057	-0,425	-0,491	-0,690	-0,289	-0,490	-0,098	-0,320	-0,670	-0,124	-0,433	-0,329
230	ALDOC	1,012	0,298	-0,213	1,074	0,675	0,468	1,476	0,733	0,298	0,709	0,660	0,654	0,422	0,050	0,829	0,824	0,203	0,466
10189	ALYREF	0,316	0,367	0,684	0,784	0,489	0,332	0,231	0,212	0,695	0,347	0,003	0,405	0,250	0,465	0,219	0,180	0,591	0,341
279	AMY2A	0,117	0,610	-1,516	0,160	0,209	0,160	-1,114	-0,032	-0,121	-0,362	-0,580	-0,225	0,874	1,137	0,638	-0,100	0,886	0,687
280	AMY2B	-0,171	-0,343	-0,799	-0,315	-0,176	-0,514	-0,712	-0,342	-0,175	-0,597	-0,347	-0,408	0,013	-0,121	-0,192	0,002	-0,065	-0,073
54443	ANLN	0,548	0,460	0,802	0,297	0,454	0,341	-0,030	-0,223	0,313	0,562	-0,016	0,319	0,364	0,366	0,292	0,144	0,577	0,349
335	APOA1	-0,432	0,043	-0,299	-0,864	-0,162	-0,225	-0,766	-0,247	-0,766	-0,581	-0,437	-0,430	-0,644	-0,363	-0,436	-0,978	-0,467	-0,578
345	APOC3	-0,913	-0,267	-0,270	-1,208	-0,122	-0,024	-0,542	-0,040	-0,957	-0,324	-0,437	-0,464	-0,993	-0,567	-0,261	-1,147	-0,081	-0,610
350	APOH	-1,105	-0,260	-0,147	-0,334	-1,091	-1,793	-0,388	-0,991	-0,586	-0,591	-0,625	-0,719	-0,166	-0,061	-0,323	-1,319	-0,528	-0,479
366	AQP9	-0,089	-0,248	0,159	0,512	-0,302	1,809	0,307	1,326	1,909	0,408	-0,408	0,489	0,169	-0,221	-0,159	0,974	-0,030	0,147
374	AREG	-1,809	-2,470	-0,096	-0,547	-1,605	-0,870	-0,485	1,106	-0,875	1,330	-0,518	-0,622	-0,117	0,088	0,244	-1,138	-0,909	-0,366
57198	ATP8B2	-0,308	-0,417	-0,603	-0,104	-0,907	-0,925	0,042	-0,310	-1,168	-0,355	-0,135	-0,472	-0,493	-0,304	-0,120	0,087	-0,991	-0,365
9212	AURKB	0,326	0,379	0,452	0,165	0,524	0,667	0,115	-0,224	0,588	0,440	-0,055	0,307	0,116	0,194	0,029	0,124	0,338	0,160
7917	BAG6	0,405	-0,607	-1,137	0,549	1,440	1,066	0,371	0,335	-0,172	0,841	-1,361	0,157	0,132	0,642	0,504	-0,582	0,511	0,241
633	BGN	-0,218	0,180	-0,633	-1,232	-1,036	-0,380	-1,107	-0,915	-1,421	-0,995	-0,589	-0,759	-0,994	-0,205	-0,749	-0,295	-0,356	-0,520
653	BMP5	-0,186	0,186	-0,740	-0,976	-1,036	-0,682	-1,089	-0,559	-1,205	-0,685	-0,165	-0,649	-0,386	-0,381	-0,632	0,287	0,006	-0,221
83990	BRIP1	-0,139	0,688	0,625	0,260	0,473	0,479	-0,171	0,117	0,713	0,803	-0,146	0,337	0,336	0,320	0,166	-0,136	0,382	0,214
760	CA2	-0,307	-0,159	-0,138	0,052	-2,032	-1,828	-0,107	-0,553	-0,383	-0,886	-0,729	-0,643	0,051	0,212	0,069	-0,559	-3,139	-0,673

766	CA7	0,346	-0,151	0,114	0,703	0,617	0,624	-0,019	0,790	0,759	0,812	0,200	0,436	-0,343	-0,213	0,444	1,107	1,449	0,489
768	CA9	0,846	0,309	0,717	0,627	0,525	0,329	-0,107	-0,052	0,421	0,701	0,092	0,401	0,560	0,488	0,042	0,669	0,036	0,359
776	CACNA1D	0,768	0,063	0,456	0,232	0,494	0,393	0,241	0,454	0,171	0,601	0,113	0,362	0,241	0,316	0,267	0,095	0,423	0,268
834	CASP1	-0,011	0,103	0,514	0,252	0,532	0,500	0,323	-0,159	0,989	0,413	0,137	0,327	0,101	0,341	0,207	0,340	0,187	0,235
838	CASP5	0,075	0,396	0,448	0,710	1,023	1,887	0,536	0,324	2,106	1,537	0,569	0,874	0,449	1,598	0,716	1,832	1,046	1,128
6362	CCL18	1,482	0,641	0,193	0,594	0,338	1,096	0,831	-1,102	0,547	-0,670	1,534	0,498	-0,335	-0,080	-0,084	1,057	1,680	0,448
6347	CCL2	1,324	0,699	-0,260	1,808	0,647	0,768	0,442	1,553	-0,240	0,909	0,471	0,738	0,784	0,396	0,149	1,131	0,449	0,582
9133	CCNB2	0,687	0,938	0,989	0,588	0,886	0,534	-0,093	-0,115	0,699	0,968	0,004	0,553	0,019	0,667	0,342	0,678	1,010	0,543
30835	CD209	-0,660	0,309	-0,235	-0,632	-0,709	0,066	-0,652	-0,129	-0,916	-0,576	-0,287	-0,402	-0,655	-0,015	-0,463	-0,238	-0,146	-0,304
1E+08	CD24	0,273	-0,305	0,812	0,829	-0,068	0,262	0,798	-0,440	0,614	1,050	0,519	0,395	0,182	0,592	0,756	0,542	0,900	0,594
983	CDK1	0,250	0,426	1,114	0,629	0,726	0,726	-0,068	-0,122	0,715	0,959	0,391	0,522	0,109	0,498	0,308	1,059	1,104	0,616
23552	CDK20	-0,974	0,007	-0,420	-0,535	-0,271	0,053	-0,602	-0,651	-0,223	-0,198	-0,756	-0,416	-0,551	-0,117	-0,127	-0,605	-0,175	-0,315
1033	CDKN3	0,005	0,413	0,792	0,492	0,708	0,787	0,097	-0,012	0,609	0,837	0,491	0,474	-0,059	0,555	0,248	0,329	1,078	0,430
629	CFB	0,148	0,569	0,093	-0,130	0,096	0,887	1,343	0,124	0,636	0,157	0,143	0,370	-0,602	0,287	-0,721	-0,122	-0,140	-0,260
3075	CFH	0,248	0,331	-0,298	-0,765	-0,620	-0,168	-1,066	-0,290	-0,979	-0,618	-0,074	-0,391	-0,436	0,125	-0,699	0,710	0,323	0,005
1111	CHEK1	0,052	0,150	0,782	0,471	0,668	0,481	0,121	0,211	0,620	0,691	0,034	0,389	0,042	0,246	0,285	0,485	0,590	0,329
10752	CHL1	-0,365	-0,109	-0,562	-0,731	-1,188	-0,622	-0,948	-0,625	-1,443	-0,419	-0,013	-0,639	-0,301	0,034	-0,691	-0,063	0,160	-0,172
1271	CNTFR	0,253	0,614	0,206	0,856	1,160	0,544	-0,524	0,947	0,626	0,913	0,611	0,564	0,007	0,290	0,458	1,318	1,217	0,658
1303	COL12A1	0,130	0,848	-0,735	-0,792	-1,011	-0,564	-1,103	-0,101	-1,749	-0,892	-0,024	-0,545	-0,050	0,002	-0,645	0,509	0,212	0,005
84570	COL25A1	-1,377	0,384	-0,584	-0,910	-1,073	-0,670	-1,122	-0,351	-1,505	-0,541	-0,974	-0,793	-0,885	-0,939	-0,751	-0,702	-0,972	-0,850
1293	COL6A3	0,104	0,419	-0,462	-0,732	-0,864	-0,302	-0,813	-0,736	-1,332	-0,751	0,053	-0,492	-0,194	0,231	-0,341	0,238	0,255	0,038
1356	CP	-1,159	0,075	-0,973	-1,476	-1,518	-0,506	-1,703	-0,821	-1,864	-1,183	-1,388	-1,138	-1,076	-0,231	-1,229	-0,077	-0,777	-0,678
1380	CR2	1,847	-0,461	0,848	0,987	0,291	-0,207	1,624	0,768	2,623	0,576	0,286	0,835	0,062	0,058	0,057	0,094	0,060	0,066
1436	CSF1R	-0,647	0,001	-0,626	-0,936	-0,879	-0,049	-0,754	-0,230	-0,993	-0,817	-0,522	-0,587	-0,661	-0,210	-0,660	-0,163	-0,114	-0,361
8029	CUBN	0,608	0,717	-0,750	0,086	3,368	2,636	0,225	1,610	0,536	1,707	2,035	1,162	1,424	-0,691	1,041	1,739	4,417	1,586
3627	CXCL10	-0,818	0,420	-0,029	0,509	-0,705	1,917	-0,020	0,009	1,458	0,522	0,455	0,338	0,308	0,118	-0,338	-1,448	0,773	-0,118
6373	CXCL11	-0,795	-0,109	0,517	0,724	-0,771	1,819	0,512	-0,465	2,286	0,814	0,341	0,443	0,259	0,099	0,036	-0,892	1,003	0,101
6387	CXCL12	0,161	0,263	-0,137	-0,700	-0,489	-0,418	-1,104	-0,166	-0,666	-0,671	-0,649	-0,416	-0,277	-0,350	-0,586	0,141	-0,018	-0,218
3576	CXCL8	-0,230	-0,157	0,221	1,095	-0,414	1,115	0,382	0,589	1,358	0,334	0,747	0,458	0,297	0,474	0,156	-0,254	-0,186	0,098
51523	CXXC5	-0,872	0,298	-0,718	-0,644	-0,067	0,067	-0,148	-0,756	-1,248	-1,017	-0,440	-0,504	-0,680	-0,490	-0,098	-1,146	-0,081	-0,499
1543	CYP11A1	-1,748	-0,954	1,747	-1,874	-1,791	-1,591	-2,287	-0,946	-3,606	-1,240	-2,440	-1,521	-0,578	-0,347	-0,096	-1,091	-1,831	-0,789
1558	CYP2C8	0,564	0,068	0,860	-1,433	0,899	-0,193	-2,738	0,044	-0,441	0,060	-0,956	-0,297	0,386	0,236	-0,011	0,131	0,592	0,267
1595	CYP51A1	0,412	-0,376	0,749	0,613	0,488	0,001	0,812	-0,084	-0,315	0,082	0,979	0,306	0,080	0,039	0,217	0,652	0,561	0,310
1634	DCN	0,149	0,222	-0,337	-1,022	-0,615	-0,622	-1,204	-0,537	-1,339	-0,994	-0,136	-0,585	-0,572	-0,512	-0,820	0,184	0,244	-0,295
780	DDR1	-0,094	-2,152	-0,364	-1,136	-0,760	-0,112	-2,103	-0,458	0,998	-0,007	1,768	-0,402	0,095	-0,250	-1,761	-0,219	1,242	-0,178
84649	DGAT2	-0,494	0,135	-0,280	-0,606	-0,111	-0,722	-0,650	-0,017	-1,342	-0,739	-0,642	-0,497	-0,975	-0,815	-0,256	-0,770	-0,455	-0,654

1718	DHCR24	1,115	-0,334	-0,255	0,811	0,901	0,846	1,320	0,639	0,246	0,118	0,941	0,577	0,084	0,584	0,583	0,821	0,500	0,514
1717	DHCR7	1,150	-0,468	0,654	1,489	1,078	0,463	0,884	0,465	0,068	-0,207	0,734	0,574	-0,474	0,249	0,438	0,767	0,152	0,226
54769	DIRAS2	-0,550	-0,172	-0,545	0,524	-0,312	-0,855	-0,161	-1,093	-0,830	-0,419	-0,239	-0,423	0,588	-0,752	0,308	-0,411	-0,989	-0,251
1755	DMBT1	1,006	0,025	0,867	0,247	0,018	0,471	0,321	0,368	0,540	1,020	0,267	0,468	0,586	0,956	0,193	0,710	-0,006	0,488
127602	DNAH14	0,052	-0,778	-0,057	-0,899	0,023	-0,116	-0,862	-0,027	-0,474	-0,032	-1,196	-0,397	-0,312	0,543	1,321	-0,056	0,150	0,329
79733	E2F8	-0,150	0,250	0,705	0,222	0,632	0,563	0,027	-0,253	0,559	0,782	-0,062	0,298	-0,084	0,320	0,087	0,433	0,484	0,248
10682	EBP	0,657	-0,033	-0,088	0,329	0,512	0,324	0,662	0,330	0,505	-0,058	0,784	0,357	-0,033	0,056	0,182	0,151	0,386	0,148
1906	EDN1	-0,614	0,169	-0,816	-0,052	0,354	-0,665	-0,749	-0,898	0,407	-1,136	-0,144	-0,377	-0,098	-0,179	0,370	-0,093	-0,481	-0,096
1909	EDNRA	-0,093	0,163	-0,218	-0,752	-0,444	-0,735	-0,774	-0,659	-0,996	-0,440	-0,279	-0,475	-0,431	-0,144	-0,528	0,183	0,001	-0,184
1910	EDNRB	-0,003	0,476	-0,461	-0,758	-0,751	-0,801	-0,781	-0,339	-1,397	-0,794	0,068	-0,504	-0,247	-0,262	-0,511	0,373	0,114	-0,107
1948	EFNB2	0,000	-0,489	0,854	0,311	0,370	-0,098	0,638	1,105	0,130	0,876	-0,183	0,319	0,325	0,007	0,042	0,107	-0,179	0,060
1958	EGR1	-1,524	-1,124	-0,446	-0,111	-1,039	-0,798	-0,850	-0,913	-0,507	-0,017	-0,816	-0,741	-1,288	-0,182	0,468	-0,564	-0,817	-0,477
2022	ENG	-0,105	0,030	-0,405	-0,672	-0,719	-0,137	-0,451	-0,290	-0,711	-0,618	-0,558	-0,421	-0,665	-0,105	-0,587	-0,136	-0,399	-0,378
339221	ENPP7	-0,884	0,150	-0,390	-1,172	-0,571	-0,081	-1,158	-0,429	-0,801	-0,425	-1,159	-0,629	-0,969	-0,443	-0,370	-0,944	-0,346	-0,615
2049	EPHB3	0,723	0,365	0,951	0,573	0,750	0,428	0,321	0,243	0,422	0,941	0,297	0,547	-0,156	0,092	-0,023	0,535	0,455	0,181
2052	EPHX1	-0,553	-0,083	-0,111	-0,482	-0,686	-1,093	-0,787	-0,320	-0,926	-1,309	-0,442	-0,617	-0,725	-0,168	-0,136	-0,848	-1,099	-0,595
23086	EXPH5	0,362	0,295	0,677	0,236	0,383	0,202	-0,175	0,570	0,207	0,669	0,106	0,321	-0,219	0,430	0,292	0,351	0,091	0,189
2167	FABP4	0,647	-0,579	0,475	0,414	-0,207	-0,414	-1,165	-0,443	-1,363	-0,652	-0,207	-0,318	0,017	-0,249	-0,305	0,449	-0,138	-0,045
2177	FANCD2	0,562	0,607	0,367	0,377	0,437	0,540	-0,027	0,256	0,467	0,686	0,063	0,394	0,309	0,374	0,278	0,216	0,564	0,348
2194	FASN	0,665	0,024	0,191	0,409	0,327	0,321	0,743	0,430	0,131	0,318	0,274	0,348	-0,320	0,232	0,028	0,376	-0,183	0,027
79633	FAT4	0,099	0,295	-0,545	-0,707	-0,688	-0,635	-1,106	-0,388	-1,016	-0,369	0,001	-0,460	-0,206	0,036	-0,530	0,434	0,056	-0,042
2091	FBL	0,539	0,319	0,626	0,541	0,479	0,424	0,137	0,131	0,413	0,395	0,086	0,372	0,087	0,253	0,023	0,359	0,301	0,205
2214	FCGR3A	-0,235	0,298	0,525	0,138	-0,192	1,636	-0,177	0,621	1,147	0,223	0,039	0,366	0,101	-0,371	-0,041	0,780	-0,037	0,086
2224	FDPS	0,659	-0,124	0,032	0,603	0,715	0,338	0,506	0,170	0,232	0,069	0,647	0,350	0,047	0,057	0,168	0,297	0,230	0,160
2867	FFAR2	0,088	0,153	0,186	0,577	0,805	0,919	0,411	0,002	0,530	0,055	0,668	0,400	0,168	0,218	0,068	0,828	0,755	0,407
2254	FGF9	0,215	0,305	-0,316	0,532	1,023	0,520	0,155	0,410	0,608	1,179	-0,104	0,412	0,221	0,025	0,392	0,866	1,370	0,575
2353	FOS	-1,456	-0,761	-0,197	0,234	-1,478	-0,051	-0,398	-0,980	-0,107	-0,135	-0,065	-0,490	-1,547	-1,709	0,183	-1,872	-1,118	-1,213
2305	FOXM1	0,246	0,386	0,670	0,450	0,575	0,840	0,033	-0,143	0,334	0,738	-0,406	0,339	0,193	0,478	0,251	0,394	0,533	0,370
257019	FRMD3	0,764	0,264	0,267	0,454	0,726	0,689	0,048	0,764	0,926	0,434	0,213	0,504	0,010	0,541	0,332	0,410	0,627	0,384
2555	GABRA2	1,347	0,366	0,098	0,000	1,900	1,193	0,429	0,794	0,515	0,453	0,219	0,665	1,045	-0,343	0,689	0,243	1,928	0,713
2568	GABRP	0,126	0,077	0,203	0,588	0,162	0,896	0,228	0,116	0,666	0,673	0,157	0,354	0,105	-0,100	0,087	0,641	-0,101	0,126
2634	GBP2	0,142	0,179	-0,049	0,423	0,472	0,816	0,009	0,300	0,672	0,589	0,138	0,336	0,415	0,452	0,273	0,683	0,294	0,424

0,371	0,822	0,302	0,415	2,281	1,943	0,515	0,541	0,573	1,165	0,959	0,899	-0,370	-0,014	0,256	0,343	2,448	0,533
0,123	0,199	-0,209	-0,597	-0,774	-0,430	-0,972	-0,387	-0,473	-0,518	-0,284	-0,393	-0,606	-0,230	-0,471	-0,057	-0,398	-0,352
0,295	0,459	0,906	0,573	0,587	0,308	-0,051	0,524	0,633	0,811	0,344	0,490	0,120	0,165	0,224	0,304	0,705	0,303
-0,837	-0,405	-1,669	-1,014	-0,340	-0,542	0,366	0,038	0,980	0,498	-0,319	-0,295	-0,008	-0,413	-0,801	-0,223	-0,435	-0,376
-0,029	0,248	-0,191	-0,917	-0,600	-0,320	-0,884	-0,269	-0,846	-0,668	-0,220	-0,427	-0,791	-0,242	-0,706	0,182	-0,108	-0,333
-0,961	-0,241	-0,167	-0,311	0,107	-0,412	0,078	-0,200	-0,621	-1,246	-0,330	-0,391	-0,405	-0,209	-0,174	-0,685	-0,650	-0,425
0,028	0,407	-0,295	-1,100	-0,272	-0,250	-0,609	-0,353	-0,887	-0,790	0,040	-0,371	-0,494	-0,243	-0,666	0,467	0,493	-0,089
0,253	-0,039	-0,182	-0,908	-0,911	-0,941	-0,510	-0,147	-0,978	-0,261	0,043	-0,416	-0,441	-0,170	-0,399	0,355	0,159	-0,099
0,153	0,267	0,131	0,639	0,255	0,058	1,000	0,920	0,015	1,141	0,390	0,452	1,166	0,203	0,278	0,188	-0,539	0,259
-0,973	-0,205	-0,113	-0,404	-0,463	0,576	-0,203	0,826	-0,080	-0,814	-0,540	-0,218	-0,561	-2,146	-0,049	0,548	-0,765	-0,594
-0,922	-0,573	-0,337	-0,592	-0,628	0,655	-0,333	0,702	0,106	-1,236	0,364	-0,254	-0,177	-1,876	0,375	0,819	-0,773	-0,327
-2,294	-2,145	-0,475	-0,280	-2,048	-1,471	-0,570	0,309	-0,690	0,735	-0,808	-0,885	-1,086	-1,479	0,426	-2,120	-1,887	-1,229
0,365	0,485	0,287	-0,036	0,315	0,523	0,444	-0,132	0,547	0,296	0,521	0,329	-0,119	0,367	-0,116	-0,187	0,571	0,103
0,018	0,487	0,617	0,301	0,388	0,507	0,166	-0,086	0,572	0,194	0,516	0,335	0,046	-0,064	0,155	-0,170	0,339	0,061
0,660	0,463	0,738	0,388	0,628	0,675	0,246	0,145	0,666	0,201	0,618	0,493	0,174	0,237	0,007	0,069	0,616	0,221
0,581	0,317	0,467	0,291	0,678	0,581	0,230	-0,171	0,531	0,147	0,415	0,370	-0,026	0,136	-0,064	-0,118	0,363	0,058
-0,556	-1,032	0,101	-0,405	0,678	-0,585	-0,756	-0,442	-0,855	-0,001	-0,119	-0,361	-0,270	-0,819	0,411	0,162	1,258	0,148
1,127	-0,101	-0,013	0,982	0,802	0,487	0,926	0,216	0,164	0,317	0,953	0,533	-0,226	0,407	0,360	0,684	0,440	0,333
-1,075	-0,402	0,147	-0,633	-0,364	-0,719	-0,553	-0,736	-1,167	-1,600	-0,961	-0,733	-2,365	-0,622	-1,234	-2,202	-1,633	-1,611
0,115	-0,308	-0,991	-0,348	-0,579	-0,667	-0,882	-0,585	-0,861	-0,374	0,067	-0,492	0,077	-0,353	-0,465	0,200	0,322	-0,044
-0,264	0,553	1,136	0,639	0,415	0,565	0,337	0,722	0,176	-0,174	-0,092	0,365	0,409	-0,032	-0,125	-0,160	-0,335	-0,048
-0,393	-0,344	0,349	0,508	0,541	-0,258	0,529	1,046	0,163	1,025	0,315	0,317	0,036	-0,159	0,053	0,483	0,355	0,154
-0,311	0,115	-0,226	-0,324	-0,074	-0,436	-0,424	-0,393	-0,914	-0,456	-0,896	-0,394	-0,735	-0,457	-0,073	0,004	-0,797	-0,412
1,041	0,767	0,831	0,855	0,888	1,086	0,359	-2,059	0,421	-0,053	0,464	0,418	-0,349	-0,032	0,137	-0,141	0,520	0,027
-0,675	0,325	-0,517	-0,426	-0,616	-0,405	-0,304	-0,110	-0,731	-0,553	-0,314	-0,393	-0,486	-0,365	-0,585	-0,145	-0,317	-0,380
-1,199	0,335	0,027	-0,302	-0,295	-0,391	-0,237	-0,097	-0,920	-0,549	-0,889	-0,411	-0,521	0,323	0,161	-1,170	-0,252	-0,292
0,261	0,064	-0,356	-0,746	-1,080	-0,776	-0,909	-0,343	-1,378	-0,290	0,369	-0,471	-0,329	0,042	-0,599	0,056	-0,072	-0,180
0,152	-0,153	0,800	0,487	0,176	0,421	0,200	0,398	0,840	0,405	-0,147	0,325	-0,001	0,021	0,354	-0,196	0,302	0,096
1,723	-1,005	-0,516	2,868	2,103	1,594	2,626	1,247	0,371	-0,059	2,274	1,202	-0,384	0,638	0,875	1,593	1,203	0,785
-0,014	0,287	-0,287	-0,742	-0,529	-0,498	-0,702	-0,217	-0,678	-0,656	-0,217	-0,387	-0,507	-0,165	-0,601	-0,157	-0,141	-0,314
0,017	0,325	-0,469	-0,814	-0,759	-0,509	-0,868	-0,511	-1,174	-0,796	-0,639	-0,563	-0,638	-0,254	-0,588	-0,172	-0,313	-0,393
1,005	-0,324	0,695	0,655	0,786	0,145	0,286	-1,100	0,189	0,745	0,383	0,315	-0,186	0,634	-0,233	1,086	0,684	0,397

0,494	-0,224	1,112	0,739	0,586	-0,060	0,377	-0,149	0,204	0,512	0,465	0,369	0,572	0,205	0,017	0,576	0,076	0,289
0,974	0,218	0,121	0,631	0,414	-0,020	-0,399	0,614	0,345	0,691	0,194	0,344	0,758	0,105	0,516	1,365	0,765	0,702
0,079	0,177	-0,590	-0,711	-0,726	-0,538	-0,940	-0,136	-0,819	-0,306	-0,391	-0,446	-0,360	0,201	-0,273	0,405	0,121	0,019
0,585	0,316	0,479	0,599	0,896	0,697	0,172	0,118	0,754	0,656	0,667	0,540	-0,008	0,075	0,183	0,151	0,910	0,262
0,440	0,476	0,734	0,076	0,305	0,589	-0,321	-0,134	0,333	0,780	-0,011	0,297	0,029	0,388	0,313	0,355	0,796	0,376
-1,213	-0,883	-0,190	-0,040	-0,511	-1,166	-0,212	0,679	-0,492	0,378	-0,123	-0,343	-0,467	-0,649	0,060	-0,458	-0,785	-0,460
0,347	0,321	0,583	0,183	0,441	0,271	0,548	0,093	0,286	0,562	0,106	0,340	0,084	0,529	-0,059	0,069	0,610	0,247
0,139	0,364	-0,245	-0,775	-0,753	-0,324	-1,035	-0,559	-1,348	-0,567	-0,380	-0,498	-0,234	-0,009	-0,492	0,376	0,197	-0,032
1,210	0,533	1,061	2,517	1,260	3,207	2,077	0,230	3,424	2,109	1,659	1,753	0,294	2,005	0,510	1,414	1,729	1,190
-1,358	-0,266	-0,278	-1,806	-1,219	-0,356	-0,360	-0,989	-0,542	-1,831	-1,707	-0,974	-0,304	-0,331	-0,746	-1,801	-0,976	-0,832
0,480	-1,147	-0,155	1,731	1,139	0,291	2,052	2,129	0,181	1,159	1,492	0,850	-0,257	0,309	0,786	0,958	0,505	0,460
1,203	-0,234	1,224	0,289	1,016	0,553	-0,066	-0,371	0,040	0,465	-0,399	0,338	-0,123	-0,259	-0,283	1,189	0,989	0,302
0,765	0,170	0,196	-0,822	-0,567	-0,964	-1,635	-0,013	-1,122	-0,117	0,176	-0,357	-0,419	0,151	-0,500	0,783	0,287	0,061
1,353	-0,208	1,188	1,145	1,125	0,823	0,514	0,073	0,203	0,598	0,907	0,702	-0,673	-0,204	0,376	0,768	0,600	0,173
0,195	-1,269	0,417	0,008	-1,486	-1,010	-0,998	0,265	-0,798	0,761	-0,598	-0,410	-0,829	-0,541	0,438	-0,427	-0,649	-0,402
-0,458	0,062	-0,374	-0,753	-0,913	-0,854	-0,570	-0,602	-1,244	-0,706	-0,307	-0,611	-0,465	0,196	-0,088	0,047	0,089	-0,044
0,183	-0,391	-0,477	-0,249	-0,308	-0,384	-0,490	-0,951	-0,528	-0,404	-0,272	-0,388	0,477	-0,066	-0,377	-0,089	-0,345	-0,080
0,355	-2,017	-0,015	-0,586	0,347	-0,883	-0,205	-1,076	0,148	-1,322	-1,536	-0,617	-0,772	0,173	0,017	0,311	0,682	0,082
0,042	-0,143	-0,736	-0,324	-0,753	-0,501	-0,376	-0,540	-0,670	-0,228	-0,337	-0,415	0,105	0,066	-0,336	0,284	-0,130	-0,002
1,124	-0,373	1,245	0,611	0,315	-0,156	0,031	0,781	0,091	0,612	0,181	0,406	0,055	0,329	0,089	0,493	0,263	0,246
-0,026	0,149	-0,327	-0,681	-0,996	-0,343	-0,284	-0,515	-1,004	-0,533	-0,488	-0,459	-0,476	-0,209	-0,467	-0,185	-0,127	-0,293
1,027	0,306	0,629	0,787	-0,232	0,347	0,905	-0,303	0,376	0,652	0,492	0,453	0,575	0,881	0,212	0,053	0,736	0,492
0,085	-1,805	-0,285	-0,182	-1,215	-0,652	-0,514	-0,567	-0,626	-0,033	0,236	-0,505	-0,042	-0,971	-0,167	0,141	-0,639	-0,336
-0,511	0,446	0,370	1,759	-0,639	0,180	2,307	1,766	1,412	2,248	1,006	0,940	0,231	2,535	0,907	0,475	0,647	0,959
0,118	0,125	-0,255	-0,905	-0,825	-0,329	-0,572	-0,665	-1,213	-0,554	-0,617	-0,517	-0,555	-0,251	-0,571	0,190	-0,093	-0,256
-0,138	0,160	0,001	0,371	-0,737	2,326	0,249	-1,441	1,270	1,340	0,522	0,357	0,074	0,956	0,377	-0,086	0,003	0,265
-0,668	-0,409	-0,304	-0,339	0,977	0,355	-0,373	-0,826	0,523	-0,059	-0,229	-0,123	0,554	0,800	0,510	-0,228	1,055	0,538
-0,094	0,065	-0,241	-0,758	-0,928	-0,148	-0,720	-0,289	-0,673	-0,522	-0,173	-0,407	-0,461	-0,013	-0,405	-0,117	-0,045	-0,208
2,256	-0,864	0,017	1,952	1,190	1,025	2,683	-0,063	2,397	0,329	1,049	1,088	-0,109	-0,194	0,253	-0,759	1,915	0,221
-0,209	0,043	-0,517	-0,923	-0,548	-0,136	-1,022	-0,290	-0,744	-1,021	-0,114	-0,498	-0,294	-0,258	-0,615	-0,105	0,023	-0,250
-1,027	0,105	-0,570	-0,738	-0,462	-0,355	0,226	-0,312	-0,926	-0,993	-0,337	-0,490	-0,202	-0,069	-0,133	-1,032	-0,860	-0,459
1,368	-0,458	-0,197	1,274	1,206	0,626	1,236	0,308	0,357	-0,077	1,157	0,618	-0,125	0,159	0,528	0,928	0,782	0,454
-0,087	0,649	0,430	0,557	0,624	0,696	0,237	0,112	0,726	0,571	-0,086	0,403	-0,197	0,381	0,189	0,433	0,358	0,233

0,467	0,190	0,750	0,587	0,246	0,256	0,348	0,046	0,310	0,551	0,461	0,383	0,618	0,309	0,219	0,144	0,536	0,365
0,579	-0,028	0,276	0,144	0,465	1,672	0,498	0,130	1,092	0,971	0,535	0,576	0,072	0,383	-0,096	0,676	0,379	0,283
0,189	-0,016	0,358	0,674	0,775	0,581	0,727	0,265	0,441	0,006	0,621	0,420	-0,164	0,076	0,232	0,208	0,135	0,098
0,155	0,218	0,729	0,179	0,529	0,660	0,574	-0,067	0,611	0,697	-0,090	0,381	0,024	0,172	0,058	0,111	0,588	0,191
0,845	-0,219	1,135	0,749	0,408	0,001	0,335	0,631	-0,070	0,827	0,101	0,431	0,369	0,282	-0,162	0,864	0,128	0,296
1,038	0,260	0,131	0,318	0,843	0,646	0,453	0,241	0,458	0,571	0,446	0,492	0,293	0,407	0,600	0,961	0,829	0,618
-0,060	-0,016	-0,239	0,630	-0,536	1,528	1,626	-0,217	0,692	0,836	0,483	0,430	-0,102	0,831	0,741	-0,311	-0,672	0,098
-0,870	-0,608	-0,046	-0,694	-0,810	-0,987	-0,674	-0,143	-1,040	0,202	-0,502	-0,561	-0,297	-0,633	-0,253	-1,123	-1,442	-0,750
0,216	0,115	0,289	0,588	0,378	0,242	0,390	0,448	0,649	0,445	0,133	0,354	0,352	0,123	0,112	0,228	0,387	0,240
0,045	0,274	-0,400	-0,667	-1,283	-1,234	-0,187	0,067	-1,424	-0,205	0,057	-0,451	-0,433	0,084	-0,447	0,252	-0,030	-0,115
0,472	-0,989	0,198	-0,956	-0,505	0,422	0,647	0,673	-0,648	0,551	-0,803	-0,085	-0,614	-0,588	-1,201	0,052	-0,813	-0,633
-0,117	-0,644	-0,926	-0,138	-0,471	0,034	-0,388	-0,354	-0,647	-0,634	-0,601	-0,444	0,158	0,308	-0,082	-0,038	0,043	0,078
0,306	0,407	0,826	0,276	0,749	0,780	-0,292	-0,131	0,413	0,742	-0,082	0,363	0,109	0,207	0,093	0,563	0,600	0,314
0,183	0,002	0,563	0,583	0,002	-0,125	0,152	1,145	0,427	0,770	0,217	0,356	0,730	0,345	0,049	0,137	0,664	0,385
-0,424	0,013	-0,221	-0,215	-0,943	-0,295	-0,833	-0,342	-0,551	-0,397	-0,671	-0,444	0,846	0,221	0,183	-0,382	0,237	0,221
0,812	0,967	0,032	0,069	0,316	-0,149	0,715	0,184	-0,611	0,569	0,480	0,308	0,054	0,018	0,011	-0,057	0,539	0,113
0,155	0,269	-0,377	-0,806	-1,024	-0,776	-1,091	-0,477	-0,927	-0,561	-0,058	-0,516	-0,243	-0,056	-0,322	0,465	0,095	-0,012
0,112	0,133	-0,296	-0,685	-0,872	-0,306	-0,570	-0,607	-0,867	-0,585	-0,306	-0,441	-0,592	-0,071	-0,445	0,247	-0,126	-0,197
0,552	-0,872	0,881	-1,266	-0,756	-0,185	-0,966	-0,910	-0,392	-0,668	-1,149	-0,521	-0,992	-0,056	0,025	-0,368	-0,961	-0,470
1,148	-0,058	0,406	0,849	0,842	0,707	0,263	0,395	0,793	1,206	0,030	0,598	0,361	0,793	0,756	0,780	0,868	0,712
0,094	0,034	0,016	-0,911	-0,646	-0,081	-0,822	-0,364	-0,478	-0,464	-0,501	-0,375	-0,386	-0,370	-0,664	0,196	-0,293	-0,303
1,020	0,117	0,088	0,899	0,881	0,664	0,797	0,054	-0,100	0,092	0,310	0,438	0,160	-0,006	0,514	0,687	-0,057	0,260
-1,522	0,050	0,163	-0,213	-1,322	-1,368	-1,184	-0,993	-1,007	-1,128	-1,219	-0,886	-0,528	0,015	-0,127	-1,153	-1,973	-0,753
0,788	0,680	0,267	0,041	0,664	0,404	-0,585	0,194	-0,003	1,302	-0,253	0,318	-0,067	0,441	-0,022	0,174	0,880	0,281
0,184	0,050	-0,406	-1,012	-0,707	-0,459	-1,328	-0,639	-0,574	-0,072	-0,671	-0,512	-0,394	-0,049	-0,313	0,457	0,117	-0,036
0,065	0,435	0,555	0,712	0,827	0,652	0,231	0,175	0,829	0,640	0,040	0,469	-0,047	0,325	0,380	0,470	0,657	0,357
-0,109	0,315	0,068	0,295	0,378	0,621	0,694	1,085	0,030	0,360	-0,131	0,328	0,218	0,325	0,235	-0,028	-0,057	0,139
1,147	-0,111	0,144	1,124	0,265	4,210	2,857	1,482	4,084	4,299	3,071	2,052	1,231	4,069	1,375	3,837	1,598	2,422
0,947	-0,184	-0,179	0,904	0,935	0,392	1,034	0,534	0,450	-0,282	0,647	0,472	-0,045	0,161	0,385	0,452	0,502	0,291
0,902	0,012	0,665	0,361	0,398	0,758	0,375	0,026	0,780	0,826	0,242	0,486	0,251	0,758	0,037	0,754	0,369	0,434
0,398	0,002	-0,357	-0,651	-0,697	-0,898	-1,207	-0,425	-1,558	-0,571	-0,498	-0,587	-0,314	-0,098	-0,639	0,392	0,185	-0,095
0,086	0,024	0,243	0,439	0,323	0,387	0,767	0,371	0,936	0,382	-0,050	0,355	0,573	0,359	0,177	0,017	0,293	0,284
0,841	-0,265	0,193	0,422	0,636	0,198	0,648	0,299	0,134	-0,258	0,713	0,324	-0,231	-0,116	0,454	0,590	0,561	0,252

1,537	0,708	-0,205	1,809	1,195	0,756	2,453	1,141	-0,407	0,013	1,004	0,909	-1,008	0,050	0,615	0,036	0,236	-0,014
0,433	0,082	0,712	0,730	0,228	0,012	0,114	0,646	0,278	0,325	0,374	0,358	0,472	0,250	0,203	0,368	0,005	0,260
-1,511	-0,100	-0,391	-1,410	-1,027	-0,531	-0,231	-0,143	-1,655	-0,744	-1,070	-0,801	-0,845	-0,008	-0,445	-1,242	-0,251	-0,558
0,616	-0,078	0,498	-0,004	0,212	1,602	1,157	-0,348	0,998	0,427	0,416	0,500	-0,001	0,570	0,065	0,303	0,244	0,236
0,382	-0,458	0,893	0,937	-0,449	1,053	0,911	0,765	-0,535	0,135	0,228	0,351	0,174	0,374	-0,031	-0,071	0,160	0,121
-0,803	0,259	-0,298	-0,398	-0,919	-1,347	-0,110	-0,156	-1,018	-0,995	-0,487	-0,570	-0,443	-0,271	-0,149	-1,058	-1,115	-0,607
-0,067	-0,478	-0,383	-0,590	-0,800	-0,853	0,135	-0,087	-0,238	-0,683	-0,402	-0,404	-0,159	-0,184	-0,214	-0,445	-0,436	-0,288
-1,771	-0,510	-0,185	-1,158	-1,062	-0,813	0,111	-0,814	-0,618	-0,503	-1,236	-0,778	-0,408	-0,663	-0,600	-1,807	-0,992	-0,894
-0,835	-0,025	-0,032	0,211	3,167	2,066	-0,420	1,141	0,887	1,114	0,241	0,683	1,011	-0,427	0,273	0,334	2,150	0,668
-1,268	-0,296	-0,274	-0,998	-1,343	-0,451	-0,285	-0,105	-0,867	-0,669	-0,575	-0,648	-1,176	-0,710	-0,327	-0,986	-0,264	-0,693
-0,005	-0,561	0,978	1,439	0,219	0,656	1,442	0,651	0,471	1,365	0,549	0,655	1,711	0,198	1,044	0,924	1,389	1,053
-0,200	-0,392	-0,269	-0,893	-1,740	-1,022	-0,443	-0,682	-1,469	-0,566	-0,916	-0,781	-0,685	-0,104	-0,280	-0,994	-1,607	-0,734
-0,251	0,187	0,484	0,786	-0,098	-0,797	0,385	1,796	0,192	0,960	0,430	0,370	0,030	0,646	0,067	0,411	0,158	0,262
0,068	0,277	0,140	0,304	0,505	0,817	0,727	1,330	0,300	0,765	0,179	0,492	0,785	0,300	0,154	0,183	0,369	0,358
0,283	0,681	-0,055	-0,933	-0,455	-0,652	-1,411	-0,888	-0,765	-0,961	-0,614	-0,525	-0,672	-0,146	-0,710	0,370	0,061	-0,220
-1,785	0,375	-0,277	-1,035	-0,672	-0,159	-1,501	-0,980	-1,083	-0,859	-1,373	-0,850	-1,197	-0,874	-0,827	-0,949	-0,735	-0,916
2,033	-0,472	-0,016	2,281	1,549	0,868	1,766	0,760	0,239	0,039	1,641	0,972	-0,049	0,748	0,391	1,120	0,406	0,523
0,805	-0,159	-0,179	0,777	0,842	0,461	0,817	0,664	0,032	-0,259	0,461	0,387	-0,038	0,254	0,376	0,460	0,230	0,256
-0,519	0,027	-0,233	-0,646	-0,451	-0,538	-0,483	-0,412	-0,762	-0,491	-0,544	-0,459	-0,661	-0,227	-0,406	-0,563	-0,633	-0,498
-0,433	-0,018	-0,469	-0,854	-0,788	-0,423	-0,517	-0,313	-0,879	-0,787	-0,243	-0,520	-0,566	-0,164	-0,599	-0,138	-0,390	-0,372
0,645	0,470	0,655	0,448	0,378	0,483	0,175	0,106	0,511	0,629	0,376	0,443	0,648	0,407	0,052	0,141	0,916	0,433
-1,406	-0,053	1,554	-1,348	-1,083	0,078	-1,183	-0,469	-0,262	0,119	-1,068	-0,465	-0,937	0,051	0,167	-1,492	-0,327	-0,508
0,514	0,319	0,539	0,580	0,490	0,291	0,115	0,515	0,328	0,168	0,027	0,353	-0,358	0,316	-0,102	0,533	-0,021	0,073
-0,803	-2,662	0,324	0,580	-0,061	0,265	0,551	2,158	-0,938	0,363	1,412	0,108	0,035	0,796	0,574	0,762	0,489	0,531
0,011	0,048	-0,364	0,608	1,367	-0,054	-0,348	1,264	-0,128	0,405	0,892	0,336	0,928	-0,188	-0,529	0,102	-0,496	-0,036
-0,036	0,179	-0,417	-0,845	-0,494	-0,506	-0,603	-0,719	-1,166	-0,694	-0,618	-0,538	-0,600	-0,136	-0,724	0,094	-0,206	-0,315
0,161	0,077	0,461	0,453	0,635	0,436	0,528	0,039	0,667	0,396	-0,139	0,338	-0,010	-0,058	0,125	0,344	0,392	0,159
0,711	0,019	0,146	0,548	0,632	0,524	0,190	0,279	0,442	0,416	0,193	0,373	-0,134	0,441	-0,212	0,873	0,956	0,385
0,687	-0,056	0,230	-0,136	0,013	0,806	0,099	0,310	1,136	0,854	0,242	0,381	0,008	0,630	-0,005	0,681	0,242	0,311
1,457	-0,236	0,069	1,187	-0,438	0,503	0,317	1,269	-1,286	0,674	-0,083	0,312	0,107	0,918	-0,517	0,826	-0,360	0,195
-0,630	-0,333	-0,600	-0,925	-0,609	-0,820	-1,055	-0,423	-0,976	-0,899	-1,166	-0,767	-0,683	-0,302	-0,260	-0,837	-0,951	-0,607
-0,347	0,103	-0,498	-0,507	-0,782	-0,456	-0,797	-0,218	-0,595	-0,631	-0,246	-0,452	-0,212	-0,446	-0,420	0,017	-0,038	-0,220
0,579	0,400	0,503	0,513	0,707	0,278	0,071	-0,009	0,304	0,308	0,003	0,332	0,076	0,393	0,125	0,309	0,611	0,303

0,260	-0,594	-0,039	-0,267	-2,308	-1,271	0,555	-0,441	-0,736	-0,567	-0,157	-0,506	-0,423	0,475	0,348	-0,132	-1,724	-0,291
0,311	0,377	0,505	0,411	0,821	1,221	0,309	-0,503	1,299	0,462	0,003	0,474	-0,505	0,584	0,045	0,712	-0,252	0,117
-0,291	0,909	-0,846	-0,677	-0,889	0,072	-0,783	-0,761	-1,473	-1,144	-0,114	-0,545	-0,249	0,055	-0,637	0,372	0,118	-0,068
0,847	0,680	0,447	0,741	0,731	0,916	0,678	1,459	0,554	0,723	0,066	0,713	-0,154	0,421	-0,175	0,658	0,480	0,246
0,056	0,365	0,062	0,457	0,056	0,443	1,184	0,317	0,868	-0,055	0,459	0,383	-0,082	0,251	0,090	-0,045	0,916	0,226
-0,371	0,574	0,532	1,336	0,437	0,953	1,251	0,548	0,280	0,795	0,137	0,588	0,220	0,749	0,130	0,239	0,226	0,313
0,100	0,191	-0,474	-0,885	-0,944	-0,411	-0,551	-0,167	-1,188	-0,765	-0,461	-0,505	-0,667	-0,297	-0,748	0,016	-0,281	-0,396
0,809	0,636	0,871	0,143	0,234	0,496	-0,033	-0,094	0,178	0,770	0,285	0,390	0,180	0,514	0,280	0,578	0,527	0,416
0,565	0,290	0,554	0,961	0,654	-0,166	-0,232	0,726	0,420	0,236	0,049	0,369	0,165	0,414	-0,131	0,284	0,399	0,226
0,332	0,248	0,835	0,364	0,670	0,577	-0,173	-0,246	0,571	0,625	-0,205	0,327	0,597	0,439	0,340	0,376	0,630	0,476
0,103	-0,030	-1,253	-0,474	-0,921	-0,644	-0,509	-0,315	-0,777	-0,231	-0,230	-0,480	-0,100	-0,079	-0,435	0,166	-0,311	-0,152
-0,666	0,129	-0,108	0,967	0,449	0,533	0,620	0,624	1,251	-0,129	0,514	0,380	0,395	0,141	0,063	0,006	-0,423	0,037
-0,954	-0,283	-0,015	-0,433	-0,893	-1,005	-0,790	-0,650	-0,481	-1,290	-0,861	-0,696	-0,565	-0,238	-0,593	-1,086	-0,361	-0,569
0,276	0,151	0,759	0,375	0,748	0,487	0,204	0,252	0,870	0,681	0,142	0,449	0,361	0,213	-0,011	-0,067	0,705	0,240
-0,577	-0,063	-0,581	-0,614	-0,403	0,017	-0,241	-0,151	-0,254	-0,905	-0,345	-0,374	-0,465	-0,243	-0,623	-0,326	-0,129	-0,357
0,177	0,069	0,073	0,873	0,745	0,655	0,675	0,710	0,629	0,619	0,163	0,490	-0,025	0,136	0,150	-0,062	-0,045	0,031
0,160	0,348	-0,418	-1,086	-0,878	-0,498	-0,536	-0,395	-1,211	-0,638	-0,125	-0,480	-0,577	0,146	-0,589	0,562	0,244	-0,043
0,124	-0,092	-0,399	-0,879	-0,946	-0,785	-0,812	-0,169	-1,123	-0,446	-0,282	-0,528	-0,803	-0,039	-0,311	-0,082	-0,157	-0,278
-0,023	-0,014	-0,151	-0,267	-0,764	-0,426	-0,622	-0,489	-0,544	-0,619	-0,481	-0,400	-0,409	0,080	-0,376	-0,103	0,198	-0,122
-0,620	0,605	-0,949	-0,489	-0,342	-0,974	-0,626	-0,094	-0,638	0,289	-0,431	-0,388	-0,205	-0,086	-0,232	0,270	0,465	0,043
0,716	0,391	0,377	0,160	0,228	0,774	0,066	0,014	0,292	-0,022	0,629	0,330	0,063	0,473	0,169	0,129	0,773	0,321

7.23 Anexo X - Valores individuais de fold change do segmento íleo

ILEO														
ENTREZ ID	GENE	Resp_P07	Resp_P08	Resp_P11	Resp_P14	Resp_P15	Resp_P16	Resp_P18	MÉDIA R	NResp_P04	NResp_P09	NResp_P13	NResp_P17	MÉDIA NR
100	ADA	-4,057	2,509	-1,150	2,632	0,784	-2,349	-2,677	-0,616	-0,056	-0,050	0,309	-2,133	-0,482
127	ADH4	-2,851	-0,344	-2,696	0,463	-0,814	0,081	-0,833	-0,999	-0,877	-0,310	0,225	-1,311	-0,568
250	ALPP	-1,380	-0,993	-0,183	0,579	-0,466	-1,266	0,136	-0,510	-0,517	0,430	0,926	-0,562	0,069
57198	ATP8B2	-0,919	-0,212	-0,830	0,205	-0,577	-0,616	-0,589	-0,505	-0,782	-0,609	-0,601	-0,355	-0,587
83990	BRIP1	0,630	0,230	0,295	0,356	0,713	0,611	0,530	0,481	0,507	0,234	0,468	0,135	0,336
29113	C6orf15	2,159	0,335	0,850	0,795	-0,709	-0,014	0,185	0,514	-0,055	0,215	-0,547	-0,022	-0,102
760	CA2	-3,713	0,130	-2,006	0,097	-0,634	-0,471	-1,151	-1,107	0,411	-0,611	0,461	-0,859	-0,150
838	CASP5	1,084	0,079	0,767	0,682	0,324	1,518	0,972	0,775	0,593	0,885	0,634	1,275	0,847
6362	CCL18	1,082	-0,385	-0,455	-1,370	-0,247	-0,416	-1,381	-0,453	0,573	0,072	0,050	0,395	0,272
9133	CCNB2	1,216	0,419	0,622	0,250	0,683	-0,062	0,598	0,532	0,852	0,595	0,695	0,510	0,663
1271	CNTFR	1,385	-0,086	0,558	-0,968	0,116	1,123	0,663	0,399	-0,334	0,798	-0,670	0,913	0,177
1356	CP	-0,081	-0,892	-0,933	-0,594	-0,461	-1,600	-1,450	-0,859	-0,418	-1,119	-0,796	-0,183	-0,629
8029	CUBN	5,152	-1,692	2,439	-0,754	0,574	2,287	2,306	1,473	0,128	0,709	-0,533	0,805	0,277
7852	CXCR4	-1,182	1,041	-0,566	-1,053	-0,262	-0,371	-1,414	-0,544	0,492	-0,257	-0,537	0,291	-0,003
1543	CYP1A1	-2,105	1,186	-0,412	-0,212	-0,121	-2,227	0,538	-0,479	0,314	-0,579	0,556	-0,459	-0,042
1558	CYP2C8	0,580	1,273	1,316	-0,253	-0,011	0,122	0,720	0,535	0,288	0,598	0,731	-0,019	0,400
780	DDR1	1,713	-1,662	1,598	-0,585	-2,322	0,714	-2,308	-0,407	1,064	-0,327	1,496	1,200	0,858
1755	DMBT1	-0,192	0,783	0,231	0,212	0,471	0,744	0,617	0,409	1,152	0,337	0,237	0,966	0,673
23086	EXPH5	0,641	0,588	0,306	0,321	0,563	0,418	0,467	0,472	0,327	0,288	0,315	0,400	0,333
3992	FADS1	-1,216	-0,878	-0,271	0,109	-0,223	-0,795	-0,595	-0,553	-0,139	-0,295	0,011	-0,456	-0,220
2867	FFAR2	0,914	0,319	0,580	0,767	0,090	0,277	0,323	0,467	0,317	0,223	0,387	0,169	0,274
23767	FGF9	1,397	-0,259	0,868	0,398	0,625	0,556	1,128	0,673	0,369	0,486	0,161	0,542	0,389
2353	FOS	-2,263	-0,639	-2,042	-0,388	-0,952	-1,515	-0,222	-1,146	0,735	-0,627	-1,789	-0,032	-0,428
2305	FOXM1	0,713	0,627	0,287	0,378	0,586	0,286	0,624	0,500	0,445	0,592	0,535	0,651	0,555
257019	FRMD3	0,856	0,134	0,346	0,130	0,268	0,751	0,571	0,437	0,300	0,422	0,129	0,160	0,253
2555	GABRA2	3,361	-0,730	2,055	1,882	0,102	0,711	0,859	1,177	1,053	0,686	0,603	0,753	0,774
2634	GBP2	0,529	-0,011	0,561	0,415	0,231	0,603	0,750	0,440	0,321	0,216	0,219	0,163	0,230
2641	GCG	2,629	-0,893	1,567	0,155	0,508	0,724	1,044	0,819	0,367	0,701	0,273	0,670	0,503
3040 3039	HBA1/HE	0,328	-1,116	-0,759	-0,765	-1,032	-1,019	-0,655	-0,717	-1,555	-1,092	0,677	-1,275	-0,811
3043	HBB	0,009	-1,421	-1,165	-0,682	-1,490	-0,864	-1,226	-0,977	-1,438	-1,372	0,462	-1,609	-0,989
1839	HBEGF	-2,740	-0,272	-1,083	0,874	-0,635	-0,248	-0,473	-0,654	0,834	-0,070	-1,199	0,454	0,005

3112	HLA-DOE	1,199	-0,382	0,573	0,444	0,803	-0,124	0,366	0,411	0,291	0,584	0,656	0,422	0,488
3638	INSIG1	-1,383	-1,205	0,885	0,381	-0,550	-0,750	-0,478	-0,443	-1,234	-0,276	-0,479	0,404	-0,396
3696	ITGB8	0,774	0,342	0,324	0,440	0,519	0,316	0,399	0,445	0,259	0,422	0,134	0,308	0,281
3832	KIF11	0,926	0,440	0,223	0,416	0,779	0,412	0,438	0,519	0,471	0,448	0,510	0,589	0,505
3934	LCN2	0,652	0,707	0,785	1,800	0,394	1,928	0,785	1,007	0,551	0,670	0,447	1,190	0,714
3949	LDLR	-1,721	-1,388	0,545	0,907	-0,843	-0,224	-0,495	-0,460	-0,117	0,019	-0,408	0,896	0,097
9388	LIPG	0,041	0,857	1,140	1,093	0,552	0,036	0,641	0,623	-1,064	-0,660	0,100	0,213	-0,353
80741	LY6G5C	-0,726	0,324	-0,511	0,070	-0,514	-0,415	0,249	-0,218	1,022	1,322	0,559	0,769	0,918
4199	ME1	-1,367	-0,177	-0,450	0,160	-0,642	-0,442	-1,153	-0,581	-0,186	0,054	0,162	-0,412	-0,096
406991	mir-21	-2,196	-0,407	-1,415	-0,154	-1,248	-0,407	-1,022	-0,978	0,872	-1,297	-1,270	0,442	-0,313
4312	MMP1	1,032	-0,160	-0,811	1,622	-2,235	1,475	0,409	0,190	1,137	1,174	1,524	1,827	1,416
931	MS4A1	0,574	-0,368	0,817	-3,456	0,296	0,898	-2,940	-0,597	0,482	0,469	-0,333	0,047	0,166
394263	MUC21	-0,816	-0,822	-0,118	0,589	-0,477	-1,198	-0,347	-0,456	-0,498	0,013	-0,134	0,133	-0,122
27163	NAAA	1,410	-0,208	0,780	0,062	0,557	0,728	0,439	0,538	0,191	0,630	0,269	0,446	0,384
4843	NOS2	-0,143	0,102	-0,501	1,592	0,493	0,986	0,332	0,409	-0,386	0,271	0,584	-0,166	0,076
8399	PLA2G10	0,317	0,549	0,742	0,380	0,098	0,797	0,893	0,540	0,080	0,516	0,439	0,315	0,337
5444	PON1	3,257	0,134	0,543	0,390	1,038	-0,467	-0,279	0,660	-0,033	0,691	-0,080	-0,114	0,116
5587	PRKD1	-1,949	1,151	-0,857	-0,271	-0,023	-0,671	-1,038	-0,523	0,199	-0,644	0,377	-0,993	-0,265
8842	PROM1	0,878	0,028	0,789	0,275	0,036	0,130	1,184	0,474	0,571	0,501	0,026	0,196	0,324
170679	PSORS1C	0,001	-0,225	0,803	0,745	0,621	0,716	0,367	0,432	0,450	-0,280	0,394	-0,098	0,116
5743	PTGS2	-1,596	-0,513	-0,893	-0,423	-0,256	-0,668	-0,094	-0,635	0,213	-0,491	-0,551	0,041	-0,197
5968	REG1B	-0,394	0,523	1,331	0,712	-0,136	3,061	1,944	1,006	3,299	1,749	0,942	2,675	2,166
6240	RRM1	0,719	0,229	0,512	0,158	0,509	0,450	0,693	0,467	0,163	0,524	0,378	0,361	0,356
6561	SLC13A1	4,741	-0,291	2,950	0,116	1,529	2,955	1,550	1,936	1,655	1,347	0,265	0,453	0,930
10568	SLC34A2	-1,349	1,066	0,040	0,852	0,209	0,364	1,200	0,340	1,514	0,064	0,648	0,529	0,689
142680	SLC34A3	1,572	-0,124	1,009	-0,134	0,470	0,193	1,140	0,589	0,037	0,274	0,287	0,319	0,229
11254	SLC6A14	1,345	0,258	1,013	0,434	0,166	0,607	1,205	0,718	1,289	1,056	0,123	1,120	0,897
6536	SLC6A9	0,946	-0,299	0,449	0,079	0,532	0,646	0,667	0,431	-0,192	0,183	0,036	0,249	0,069
79783	SUGCT	0,764	0,158	0,829	0,251	-0,159	0,808	0,649	0,471	0,704	0,392	-0,114	0,323	0,326
6891	TAP2	1,517	-0,045	0,742	0,464	1,321	-1,253	0,573	0,474	0,207	-1,000	-0,278	1,320	0,062
5651	TMPRSS1	-1,993	0,364	-1,610	1,317	0,663	-0,621	-1,191	-0,439	-0,437	0,066	0,255	-0,214	-0,082
64699	TMPRSS2	-0,006	0,436	0,729	0,543	0,078	1,001	0,182	0,423	0,050	0,311	0,400	0,279	0,260
22974	TPX2	0,983	0,739	0,371	0,151	0,771	0,134	0,704	0,550	0,693	0,589	0,636	0,734	0,663
140803	TRPM6	1,082	-0,160	0,456	0,445	0,641	0,664	-0,134	0,428	0,073	0,527	0,159	0,040	0,200

7.24 Anexo Z – Valores individuais de fold change dos segmentos ECA e ECM.

ECA							
ENTREZ ID	GENE	Resp_P03	Resp_P11	Resp_P16	Resp_P15	Resp_P18	MÉDIA R
59272	ACE2	-0,966	0,531	1,471	2,747	2,472	1,251
127	ADH4	0,785	0,302	2,823	2,036	3,646	1,918
229	ALDOB	-0,872	0,964	1,271	1,228	2,763	1,071
279	AMY2A	-0,960	-0,341	-1,296	-0,989	-0,197	-0,756
290	ANPEP	-0,726	-0,122	2,833	3,914	4,507	2,081
301	ANXA1	0,332	0,882	1,178	0,893	0,663	0,790
337	APOA4	-1,040	-0,787	0,958	2,236	3,266	0,926
338	APOB	-0,862	0,287	1,557	4,254	4,937	2,034
345	APOC3	0,013	0,690	0,298	1,516	2,085	0,921
366	AQP9	-0,414	-0,486	-0,877	-0,889	-1,069	-0,747
374	AREG	-0,900	0,854	1,315	0,561	0,497	0,465
623	BDKRB1	0,352	0,977	0,456	1,022	0,501	0,662
29113	C6orf15	1,769	2,158	-0,207	1,236	-0,167	0,958
158401	C9orf84	-0,344	-1,634	-0,806	-1,489	-0,531	-0,961
838	CASP5	-0,314	0,060	0,963	1,207	2,070	0,797
1604	CD55	-0,318	0,581	1,393	1,085	0,436	0,636
4680	CEACAM6	-0,361	2,570	2,392	1,490	0,999	1,418
1087	CEACAM7	0,062	1,066	1,504	0,709	0,555	0,779
629	CFB	0,849	0,970	1,014	0,400	1,334	0,914
1080	CFTR	-0,142	0,864	1,298	1,038	1,164	0,844
27159	CHIA	-1,726	-0,785	-2,932	-1,034	0,063	-1,283
1179	CLCA1	-0,467	0,648	3,607	4,949	5,934	2,934
1364	CLDN4	-0,183	0,782	1,701	1,035	0,514	0,770
1366	CLDN7	-0,221	1,298	2,896	2,457	1,963	1,679
119467	CLRN3	-0,262	0,226	1,970	1,969	2,294	1,240
1356	CP	0,544	1,563	0,471	0,340	1,588	0,901
1373	CPS1	-0,500	-0,005	2,854	2,374	4,136	1,772
84699	CREB3L3	-0,868	-0,232	1,523	1,903	2,919	1,049
1555	CYP2B6	-0,201	0,921	1,251	0,316	1,390	0,735
1576	CYP3A4	-1,142	0,249	1,423	3,787	5,266	1,917
8529	CYP4F2	-0,774	-0,050	1,285	1,665	2,475	0,920

1600	DAB1	-0,344	0,710	1,725	0,768	0,987	0,769
780	DDR1	-1,639	-1,371	0,124	-0,958	-2,003	-1,169
10170	DHRS9	-1,194	1,451	1,304	0,676	-0,219	0,404
127602	DNAH14	0,305	-0,471	-1,562	-1,572	-0,458	-0,751
1803	DPP4	-0,297	0,417	1,829	1,933	3,580	1,493
1847	DUSP5	-0,135	1,585	0,856	0,881	0,193	0,676
1969	EPHA2	-0,058	1,256	1,353	1,006	0,464	0,804
2168	FABP1	-0,695	-0,238	2,927	3,156	3,927	1,815
2169	FABP2	-0,810	-0,182	3,212	4,274	5,220	2,343
2353	FOS	-1,312	-1,266	-0,934	0,175	-0,682	-0,804
2568	GABRP	0,244	0,959	0,341	0,717	0,829	0,618
2641	GCG	-0,322	-0,125	2,733	0,894	2,105	1,057
2695	GIP	-0,002	-0,076	1,862	2,195	2,815	1,359
10223	GPA33	-0,827	0,331	2,317	2,175	2,318	1,263
2984	GUCY2C	-0,038	0,574	2,303	1,945	3,022	1,561
3040 3039	HBA1/HBA2	-0,455	-0,560	-2,170	-2,829	-2,134	-1,629
3043	HBB	-0,509	-0,471	-2,155	-3,015	-2,207	-1,671
3117	HLA-DQA1	0,866	0,870	-0,021	0,578	0,505	0,560
3352	HTR1D	-0,153	0,080	1,646	1,017	2,126	0,943
55600	ITLN1	0,283	2,033	2,223	0,130	1,583	1,250
142683	ITLN2	0,144	0,055	0,759	1,636	3,039	1,127
3855	KRT7	-0,235	1,323	1,310	1,347	0,183	0,786
4057	LTF	1,086	0,190	-0,490	0,828	1,245	0,572
4224	MEP1A	-0,886	0,227	2,896	3,860	4,685	2,156
4225	MEP1B	-1,163	-0,256	1,916	4,948	5,681	2,225
84879	MFSD2A	-0,443	0,485	1,501	0,984	0,752	0,656
8972	MGAM	-0,988	1,462	1,444	2,646	1,692	1,251
406991	mir-21	-1,188	-0,260	-1,185	-0,478	-1,756	-0,974
4311	MME	-1,271	0,032	0,513	2,790	3,583	1,129
4312	MMP1	0,511	0,060	0,930	1,117	0,765	0,677
80168	MOGAT2	-0,537	0,417	0,957	2,051	1,746	0,927
931	MS4A1	0,914	-1,276	-2,526	-0,653	0,528	-0,602
10232	MSLN	-0,057	1,844	1,264	0,511	-0,035	0,705

4547	MTTP	-0,846	-0,184	2,156	4,066	5,320	2,102
140453	MUC17	-1,535	-0,193	2,602	2,524	1,409	0,962
4648	MYO7B	-0,371	0,132	1,843	1,532	2,279	1,083
10	NAT2	-0,168	0,310	1,653	0,713	1,859	0,873
81797	OR12D3	0,005	1,600	1,147	0,119	0,277	0,629
5009	OTC	-0,161	0,072	2,666	2,038	3,558	1,635
5105	PCK1	-0,824	0,209	1,671	1,883	3,437	1,275
5174	PDZK1	-0,051	-0,305	1,256	1,145	2,277	0,864
5320	PLA2G2A	-0,430	0,022	1,444	2,640	4,239	1,583
5968	REG1B	-0,146	0,126	0,371	2,548	2,818	1,143
83998	REG4	-1,119	0,489	2,528	1,314	1,093	0,861
2810	SFN	-0,526	1,142	1,134	0,817	0,195	0,552
6476	SI	-0,927	0,272	2,999	5,357	6,032	2,747
6500	SKP1	-0,078	-0,944	-1,934	-0,508	-0,554	-0,804
1811	SLC26A3	-0,544	0,021	3,029	1,884	4,043	1,687
11001	SLC27A2	-0,451	0,946	1,264	0,726	1,160	0,729
6514	SLC2A2	-0,760	-0,295	0,736	2,634	3,806	1,224
10568	SLC34A2	0,123	0,491	1,972	0,637	1,801	1,005
6519	SLC3A1	-0,435	-0,014	1,760	0,913	1,904	0,826
6523	SLC5A1	-1,350	0,776	1,205	2,534	1,929	1,019
340024	SLC6A19	-0,725	-0,038	1,962	2,319	3,569	1,417
54716	SLC6A20	-0,758	1,172	0,872	0,762	0,269	0,463
6622	SNCA	-0,371	-0,336	-1,293	-1,900	-1,339	-1,048
6947	TCN1	-1,386	-1,917	-2,610	-1,292	-1,383	-1,718
7033	TFF3	0,246	0,413	2,125	0,836	1,867	1,097
7057	THBS1	0,604	1,544	0,072	1,046	1,113	0,876
56649	TMPRSS15	-0,282	-0,350	4,222	2,553	4,874	2,203
5651	TMPRSS4	-0,479	1,112	1,032	0,732	0,215	0,522
84951	TNS4	0,042	0,436	1,199	1,243	0,432	0,670
79861	TUBAL3	-0,242	0,272	0,898	0,951	1,580	0,692
7364	UGT2B17	-0,132	0,942	1,100	1,149	2,090	1,030
7367	UGT2B7	-0,453	-0,510	0,772	2,754	3,416	1,196
7429	VIL1	-0,683	0,349	1,461	2,238	2,602	1,193
7498	XDH	-0,458	0,105	1,175	1,397	1,379	0,720
7757	ZNF208	-0,959	-1,824	-2,121	0,437	0,598	-0,774

ECM					
ENTREZ ID	GENE	Resp_P03	Resp_P11	Resp_P16	MÉDIA R
374	AREG	-1,981	-1,744	-1,654	-1,793
1000	CDH2	2,533	0,303	1,194	1,343
4680	CEACAM6	-2,445	0,135	-1,285	-1,199
27159	CHIA	2,938	-1,810	-1,901	-0,258
1158	CKM	1,641	0,342	1,040	1,008
3627	CXCL10	-0,150	-1,136	-1,881	-1,056
6373	CXCL11	-0,492	-1,804	-2,046	-1,447
1558	CYP2C8	3,062	0,948	1,105	1,705
405753	DUOXA2	-0,974	-1,486	-1,464	-1,308
2049	EPHB3	1,206	0,583	1,035	0,941
2520	GAST	-3,402	-0,520	-0,623	-1,515
9245	GCNT3	-1,930	-0,152	-1,545	-1,209
51738	GHRL	2,471	0,455	1,000	1,309
2719	GPC3	2,430	0,493	0,710	1,211
3108	HLA-DMA	-0,786	-0,479	-1,710	-0,992
3480	IGF1R	1,334	0,355	1,443	1,044
3488	IGFBP5	1,602	0,932	1,785	1,439
3553	IL1B	-1,538	-1,037	-1,523	-1,366
55600	ITLN1	1,373	0,742	2,848	1,655
3938	LCT	0,517	0,350	2,256	1,041
406991	mir-21	-0,863	-1,246	-1,303	-1,137
140453	MUC17	-2,387	-1,029	-0,078	-1,165
10891	PPARGC1A	2,109	0,471	1,382	1,320
83998	REG4	-2,930	0,716	-1,020	-1,078
6947	TCN1	-1,936	-2,329	-1,689	-1,985
7757	ZNF208	-2,387	-2,387	-1,187	-1,987

8 REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

- 1 International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas [Internet]. 7a ed. Brussels: International Diabetes Federation, 2015. Disponível em: <http://www.idf.org/diabetesatlas>. Acesso em: 15 nov. 2016.
- 2 Berisha SZ, Serre D, Schauer P, Kashyap SR, Smith JD. Changes in Whole Blood Gene Expression in Obese Subjects with Type 2 Diabetes Following Bariatric Surgery: a Pilot Study. *PLoS ONE*. 2011;6(3):e16729.
- 3 Iser BPM, Stopa SR, Chueiri OS, Szwarcwald CL, Malta DC, Monteiro HOC, et al. Self-reported diabetes prevalence in Brazil: results from National Health Survey 2013, *Epidemiol. Serv. Saúde*. 2015 Abr/Jun;24(2):305-14.
- 4 Milech A, Oliveira JEP, Vencio S. *Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2015-2016*. São Paulo: A.C. Farmacêutica.
- 5 IBGE. Pesquisa Nacional de Saúde 2013: percepção do estado de saúde, estilos de vida e doenças crônicas. *Brasil, grandes regiões e unidades da federação*. Rio de Janeiro, IBGE; 2015.
- 6 Kolb H, Eizirik DL. Resistance to type 2 diabetes mellitus: a matter of hormesis? *Nat. Rev. Endocrinol*. 2012;8:183-92.
- 7 Sales V, Patti ME. The Ups and Downs of Insulin Resistance and Type 2 Diabetes: Lessons from Genomic Analyses in Humans. *Curr Cardiovasc Risk Rep*. 2013 February 1;7(1):46–59.
- 8 Golay A, e Ybarra J. Link between obesity and type 2 diabetes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2005;19:649-63.
- 9 Saini V. Molecular mechanisms of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes*. 2010 Jul 15;1(3):68-75.
- 10 Ginsberg HN. Insulin resistance and cardiovascular disease. *J Clin Invest*. 2000;106:453-58.
- 11 Sivitz WI, Yorek MA. *Mitochondrial Dysfunction in Diabetes: From Molecular Mechanisms to Functional Significance and Therapeutic Opportunities* Antioxid Redox Signal. 2010 Feb 15;12(4):537-77.
- 12 Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, et al. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw*. 2006;17(1):4-12.

- 13 Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell*. 2010;140:900-17.
- 14 Veilleux A, Mayeur S, Bérubé JC, Beaulieu JF, Tremblay E, Hould FS, et al. Altered intestinal functions and increased local inflammation in insulin-resistant obese subjects: a gene-expression profile analysis. *BMC Gastroenterology*. 2015;15:119.
- 15 Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes*. 2003 Jan;52(1):1-8.
- 16 Patti ME, Butte AJ, Crunkhorn S, Cusi K, Berria R, Kashyap S et al. Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: potential role of PGC1 and NRF1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:8466-71.
- 17 Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, et al. PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet*. 2003 Jul;34(3):267-73.
- 18 Skov V, Glintborg D, Knudsen S, Jensen T, Kruse TA, Tan Q, et al. Reduced expression of nuclear-encoded genes involved in mitochondrial oxidative metabolism in skeletal muscle of insulin-resistant women with polycystic ovary syndrome. *Diabetes*. 2007 Sep;56(9):2349-55.
- 19 Schrauwen P. High-fat diet, muscular lipotoxicity and insulin resistance. *Proc Nutr Soc*. 2007 Feb;66(1):33-41.
- 20 Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Garcia R, Shulman GI. Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2004 Feb 12;350(7):664-71.
- 21 He J, Watkins S, Kelley DE. Skeletal muscle lipid content and oxidative enzyme activity in relation to muscle fiber type in type 2 diabetes and obesity. *Diabetes*. 2001 Apr;50(4):817-23.
- 22 Glickman RM, Green PH. The intestine as a source of apolipoprotein A1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 Jun;74(6):2569-73.
- 23 Glomset JA. The plasma lecithins:cholesterol acyltransferase reaction. *J Lipid Res*. 1968 Mar;9(2):155-67.
- 24 Karra E, Yousseif A, Batterham RL. Mechanisms facilitating weight loss and resolution of type 2 diabetes following bariatric surgery. *Trends Endocrinol Metab*. 2010 Jun;21(6):337-44.

- 25 Thomas S, Schauer P. Bariatric surgery and the gut hormone response. *Nutr Clin Pract*. 2010;25:175-82.
- 26 Batterham RL, Cummings DE. Mechanisms of Diabetes Improvement Following Bariatric/Metabolic Surgery. *Diabetes Care*. 2016 Jun;39(6):893-901.
- 27 Fehmann HC, Göke R, Göke B. Cell and molecular biology of the incretin hormones glucagon-like peptide-I and glucose-dependent insulin releasing polypeptide. *Endocr Rev*. 1995 Jun;16(3):390-410.
- 28 Veilleux A, Grenier E, Marceau P, Carpentier AC, Richard D, Levy E. Intestinal Lipid Handling Evidence and Implication of Insulin Signaling Abnormalities in Human Obese Subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014 Mar;34(3):644-53.
- 29 Hussain MM. Intestinal Lipid Absorption and Lipoprotein Formation. *Curr Opin Lipidol*. 2014 Jun;25(3):200-6.
- 30 Schuster DP. Obesity and the development of type 2 diabetes: the effects of fatty tissue inflammation. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2010;3:253-62.
- 31 Wilborn C, Beckham J, Campbell B, Harvey T, Galbreath M, La Bounty P, et al. Obesity: prevalence, theories, medical consequences, management, and research directions. *J Int Soc Sports Nutr*. 2005;2:4-31.
- 32 Christou NV, Sampalis JS, Liberman M, Look D, Auger S, McLean AP, et al. Surgery decreases long-term mortality, morbidity, and health care use in morbidly obese patients. *Ann Surg*. 2004;240:416-23.
- 33 Schauer PR, Bhatt DL, Kirwan JP, Wolski K, Brethauer SA, Navaneethan SD, et al. Bariatric surgery versus intensive medical therapy for diabetes--3-year outcomes. *N Engl J Med*. 2014 May 22;370(21):2002-13.
- 34 Mingrone G, Panunzi S, De Gaetano A, Guidone C, Iaconelli A, Nanni G, et al. Bariatric-metabolic surgery versus conventional medical treatment in obese patients with type 2 diabetes: 5 year follow-up of an open-label, single-centre, randomised controlled trial. *Lancet*. 2015 Sep 5;386(9997):964-73.
- 35 Lindekilde N, Gladstone BP, Lübeck M, Nielsen J, Clausen L, Vach W, et al. The impact of bariatric surgery on quality of life: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev*. 2015 Aug;16(8):639-51.

- 36 Cho JM, Kim HJ, Menzo EL, Park S, Szomstein S, Rosenthal RJ. Effect of sleeve gastrectomy on type 2 diabetes as an alternative treatment modality to Roux-en-Y gastric bypass: systemic review and meta-analysis. *Surg Obes Relat Dis*. 2015 Nov-Dec;11(6):1273-80.
- 37 Buchwald H, Oien DM. Metabolic/bariatric surgery worldwide 2011. *Obes Surg*. 2013 Apr;23(4):427-36.
- 38 Buchwald H, Avidor Y, Braunwald E, Jensen MD, Pories W, Fahrbach K, et al. Bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 2004 Oct 13;292(14):1724-37.
- 39 Cummings DE. Endocrine mechanisms mediating remission of diabetes after gastric bypass surgery. *Int J Obes (Lond)*. 2009;33:33-40.
- 40 Wilson JB, Pories WJ. Durable Remission of Diabetes After Bariatric Surgery: What Is the Underlying Pathway? *Insulin*. 2010;5:10;46-55.
- 41 Dixon JB, O'Brien PE, Playfair J, Chapman L, Schachter LM, Skinner S, et al. Adjustable gastric banding and conventional therapy for type 2 diabetes: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2008;299:316-23.
- 42 Yamaguchi CM, Faintuch J, Hayashi SY, Faintuch JJ, Cecconello I. Refractory and new-onset diabetes more than 5 years after gastric bypass for morbid obesity. *Surg Endosc*. 2012 Oct;26(10):2843-7.
- 43 Lutz TA, Bueter M. The physiology underlying Roux-en-Y gastric bypass: a status report. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2014 Dec 1;307(11):R1275-91.
- 44 Knop FK. Resolution of type 2 diabetes following gastric bypass surgery: involvement of gut-derived glucagon and glucagonotropic signalling? *Diabetologia*. 2009;52:2270-6.
- 45 Rubino F, Forgione A, Cummings DE, Vix M, Gnuli D, Mingrone G, et al. The mechanism of diabetes control after gastrointestinal bypass surgery reveals a role of the proximal small intestine in the pathophysiology of type 2 diabetes. *Ann Surg*. 2006; 244:741-9.
- 46 le Roux CW, Welbourn R, Werling M, Osborne A, Kokkinos A, Laurenus A, et al. Gut hormones as mediators of appetite and weight loss after Roux-en-Y gastric bypass. *Ann Surg*. 2007; 246:780-5.
- 47 Bradley D, Conte C, Mittendorfer B, Eagon JC, Varela JE, Fabbrini E, et al. Gastric bypass and banding equally improve insulin sensitivity and beta cell function. *J Clin Invest*. 2012 Dec;122(12):4667-74.

- 48 Jørgensen NB, Jacobsen SH, Dirksen C, Bojsen-Møller KN, Naver L, Hvolris L, et al. Acute and long-term effects of Roux-en-Y gastric bypass on glucose metabolism in subjects with Type 2 diabetes and normal glucose tolerance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2012 Jul 1;303(1):E122-31.
- 49 Guidone C, Manco M, Valera-Mora E, Iaconelli A, Gniuli D, Mari A, et al. Mechanisms of recovery from type 2 diabetes after malabsorptive bariatric surgery. *Diabetes*. 2006 Jul;55(7):2025-31.
- 50 Basso N, Capoccia D, Rizzello M, Abbatini F, Mariani P, Maglio C et al. First-phase insulin secretion, insulin sensitivity, ghrelin, GLP-1, and PYY changes 72 h after sleeve gastrectomy in obese diabetic patients: the gastric hypothesis. *Surg Endosc*. 2011;25:3540-50.
- 51 Nguyen NQ, Debrececi TL, Bambrick JE, Bellon M, Wishart J, Standfield S, et al. Rapid gastric and intestinal transit is a major determinant of changes in blood glucose, intestinal hormones, glucose absorption and postprandial symptoms after gastric bypass. *Obesity (Silver Spring)*. 2014 Sep;22(9):2003-9.
- 52 Dirksen C, Hansen DL, Madsbad S, Hvolris LE, Naver LS, Holst JJ, et al. Postprandial diabetic glucose tolerance is normalized by gastric bypass feeding as opposed to gastric feeding and is associated with exaggerated GLP-1 secretion: a case report. *Diabetes Care*. 2010 Feb;33(2):375-7.
- 53 Chambers AP, Smith EP, Begg DP, Grayson BE, Sisley S, Greer T, et al. Regulation of gastric emptying rate and its role in nutrient-induced GLP-1 secretion in rats after vertical sleeve gastrectomy. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2014 Feb 15;306(4):E424-32.
- 54 Patti ME, Houten SM, Bianco AC, Bernier R, Larsen PR, Holst JJ, et al. Serum bile acids are higher in humans with prior gastric bypass: Potential contribution to improved glucose and lipid metabolism. *Obesity (Silver Spring)*. 2009;17:1671-7.
- 55 Pols TWH, Noriega LG, Nomura M, Auwerx J, Schoonjans K. The bile acid membrane receptor TGR5: a valuable metabolic target. *Dig Dis*. 2011;29:37-44.
- 56 Lefebvre P, Cariou B, Lien F, Kuipers F, Staels B. Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol Rev*. 2009;89:147-91.
- 57 Jiang C, Xie C, Lv Y, Li J, Krausz KW, Shi J, et al. Intestine-selective farnesoid X receptor inhibition improves obesity-related metabolic dysfunction. *Nat Commun*. 2015;6:10166.

- 58 Katsuma S, Hirasawa A, Tsujimoto G. Bile acids promote glucagon-like peptide-1 secretion through TGR5 in a murine enteroendocrine cell line STC-1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;329:386-90.
- 59 Briand F, Naik SU, Fuki I, Millar JS, Macphee C, Walker Met al. Both the peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist, GW0742, and ezetimibe promote reverse cholesterol transport in mice by reducing intestinal reabsorption of HDL-derived cholesterol. *Clin Transl Sci*. 2009 Apr;2(2):127-33.
- 60 Lo Sasso G, Murzilli S, Salvatore L, D'Errico I, Petruzzelli M, Conca P et al. Intestinal specific LXR activation stimulates reverse cholesterol transport and protects from atherosclerosis. *Cell Metab*. 2010 Aug 4;12(2):187-93.
- 61 Hu X, Steffensen KR, Jiang ZY, Parini P, Gustafsson JÅ, Gåfvels M, et al. LXR beta activation increases intestinal cholesterol absorption, leading to an atherogenic lipoprotein profile. *J Intern Med*. 2012 Nov;272(5):452-64.
- 62 Xie Y, Kennedy S, Sidhu R, Luo J, Ory DS, Davidson NO. Liver X receptor agonist modulation of cholesterol efflux in mice with intestine-specific deletion of microsomal triglyceride transfer protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012 Jul;32(7):1624-31.
- 63 Colin S, Briand O, Touche V, Wouters K, Baron M, Pattou F, et al. Activation of intestinal peroxisome proliferator-activated receptor-alpha increases high-density lipoprotein production. *Eur Heart J*. 2013 Aug;34(32):2566-74.
- 64 Out C, Dikkers A, Laskewitz A, Boverhof R, van der Ley C, Kema IP, et al. Prednisolone increases enterohepatic cycling of bile acids by induction of Asbt and promotes reverse cholesterol transport. *J Hepatol*. 2014 Aug;61(2):351-7.
- 65 Evans RM, Mangelsdorf DJ. Nuclear receptors, RXR, and the Big Bang. *Cell*. 2014 Mar 27;157(1):255-66.
- 66 Mangelsdorf DJ, Ong ES, Dyck JA, Evans RM. Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature*. 1990 May 17;345(6272):224-9.
- 67 Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*. 1995 Dec 15;83(6):835-9.
- 68 Heyman RA, Mangelsdorf DJ, Dyck JA, Stein RB, Eichele G, Evans RM, et al. 9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell*. 1992 Jan 24;68(2):397-406.

- 69 Kliewer SA, Umesono K, Noonan DJ, Heyman RA, Evans RM. Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature*. 1992 Aug 27;358(6389):771-4.
- 70 Aarnisalo P, Kim CH, Lee JW, Perlmann T. Defining requirements for heterodimerization between the retinoid X receptor and the orphan nuclear receptor Nurr1. *J Biol Chem*. 2002 Sep 20;277(38):35118-23.
- 71 Holmbeck SM, Foster MP, Casimiro DR, Sem DS, Dyson HJ, Wright PE. High-resolution solution structure of the retinoid X receptor DNA-binding domain. *J Mol Biol*. 1998 Aug 14;281(2):271-84.
- 72 Vacca M, Degirolamo C, Mariani-Costantini R, Palasciano G, Moschetta A. Lipid-sensing nuclear receptors in the pathophysiology and treatment of the metabolic syndrome. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2011 Sep-Oct;3(5):562-87.
- 73 van der Flier LG, Clevers H. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol*. 2009;71:241-60.
- 74 Zhang Y, Lee FY, Barrera G, Lee H, Vales C, Gonzalez FJ, et al. Activation of the nuclear receptor FXR improves hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Jan 24;103(4):1006-11.
- 75 Cariou B, van Harmelen K, Duran-Sandoval D, van Dijk TH, Grefhorst A, Abdelkarim M, et al. The farnesoid X receptor modulates adiposity and peripheral insulin sensitivity in mice. *J Biol Chem*. 2006 Apr 21;281(16):11039-49.
- 76 Kong LC, Tap J, Aron-Wisnewsky J, Pelloux V, Basdevant A, Bouillot JL, et al. Gut microbiota after gastric bypass in human obesity: increased richness and associations of bacterial genera with adipose tissue genes. *Am J Clin Nutr*. 2013;98:16-24.
- 77 Snedeker SM, Hay AG. Do interactions between gut ecology and environmental chemicals contribute to obesity and diabetes? *Environ Health Perspect*. 2012;120:332-9.
- 78 Darleen Sandoval. Roux-en-Y Gastric Bypass and Vertical Sleeve Gastrectomy: Divergent Pathways to Improved Glucose Homeostasis. *Gastroenterology*. 2016;150(2):309-12.
- 79 Cavin JB, Couvelard A, Lebtahi R, Ducroc R, Arapis K, Voitellier E, et al. Differences in Alimentary Glucose Absorption and Intestinal Disposal of Blood Glucose After Roux-en-Y Gastric Bypass vs Sleeve Gastrectomy. *Gastroenterology*. 2016 Feb;150(2):454-64.e9.

- 80 Sala P, Belarmino G, Machado NM, Cardinelli CS, Al Assal K, Silva MM et al. The SURMetaGIT Study: Design and Rationale for a Prospective Pan-Omics Examination of the Gastrointestinal Response to Roux-en-Y Gastric Bypass Surgery. *J Int Med Res*. 2016 Nov 10 [Epub ahead of print].
- 81 Rhee NA, Wahlgren CD, Pedersen J, Mortensen B, Langholz E, Wandall EP, et al. Effect of Roux-en-Y gastric bypass on the distribution and hormone expression of small-intestinal enteroendocrine cells in obese patients with type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2015 Oct;58(10):2254-8.
- 82 Nergård BJ, Lindqvist A, Gislason HG, Groop L, Ekelund M, Wierup N, et al. Mucosal glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulintropic polypeptide cell numbers in the super-obese human foregut after gastric bypass. *Surg Obes Relat Dis*. 2015 Nov-Dec;11(6):1237-46.
- 83 Nguyen NQ, Debrececi TL, Bambrick JE, Chia B, Deane AM, Wittert G, et al. Upregulation of intestinal glucose transporters after Roux-en-Y gastric bypass to prevent carbohydrate malabsorption. *Obesity (Silver Spring)*. 2014 Oct;22(10):2164-71.
- 84 Campbell LE, Langlais PR, Day SE, Coletta RL, Benjamin TR, De Filippis EA, et al. Identification of Novel Changes in Human Skeletal Muscle Proteome After Roux-en-Y Gastric Bypass Surgery. *Diabetes*. 2016 Sep;65(9):2724-31.
- 85 Emilsson V, Thorleifsson G, Zhang B, Leonardson AS, Zink F, Zhu J, et al. Genetics of gene expression and its effect on disease. *Nature*. 2008 Mar 27;452(7186):423-8.
- 86 Chen Y, Zhu J, Lum PY, Yang X, Pinto S, MacNeil DJ, et al. Variations in DNA elucidate molecular networks that cause disease. *Nature*. 2008 Mar 27;452(7186):429-35.
- 87 Ackermann M, Strimmer K. A general modular framework for gene set enrichment analysis. *BMC Bioinformatics*. 2009;10: 47.
- 88 de Magalhães JP, Curado J, Church GM. Meta-analysis of age-related gene expression. Profiles identifies common signatures of aging. *Bioinformatics*. 2009 Apr 1;25(7):875-81.
- 89 Sugana de Oliveira DY. *Biologia computacional aplicada para análise de dados em larga escala*. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências da FMUSP; 2013.

- 90 Wang Y, Joshi T, Zhang XS, Xu D, Chen L. Inferring gene regulatory networks from multiple microarray datasets. *Bioinformatics*. 2006 Oct 1;22(19):2413-20.
- 91 González-Plaza JJ, Gutiérrez-Repiso C, García-Serrano S, Rodríguez-Pacheco F, Garrido-Sánchez L, Santiago-Fernández C, et al. Effect of Roux-en-Y gastric bypass-induced weight loss on the transcriptomic profiling of subcutaneous adipose tissue. *Surg Obes Relat Dis*. 2016 Feb;12(2):257-63.
- 92 Katz A, Nambi SS, Mather K, Baron AD, Follmann DA, Sullivan G, et al. Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000 Jul;85(7):2402-10.
- 93 Bussab WO & Morettin PA. *Estatística Básica*. 8a ed. Saraiva; 2013.
- 94 Gibbons JD & Chakraborti S. *Nonparametric Statistical Inference*. 5a ed. Chapman and Hall/CRC; 2010.
- 95 Brunner E, Munzel U, Puri ML. Rank-score Tests in Factorial Designs with Repeated Measures. *Journal of Multivariate Analysis*. 1999;70(2):286-317.
- 96 Brunner E, Longer F. Nonparametric Analysis of Ordered Categorical Data in Designs with Longitudinal Observations and Small Sample Sizes. *Biometrical Journal*. 2000;42(6):663-75.
- 97 Kuga R, Safatle-Ribeiro AV, Faintuch J, Ishida RK, Furuya CK Jr, Garrido AB Jr, et al. Endoscopic Findings in the Excluded Stomach After Roux-en-Y Gastric Bypass Surgery. *Arch Surg*. 2007 Oct;142(10):942-6.
- 98 Sobotta J. Atlas de anatomia humana. 22a ed. São Paulo: Guanabara Koogan; 2006.
- 99 Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A laboratory manual. 3th.ed. New York: CSHL Press; 2001.
- 100 Wex T, Treiber G, Lendeckel U, Malfertheiner P. A two-step method for the extraction of high-quality RNA from endoscopic biopsies. *Clin Chem Lab Med*. 2003 Aug;41(8):1033-7.
- 101 Bussolati G, Annaratone L, Medico E, D'Armento G, Sapino A. Formalin fixation at low temperature better preserves nucleic acid integrity. *PLoS One*. 2011; 6(6):e21043.
- 102 Manual da Affymetrix. *Gene Chip 1.0 ST Human*. Disponível em: http://media.affymetrix.com/support/technical/datasheets/gene_1_0_st_ddatasheet.pdf.

- 103 Almeida DF. *Avaliação do perfil de expressão gênica de linhagens celulares do tecido mamário com diferentes níveis de expressão do receptor HER-2 tratadas com ácido docosahexaenóico*. Dissertação de Mestrado. Departamento de Oncologia, FMUSP; 2013.
- 104 Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B, Speed TP. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res*. 2003 Feb 15;31(4):e15.
- 105 Johnson WE, Li C, Rabinovic A. Adjusting batch effects in microarray expression data using Empirical Bayes methods. *Biostatistics*. 2007 Jan;8(1):118-27.
- 106 Breitling R, Armengaud P, Amtmann A, Herzyk P. Rank products: a simple, yet powerful, new method to detect differentially regulated genes in replicated microarray experiments. *FEBS Lett*. 2004 Aug 27;573(1-3):83-92.
- 107 Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society*. 1995;57:289-300.
- 108 Rhee SY, Wood V, Dolinski K, Draghici S. Use and misuse of the gene ontology annotations. *Nat Rev Genet*. 2008;9(7):509-15.
- 109 Zhang B, Kirov S, Snoddy J. WebGestalt: na upgrated system for exploring gene sets in various biological contexts. *Nucleic Acid Res*. 2005;33(Web Service issue):W741-8.
- 110 Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc*. 2009;4(1):44-57.
- 111 Möschler O, May AD, Müller MK, Ell C; DBE-Studiengruppe Deutschland. Complications in double-balloon enteroscopy: results of the German DBE register. *Z Gastroenterol*. 2008 Mar;46(3):266-70.
- 112 Kuga R, Safatle-Ribeiro AV, Ishida RK, Retes F, Uemura RS, Retes F, et al. Small bowel endoscopy using the double-balloon technique: four-year results in a tertiary referral hospital in Brazil. *Dig Dis*. 2008;26:318-23.
- 113 Gracey AY. Interpreting physiological responses to environmental change through gene expression profiling. *J Exp Biol*. 2007;210:1584-92.
- 114 Kim MS, Pinto SM, Getnet D, Nirujogi RS, Manda SS, Chaerkady R, et al. A draft map of the human proteome. *Nature*. 2014;509:575-81.

- 115 Wang YC, Peterson SE, Loring JF. Protein post-translational modifications and regulation of pluripotency in human stem cells. *Cell Res.* 2014;24:143-60.
- 116 Scott A, Ness. Basic Microarray Analysis. Strategies for Successful Experiments. In: *Methods in Molecular Biology*, vol. 316: Bioinformatics and Drug Discovery Edited by: RS. Larson Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- 117 Bart HJ van den Berg, Thanthiriwatte C, Manda P, and Bridges SM. Comparing gene annotation enrichment tools for functional modeling of agricultural microarray data. *BMC Bioinformatics.* 2009;10(Suppl 11):S9.
- 118 Rabasa-Lhoret R, Bastard JP, Jan V, Ducluzeau PH, Andreelli F, Guebre F, et al. Modified Quantitative Insulin Sensitivity Check Index Is Better Correlated to Hyperinsulinemic Glucose Clamp than Other Fasting-Based Index of Insulin Sensitivity in Different Insulin-Resistant States. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Oct;88(10):4917-23.
- 119 Antuna-Puente B, Faraj M, Karelis AD, Garrel D, Prud'homme D, Rabasa-Lhoret R, et al. HOMA or QUICKI: is it useful to test the reproducibility of formulas? *Diabetes Metab.* 2008 Jun;34(3):294-6.
- 120 Salehi M, Prigeon RL, D'Alessio DA. Gastric Bypass Surgery Enhances Glucagon-Like Peptide 1–Stimulated Postprandial Insulin Secretion in Humans. *Diabetes.* 2011 Sep;60(9):2308-14.
- 121 Lee CJ, Brown T, Magnuson TH, Egan JM, Carlson O, Elahi D. Hormonal Response to a Mixed-Meal Challenge After Reversal of Gastric Bypass for Hypoglycemia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013 Jul;98(7):E1208-12.
- 122 H E Wilson-Pérez. The effect of vertical sleeve gastrectomy on food choice in rats. *International Journal of Obesity.* 2013;37,288-95.
- 123 Hatzis P, Talianidis I. Regulatory mechanisms controlling human hepatocyte nuclear factor 4alpha gene expression. *Mol Cell Biol.* 2001 Nov;21(21):7320-30.
- 124 David-Silva A, Freitas HS, Okamoto MM, Sabino-Silva R, Schaan BD, Machado UF. Hepatocyte nuclear factors 1 α /4 α and forkhead box A2 regulate the solute carrier 2A2 (Slc2a2) gene expression in the liver and kidney of diabetic rats. *Life Sci.* 2013 Nov 19;93(22):805-13.
- 125 Peet DJ, Turley SD, Ma W, Janowski BA, Lobaccaro JM, Hammer RE, et al. Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR α . *Cell.* 1998 May 29;93(5):693-704.

- 126 Wanders RJ, Tager JM. Lipid metabolism in peroxisomes in relation to human disease. *Mol Aspects Med.* 1998;19(2):69-154.
- 127 Kovacs WJ, Olivier LM, Krisans SK. Central role of peroxisomes in isoprenoid biosynthesis. *Prog Lipid Res.* 2002 Sep;41(5):369-91.
- 128 Tontonoz P, Mangelsdorf DJ. Mangelsdorf. Liver X receptor signaling pathways in cardiovascular disease. *Mol Endocrinol.* 2003 Jun;17(6):985-93.
- 129 Sun LP, Li L, Goldstein JL, Brown MS. Insig required for sterol-mediated inhibition of Scap/SREBP binding to COPII proteins in vitro. *J Biol Chem.* 2005 Jul 15;280(28):26483-90.
- 130 DeBose-Boyd RA, Brown MS, Li WP, Nohturfft A, Goldstein JL, Espenshade PJ. Transport-dependent proteolysis of SREBP: relocation of site-1 protease from Golgi to ER obviates the need for SREBP transport to Golgi. *Cell.* 1999 Dec 23;99(7):703-12.
- 131 Yabe D, Brown MS, Goldstein JL. Goldstein, Insig-2, a second endoplasmic reticulum protein that binds SCAP and blocks export of sterol regulatory element-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci. U S A.* 2002 Oct 1;99(20):12753-8.
- 132 Goldstein JL, DeBose-Boyd RA, Brown MS. Protein sensors for membrane sterols. *Cell.* 2006 Jan 13;124(1):35-46.
- 133 Duval C, Touche V, Tailleux A, Fruchart JC, Fievet C, Clavey V, et al. Niemann-Pick C1 like 1 gene expression is down-regulated by LXR activators in the intestine. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Feb 24;340(4):1259-63.
- 134 DeBose-Boyd RA, Ou J, Goldstein JL, Brown MS. Expression of sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP-1c) mRNA in rat hepatoma cells requires endogenous LXR ligands. *Proc Natl Acad Sci. U S A.* 2001 Feb 13;98(4):1477-82.
- 135 Brunham LR, Kruit JK, Iqbal J, Fievet C, Timmins JM, Pape TD, et al. Intestinal ABCA1 directly contributes to HDL biogenesis in vivo. *J Clin Invest.* 2006 Apr;116(4):1052-62.
- 136 Hassan HH, Denis M, Lee DY, Iatan I, Nyholt D, Ruel I, et al. Identification of an ABCA1-dependent phospholipid-rich plasma membrane apolipoprotein A-I binding site for nascent HDL formation: implications for current models of HDL biogenesis. *J Lipid Res.* 2007 Nov;48(11):2428-42.

- 137 Lionetti L, Mollica MP, Lombardi A, Cavaliere G, Gifuni G, Barletta A. From chronic overnutrition to insulin resistance: the role of fat-storing capacity and inflammation. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2009;19(2):146-52.
- 138 Castilho G. *Inibição do estresse do retículo endoplasmático restaura o conteúdo de ABCA-1 e o efluxo de colesterol em macrófagos tratados com albumina modificada por glicação avançada* [tese]. São Paulo: FMUSP; 2012. 96p.
- 139 Shen X, Zhang K, Kaufman RJ. The unfolded protein response—a stress signaling pathway of the endoplasmic reticulum. *J Chem Neuroanat*. 2004 Sep;28(1-2):79-92.
- 140 Basseri S, Austin RC. Endoplasmic reticulum stress and lipid metabolism: mechanisms and therapeutic potential. *Biochem Res Int*. 2012;2012:841362.
- 141 Higuchi N, Kato M, Shundo Y, Tajiri H, Tanaka M, Yamashita N, et al. Liver X receptor in cooperation with SREBP-1c is a major lipid synthesis regulator in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res*. 2008;38(11):1122-9.
- 142 Horton JD. Sterol regulatory element-binding proteins: transcriptional activators of lipid synthesis. *Biochem Soc Trans*. 2002 Nov;30(Pt 6):1091-5.
- 143 Ferré P, Foufelle F. Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. *Diabetes Obes Metab*. 2010 Oct;12 Suppl 2:83-92.
- 144 Kohjima M, Higuchi N, Kato M, Kotoh K, Yoshimoto T, Fujino T, et al. SREBP-1c, regulated by the insulin and AMPK signaling pathways, plays a role in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Med*. 2008 Apr;21(4):507-11.
- 145 Schadinger SE, Bucher NL, Schreiber BM, Farmer SR. PPAR γ 2 regulates lipogenesis and lipid accumulation in steatotic hepatocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005 Jun;288(6):E1195-205.
- 146 Nguyen P, Leray V, Diez M. Liver lipid metabolism. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 2008;92(3):272-83.
- 147 Lin, G, Bornfeldt, KE. Os inibidores cíclicos da fosfodiesterase 4 específicos da AMP promovem a expressão de ABCA1 e o efluxo de colesterol. *Biochem Biophys Res Commun* de 2002. 290 : 663-669; *J Lipid Res*. 2006 Nov;47(11):2433-43.

- 148 Vaughan AM, Oram JF. BCA1 and ABCG1 or ABCG4 act sequentially to remove cellular cholesterol and generate cholesterol-rich HDL. *J Lipid Res.* 2006 Nov;47(11):2433-43.
- 149 Davies JP, Scott C, Oishi K, Liapis A, Ioannou YA. Inactivation of NPC1L1 causes multiple lipid transport defects and protects against diet-induced hypercholesterolemia. *J Biol Chem.* 2005 Apr 1;280(13):12710-20.
- 150 Couture P, Tremblay AJ, Kelly I, Lemelin V, Droit A, Lamarche B. Key intestinal genes involved in lipoprotein metabolism are downregulated in dyslipidemic men with insulin resistance. *J Lipid Res.* 2014 Jan;55(1):128-37.
- 151 Veilleux A. Alteration in intestinal insulin signaling in obese subjects and their effect on lipid and lipoprotein metabolism. *Diabetes.* 61(Suppl. 1): A15 .
- 152 Pirola L, Balcerzyk A, Tothill RW, Haviv I, Kaspi A, Lunke S, et al. A Genome-wide analysis distinguishes hyperglycemia regulated epigenetic signatures of primary vascular cells. *Genome Res.* 2011 Oct;21(10):1601-15.
- 153 Ma YZ, Jiang QY, Kong DQ. Association between matrix metalloproteinase 1 and type 2 diabetes mellitus coexisting with coronary heart disease in a Han Chinese population. *Genet Mol Res.* 2016 Jun 10;15(2).
- 154 Hong F, Breitling R, McEntee CW, Wittner BS, Nemhauser JL, Chory J. RankProd: a bioconductor package for detecting differentially expressed genes in meta-analysis. *Bioinformatics.* 2006; 22:2825-7.
- 155 Bueno DF, Sunaga DY, Kobayashi GS, Agüena M, Raposo-Amaral CE, Masotti C, et al. Human stem cell cultures from cleft lip/palate patients show enrichment of transcripts involved in extracellular matrix modeling by comparison to controls. *Stem Cell Rev.* 2011;7:446-57.
- 156 Pellegrino R, Sunaga DY, Guindalini C, Martins RC, Mazzotti DR, Wei Z, et al. Whole-blood genome-wide gene expression profile in males after prolonged wakefulness and sleep. *Physiol Genomics.* 2012; 44:1003-12.
- 157 Griesi-Oliveira K, Acab A, Gupta AR, Sunaga DY, Chailangkarn T, Nicol X et al. Modeling non-syndromic autism and the impact of TRPC6 disruption in human neurons. *Molecular Psychiatry.* 2015;11:1350-65.

- 158 Griesi-Oliveira K, Sunaga DY, Alvizi L, Vadasz E, Passos-Bueno MR.. Stem Cells as a good tool to investigate dysregulated biological systems in autism spectrum disorders. *Autism Res.* 2013;5:354-61.
- 159 St Laurent G, Shtokalo D, Tackett MR, Yang Z, Vyatkin Y, Milos PM, et al. On the importance of small changes in RNA expression. *Methods.* 2013;63:18-24.
- 160 Johnstone DM, Riveros C, Heidari M. Evaluation of Different Normalization and Analysis Procedures for Illumina Gene Expression Microarray Data Involving Small Changes. *Microarrays.* 2013;2:131-52.
- 161 Toescu EC, Verkhatsky A. The importance of being subtle: small changes in calcium homeostasis control cognitive decline in normal aging. *Aging Cell.* 2007;6:267-73.
- 162 Kammers K, Cole RN, Tiengwe C. Detecting significant changes in protein abundance. Elsevier- EuPA *Open Proteomics.* 2015;7:11-9.
- 163 Morey JS, Ryan JC, Van Dolah FM. Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. *Biol Proced Online.* 2006;8:175-93.
- 164 Bigler J, Rand HA, Kerkof K, Timour M, Russell CB. Cross-study homogeneity of psoriasis gene expression in skin across a large expression range. *PLoS One.* 2013;8:e52242.

APÊNDICES

APÊNDICES

Apêndice A - Publicação sobre as alterações dos genes da família REG em pacientes com DM2 submetidos à DGYR

Priscila Sala <sala.priscila@gmail.com>

Ms# OBSU-D-16-00704 Suggested for Revision

Obesity Surgery <em@editorialmanager.com>
Responder a: Obesity Surgery <obsu.rodriguez@gmail.com>
Para: Priscila Sala <sala.priscila@gmail.com>

6 de dezembro de 2016 11:19

Dear Mrs Sala:

I have received the requested reviews for your manuscript, "Type 2 Diabetes Remission After Roux-en-Y Gastric Bypass: Evidence for Increased Expression of Jejunal Genes Encoding Regenerating Pancreatic Islet-Derived Proteins as a Potential Mechanism" (Ms# OBSU-D-16-00704), which you submitted to Obesity Surgery.

Considering all of the reviews and suggestions included below, we would be happy to receive a revision of your manuscript, with all of the suggested changes and comments sufficiently addressed. Please note that all revisions are subject to re-review and your submission of a revision does not guarantee acceptance by Obesity Surgery.

When preparing your revised manuscript, please address each reviewer point in your reply, as your response will be sent to reviewers if the paper is sent out for re-review. Your list of responses should be entered into the "Respond to comments" field (step 10), and also included as a required -uploaded separate file- in Step 11 of the submission process.

Please remove your previously submitted manuscript document, and then upload two (2) new versions of your revised manuscript text in Step 11:

- 1) A clean, revised copy, and
- 2) An annotated copy to show where your edits have been made in the text. You may underline, bold or indicate in red any changed/edited parts of your revised manuscript. Please be sure to indicate in parentheses after each change, which reviewer comment you are addressing. e.g., (reviewer #1, comment #2).

The preferred format for any uploaded figures is TIF or EPS format.

Note: Obesity Surgery prefers to receive your revision as soon as possible, but no later than two (2) months from the date of this decision letter. Revisions and resubmissions that are not received within two months of the initial decision will consequently be removed from consideration, unless the Editorial Office is notified of your need for alternate arrangements. This essential communication will allow us to maintain a steady course of action, and establish a final status on manuscripts as soon as possible. If a revised manuscript is received after two months, it will be considered a new submission unless other arrangements have been established.

In order to add the due date to your electronic calendar, please open the attached file.

Please promptly notify the Editorial Office if you have any questions about submitting your revision, or if you decide to not submit a revision.

In order to submit your revised manuscript, please access the following web site:

<http://obsu.edmgr.com/>

Your username is: prisala

Your password is: available at this link http://obsu.edmgr.com/Default.aspx?pg=accountFinder.aspx&firstname=Priscila&lastname=Sala&email_address=sala.priscila@gmail.com

Click "Author Login" to submit your revision.

We look forward to receiving your revised manuscript before Feb 04, 2017.

Please make sure to submit your editable source files (i.e. Word, Tex).

Best regards,

Scott Shikora, MD
Editor-in-Chief
Obesity Surgery

COMMENTS FOR THE AUTHOR:

Reviewer #1: The study is very interesting and helps to elucidate the complex mechanisms of glycemic improvement after RYGB even before weight loss.

Some suggestions to improve the manuscript's comprehension:

There are some typos to correct.

The baseline and one year postoperative characteristics of each patient should be inserted in a table, in order to show if there are differences between patients that achieved remission from those who did not. That may help to identify if patients with better preop glycemic control have greater chances to remit.

2009 Buse et al criteria for diabetes remission were employed according to that maybe flawed definitions, it's necessary no medications for type 2 diabetes for at least one year. Were all meds withdrawn immediately after surgery? Otherwise, the remission status should be corrected. That should be mentioned within "methods" and approached in "discussion".

Reviewer #2: This is a potentially important communication in which the authors demonstrate the increase in a protein known to regulate beta cell mass in animals. Trying to put the data in context to understand if the implication is that the gene expression reflects. It is not entirely clear that beta cell mass increases after bariatric surgery. I am curious do you have any serum markers that correlate with this finding? stimulated c peptide? does this correlate?

GENERAL NOTE 1

Please remember that Obesity Surgery requires three separate statements to be included in three distinct sections of EVERY article, and they should be located in the manuscript just above the list of References:

a. A Conflict of Interest Statement: ALL author names must be included in this statement, and each must indicate potential conflict of interest, or "no conflict of interest." All potential benefits in any form from a commercial party related directly or indirectly to the subject of this manuscript or any of the authors must be acknowledged. For each source of funds, both the research funder and the grant number should be given.

b. A Statement of Informed Consent (when reporting studies that involve human participants): "Informed consent was obtained from all individual participants included in the study."

If identifying information is available in the article: "Additional informed consent was obtained from all individual participants for whom identifying information is included in this article."

c. A Statement of Human and Animal Rights: Please see section 2B.i. of the Instructions for Authors for specific statement requirements.

Deana Rodriguez
Managing Editor
Editorial Office
Phone: (562) 961-9928
Fax: (562) 321-5789
Email: obsu.rodriguez@gmail.com

Type 2 Diabetes Remission After Roux-en-Y Gastric Bypass: Evidence for Increased Expression of Jejunal Genes Encoding Regenerating Pancreatic Islet-Derived Proteins as a Potential Mechanism

Priscila Sala¹, Raquel Susana Torrinhas¹, Danielle Cristina Fonseca¹, Steven Heymsfield², Daniel Giannella-Neto³, Dan Linetzky Waitzberg¹

¹FMUSP – University of São Paulo, School of Medicine, Department of Gastroenterology, Digestive Surgery Discipline (LIM 35), São Paulo, Brazil; ²Pennington Biomedical Research Center, Baton Rouge, Louisiana, USA; ³University Nove de Julho, São Paulo, Brazil.

Running title: Remission of Diabetes Mechanism

Correspondence to: Priscila Sala Av. Dr. Arnaldo, 455, 2º andar, sala 2208 Cerqueira César, CEP: 01246-903 - São Paulo – SP, Brazil. Phone/fax: +55 11 3061-7459 - E-mail: sala.priscila@gmail.com

Acknowledgements We thank Lucas Petri Damiani and Daniele Yumi for statistical discussion of the data.

Duality of interest statement The authors declare that they have no competing interest.

Abstract

Background Intestinal expression of regenerating pancreatic islet-derived protein-encoding genes (*REG*) would be enhanced after Roux-en-Y gastric bypass (RYGB) and would affect postoperative type 2 diabetes remission (T2Dr). **Methods** Intestinal biopsy samples were collected from 20 adult obese women with T2D before and 3 months after RYGB. Levels of *REG* expression and the gene encoding its putative receptor (*EXTL3*) were assessed by microarray and validated by quantitative RT-PCR. T2Dr was assessed according to ADA criteria 1 year after RYGB. **Results** After RYGB, only patients with T2Dr had significantly increased *REG1 α* and *REG3 γ* expression in the jejunum, as validated by quantitative RT-PCR. **Conclusions** Our data provide support for the hypothesis that increased jejunal expression of REG genes after RYGB affects T2Dr, possibly by playing an endocrine function.

Keywords: Type 2 diabetes mellitus; Roux-en-y gastric bypass; Regeneration genes; Glycemic control; Gene expression

Abbreviations: FG, fasting glucose; HC-FMUSP, Hospital das Clínicas, University of São Paulo, School of Medicine; REG protein, human/murine regenerating islet-derived protein; RYGB, Roux-en-Y gastric bypass; T2D, type 2 diabetes; T2Dr, type 2 diabetes remission.

Introduction

Bariatric surgery is the most effective therapy for obesity and related comorbidities, including type 2 diabetes (T2D) [1]. Improvements in glycaemic control can be observed prior to significant weight loss after gastrointestinal bypass procedures, such as Roux-en-Y gastric bypass (RYGB) [2]. Anatomic intestinal adaptation to surgical stress is speculated to increase the secretion of gut hormones related to glucose homeostasis, contributing to this antidiabetic effect [3]. Other molecular pathways involved in entero-islet responses to bariatric surgery may be implicated in postoperative type 2 diabetes remission (T2Dr).

The present study is part of a prospective clinical research effort to investigate whether T2Dr after RYGB is related to mechanistically by postoperative transcriptional changes in the gastrointestinal tract. We explored changes in intestinal expression of genes encoding regenerating islet-derived (REG) proteins and their associations with T2Dr after RYGB. Our hypothesis was that the intestinal expression of *REG* genes are enhanced after RYGB, affecting T2Dr.

Methods

This study was performed according to the Declaration of Helsinki. The protocol was approved by the local ethics committee (CAPPesq 1011/09) and registered at www.ClinicalTrials.gov (NCT01251016). Written informed consent was obtained from all patients.

Subjects Twenty adult (age 18–60 years) women admitted for elective RYGB to the Gastrointestinal Surgery Division of the HC-FMUSP, participated in the study. Inclusion criteria were BMI ≥ 35 kg/m², and diagnosis of T2D (fasting plasma glucose ≥ 126 mg/dL and HbA_{1c} $\geq 6.5\%$) and/or use of oral antidiabetic medication. Exclusion criteria were *Helicobacter pylori* infection, insulin use, thyroid or hepatic disease, and current or recent (<1 year) participation in another interventional study.

Bariatric procedure Patients underwent standardised RYGB with biliary-pancreatic loops (50–60 cm) and feed handles (100–120 cm).

Biopsy sample collection Serial biopsies of the duodenum, jejunum, and ileum mucosa (10–15 mg) were performed during double-balloon enteroscopy via oral access under deep sedation some weeks before and 3 months after RYGB. Preoperative intestinal biopsy sites were marked with India ink SPOT™ (GI Supply, Camp Hill, PA, USA), allowing postoperative sample collection from the same sites.

Transcriptomic analyses RNA was extracted from intestinal biopsy samples using the RNeasy Plus kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). Matching pre- and postoperative samples with ≥ 100 ng/ μ L RNA and RNA integrity numbers ≥ 7 were analysed using the microarray technique. RNA concentration and quality were assessed with an ND-1000™ spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) and an Agilent 2100 Bioanalyzer™ system (Agilent Biotechnologies, Santa Clara, CA, USA), respectively. Expression of REG-encoding genes and their putative receptor (*EXTL3*) was assessed with the Human GeneChip 1.0 ST Array (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA, USA), according to the manufacturer's recommendations. Array quality was checked by boxplot, correlation, and principal component analysis using the R/Bioconductor program (www.bioconductor.org). The significance of microarrays and rank product methods were analysed to select differentially expressed genes, using the criterion of $p < 0.05$ (corrected for false discovery rate). Altered gene expression levels were validated by quantitative RT-PCR using TaqMan gene expression assays (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's recommendations. β -actin was used as the reference gene, based on the results of pilot studies testing different approaches to identify the most suitable reference for our tissue samples.

T2Dr assessment Patients were followed for 1 year after RYGB to identify T2Dr according to the ADA criteria [4], which define complete T2Dr as HbA_{1c} < 6% (<42 mmol/mol) and fasting glucose (FG) < 100 mg/dL (5.6 mmol/L), and partial T2D as HbA_{1c} < 6.5% (<48 mmol/mol) and FG 100–125 mg/dL (5.6–6.9 mmol/L), both in the absence of oral antidiabetic medication use or other antidiabetic procedure for at least 1 year. Patients presenting complete and partial T2Dr were considered to show and not show disease remission, respectively.

Sample size and statistical analysis A sample size of 20 patients was estimated using the nonparametric Wilcoxon signed-rank test, assuming 80% power and a significance level of 5%. Size effect was calculated considering approximately twice the level of gastrointestinal hormone variation in the postoperative period, compared with the preoperative period. For the same power and significance level, the Wilcoxon signed-rank test could detect differences in REG expression with an effect size ≥ 1.35 times the SD of the difference with a minimum sample of seven patients.

Data were compared using parametric (ANOVA) and nonparametric tests (as applicable) for the entire patient sample and separately for patients with and without T2Dr. Statistical analysis was performed with a 5% α error level and a 20% β error level. Descriptive data were reported as the mean $\pm$ SD, using the R software (version 3.1.3, 2015; R Core Team, Vienna, Austria).

Results

Patients All 20 enrolled patients completed the study protocol. In the preoperative period, the median age was 46.5 (range, 33–59) years, mean ($\pm$ SD) body weight was 115.0 ± 16.0 kg, and mean BMI was 46.5 ± 5.3 kg/m². Mean HbA_{1c} and FG levels were $9.2\% \pm 1.6\%$ and 221.1 ± 69.4 mg/dL, respectively. Three months postoperatively, mean body weight was 94.5 ± 12.8 kg and mean BMI was 38.2 ± 4.2 kg/m². Mean HbA_{1c} and FG levels were $6.2\% \pm 0.5\%$ and 105.4 ± 23.9 mg/dL, respectively. One year postoperatively, T2Dr was observed in 12 patients.

Success of transcriptomic analysis Fig. 1 is a flowchart of the sample and collection of RNA for transcriptomic analysis. Adequate tissue samples for the analysis of gene expression were obtained from all enrolled patients, but not from all intestinal segments in all cases due to stenosis in the biliopancreatic limb ($n = 3$) and the common limb ($n = 2$) in the postoperative period. Adequate RNA was obtained from matching pre- and postoperative samples of the duodenum, jejunum, and ileum in 70%, 80%, and 60% of cases, respectively.

REG expression Table 1 presents data on REG expression. After RYGB, only patients with T2Dr showed significantly increased *REG1 α* and *REG3 γ* expression in the jejunum. Patients with and without T2Dr presented significantly increased *REG1 β* expression in all studied intestinal segments. Significantly increased expression of *REG1 α* in the duodenum and ileum, *REG3 γ* in the ileum, and *REG4* in the duodenum was also observed, but these increases were not correlated with the presence or absence of T2Dr. No change in *EXTL3* gene expression was found. Gene validation confirmed significantly increased *REG1 α* and *REG3 γ* expression in the jejunum in patients with T2Dr, and significantly increased *REG1 β* expression in the jejunum and ileum in the total patient population.

Discussion

To our knowledge, this study was the first to assess *REG* mRNA at multiple intestinal sites of patients with and without T2Dr after RYGB. We found significant increases in the expression of several genes in the human *REG* family. Some of these changes were observed and validated only in patients presenting T2Dr.

Terazono et al. [5] first isolated *Reg*, expressed specifically in regenerating islets, from the remaining pancreas of rats depancreatized (90%) by the administration of poly (ADP-ribose) synthetase inhibitors. Later, the expression of most genes in the *REG* family in multiple organs, such as the intestine, was recognized. REG proteins can play central roles in cell functions, including differentiation, proliferation, and apoptosis, in many tissues [6].

Recombinant rat REG proteins stimulate β -cell replication and increase β -cell mass in the residual pancreas of depancreatized rats, ameliorating surgical diabetes [5]. Researchers have observed 68% homology between the human and rat REG protein amino-acid sequences [5, 7]. Recombinant human REG protein also induces expansion of the β -cell mass in non-obese diabetic mice, resulting in the amelioration of diabetes [7, 8].

Changes in intestinal Reg expression after duodenal-jejunal bypass were recently assessed as potential contributors to T2Dr in an experimental model of T2D [9]. Early relief of hyperglycaemia and hyperinsulinemia was observed before weight loss. These effects occurred in parallel with markedly increased *Reg1* and *Reg3 β* expression in the jejunum, with a concurrent increase in the epithelial proliferation rate. These experimental findings suggest strongly that REG proteins play the common role of promoting intestinal replication for mucosal regeneration and/or maintenance after bariatric surgery. However, the authors failed to impute a potential role of such proteins as endocrine factors affecting islet function [9].

Our study in humans was limited due to the small tissue samples obtained by intestinal biopsy, which precluded targeted protein expression analyses to validate our gene findings using a more physiological approach. Despite this limitation, by comparing patients with and without T2Dr, we produced data that strongly suggest the endocrine function of REG proteins after RYGB. The postoperative expression of some *REG* genes, including *REG 1 α* in the jejunum, was increased significantly only in patients with T2Dr. Serum REG 1 α protein levels were recently reported to be higher in patients with T2D than in healthy controls (in an apparent effort to regenerate islet β cells), and in patients with short-term T2D compared with those with T2D of longer duration [10]. Therefore, increased intestinal secretion of this protein may have a role in T2Dr after RYGB.

Funding This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) project (no. 2011/09612-3) and scholarship DD (2013/03246-0).

Contribution statement PS contributed to the study design, conception, and coordination; data acquisition, analysis, and interpretation; and drafting of the manuscript. RST contributed to the study design and data interpretation, and wrote the manuscript. DCF contributed to data acquisition and interpretation. SH and DGN contributed to the study design and data interpretation. DLW contributed to the study design, conception, and coordination and to data interpretation. All authors critically revised the manuscript, gave their final approval, and agree to be accountable for all aspects of the described study, ensuring its integrity and accuracy.

References

1. Colquitt JL, Pickett K, Loveman E, et al. Surgery for weight loss in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;8:CD003641.
2. Gastaldelli A, Iaconelli A, Gaggini M, et al. (2016) Short-term effects of laparoscopic adjustable gastric banding versus Roux-en-Y gastric bypass. *Diabetes Care*. 2016;Aug, 29. Doi.org/10.2337/dc15-2823 [Epub ahead of print].
3. Sala PC, Torrinhas RS, Giannella-Neto D, et al. Relationship between gut hormones and glucose homeostasis after bariatric surgery. *Diabetol Metab Syndr*. 2016;6(1):87.
4. Buse JB, Caprio S, Cefalu WT, et al. How do we define cure of diabetes? *Diabetes Care*. 2009;32(11):2133–2135.
5. Terazono K, Yamamoto H, Takasawa S, et al. A novel gene activated in regenerating islets. *Biol Chem*. 1998;15;263(5):2111–2114.
6. Parikh A, Stephan AF, Tzanakakis ES. Regenerating proteins and their expression, regulation and signaling. *Biomol Concepts*. 2012;3(1):57–70.
7. Watanabe T, Yonemura Y, Yonekura H, et al. Pancreatic beta-cell replication and amelioration of surgical diabetes by REG protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:3589–3592.
8. Okamoto H. The REG gene family and REG proteins: with special attention to the regeneration of pancreatic beta-cells. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 1999;6(3):254–262.
9. Li B, Lu Y, Srikant CB, et al. Intestinal adaptation and REG gene expression induced by antidiabetic duodenal-jejunal bypass surgery in Zucker fatty rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2013;304(7):G635–645.
10. Uppal SS, Naveed AK, Baig S, et al. Expression of REG α gene in type 2 diabetics in Pakistan. *Diabetol Metab Syndr*. 2015;13(7):96.

Fig. 1 Flowchart of biopsies and collection of adequate RNA samples for transcriptomic analysis.

^a >100 ng/μL and/or RNA integrity number ≥ 7 . ^bStenosis in the biliopancreatic limb ($n = 3$). ^cStenosis in the common limb ($n = 2$). ^dTotal numbers of matched pre- and postoperative samples with adequate RNA, included in microarray analysis. Black blocks indicate final numbers of biopsy samples subjected to quantitative RT-PCR

Table 1 Changes in regenerating islet-derived protein-encoding gene (REG) expression in intestinal segments of obese patients with and without type 2 diabetes remission (T2Dr) after Roux-en-Y gastric bypass

Gene	Duodenum			Jejunum			Ileum		
	Total	T2Dr	No T2Dr	Total	T2Dr	No T2Dr	Total	T2Dr	No T2Dr
<i>REG1α</i>	+0.299 (M) +0.219 (V)	+0.165 (M)	+0.477 (M)	+0.471 (M) +0.209(V)	+0.497 (M) +0.415 (V)	+0.415 (M)	+0.389 (M) +0.684 (V)	+0.323 (M)	+0.523 (M)
<i>REG1β</i>	+0.785 (M) +0.672 (V)	+0.569 (M) −0.643 (V)	+1.072 (M) +2.776 (V)	+2.082 (M) +2.276 (V)	+1.990 (M) +2.340 (V)	+2.284 (M) +2.321 (V)	+1.526 (M) +1.438 (V)	+1.290 (M) +1.327 (V)	+1.998 (M) +2.508 (V)
<i>REG3γ</i>	+0.156 (M)	+0.098 (M)	+0.233 (M)	+0.532(M) +1.698 (V)	+0.555 (M) +1.658 (V)	+0.482 (M)	+0.333 (M) +1.302 (V)	+0.369 (M)	+0.261 (M)
<i>REG4</i>	−0.446 (M) −0.641 (V)	−0.421 (M)	−0.480 (M)	−0.015 (M)	−0.015 (M)	−0.015 (M)	−0.130 (M)	−0.148 (M)	−0.093 (M)
<i>REG3α</i>	+0.154 (M)	+0.055 (M)	+0.287 (M)	+0.211 (M)	+0.240 (M)	+0.148 (M)	+0.156 (M)	+0.117 (M)	+0.235 (M)
<i>EXTL3</i>	−0.035 (M)	−0.033 (M)	−0.039 (M)	−0.054 (M)	+0.056 (M)	+0.049 (M)	+0.068 (M)	+0.052 (M)	+0.098 (M)

Negative and positive values indicate decreased and increased expression, respectively. Bold values indicate significant changes ($p \leq 0.05$). (M), microarray analysis; (V), validation by quantitative RT-PCR

Apêndice B - Produção Científica do Doutorado

ARTIGOS EM REVISTAS CIENTÍFICAS INDEXADAS

Sala PC, Torrinhas RS, Giannella-Neto D, Waitzberg DL. Relationship between gut hormones and glucose homeostasis after bariatric surgery. *Diabetol MetabSyndr*. 2014 Aug 16;6(1):87. doi: 10.1186/1758-5996-6-87.

Sala PC, Torrinhas RS, Heymsfield SB, Waitzberg DL. Type 2 diabetes mellitus: a possible surgically reversible intestinal dysfunction. *Obes Surg*. 2012Jan;22(1):167-76. doi: 10.1007/s11695-011-0563-2.

Cardinelli CS, **Sala PC**, Alves CC, Torrinhas RS, Waitzberg DL. Influence of Intestinal Microbiota on Body Weight Gain: a Narrative Review of the Literature. *Obes Surg*. 2014 Dec 17. DOI: 10.1007/s11695-014-1525-2.

Silva MM, **Sala PC**, Torrinhas RSMM, Waitzberg DL. Efficiency of the 24-hour food recall instrument for assessing nutrient intake before and after Roux-en-Y gastric bypass. *Nutr Hosp*. 2014;30(6):1240-1247. DOI: 10.3305/nh.2014.30.6.7828.

Marques M, **Sala PC**, Cardinelli CS, Torrinhas RS, Waitzberg DL. Comparison of virtual nutri plus® and dietpro 5i® software systems for the assessment of nutrient intake before and after Roux-en-Y gastric bypass. *Clinics*. 2014;69(11):714-722. DOI: 10.6061/clinics/2014(11)02.

Belarmino G, Horie LM, **Sala PC**, et al. Body adiposity index performance in estimating body fat in a sample of severely obese Brazilian patients. [Nutr J](#). 2015 Dec 30;14(1):130.

Sala P, Belarmino G, Machado NM, et al. The SURMetaGIT Study: Design and Rationale for a Prospective Pan-Omics Examination of the Gastrointestinal Response to Roux-en-Y Gastric Bypass Surgery. J Int Med Res. 2016 Nov 10.

Sala P, Giliane B, Torrinhas RSMM, et al. Gastrointestinal Transcriptomic Response of Metabolic Vitamin B12 Pathways in Roux-en-Y Gastric Bypass. Clin Transl Gastroenterol. 2017 Jan 5;8(1):e212.

ARTIGOS EM FASE FINAL DE ANÁLISE

Sala P, Torrinhas RS, et al. Type 2 diabetes remission after Roux-en-Y gastric bypass is accompanied by increased jejunal expression of genes encoding regenerating islet-derived proteins in obese patients [revista Diabetologia].

Sala P, Torrinhas RS, et al. Review - Tissue-specific methylation profile in obese patients with type 2 diabetes before and after Roux-en-Y gastric bypass [revista Diabetology & Metabolic Syndrome].

ARTIGOS EM FASE FINAL DE REDAÇÃO

Sala P, Belarmino G, Machado NM, et al. Reduced intestinal FADS1 gene expression after Roux-en-Y Gastric Bypass: a potential marker for the deficiency of omega-3 fatty acids.

Sala P, Belarmino G, Machado NM, et al. Gastrointestinal Response to Roux-en-Y Gastric Bypass and Postoperative Ghrelin Behavior.

Sala P, Belarmino G, Machado NM, et al. Patterning Endogen Control for Gene Expression Analysis in Human Gastrointestinal Tissue.

TRABALHOS APRESENTADOS EM CONFERÊNCIAS INTERNACIONAIS
N = 14

PC Sala, G Belarmino, NM Machado, et al. **Pôster** - Reduced Transcobalamin I Gene expression Following Roux-en-Y Gastric Bypass Surgery Can Contribute to B12 Deficiency. Evento: Boston convention & Exhibition Center Congress. Data: 01 de abril de 2015. The FASEB Journal, At 1 Supplement LB350, Volume: 29.

PC Sala, G Belarmino, NM Machado, et al. **Tema livre**. Roux-en-Y Gastric Bypass surgery and folate deficiency: contribution reduced gene expression of folate transporters (SLC19A1 e SLC46A1) in a low folate intake. Evento: Congresso da ESPEN – Lisboa. Data: 5 a 8 de setembro de 2015. Clinical Nutrition_34, S5-S6. DOI: 10.1016/S0261-5614(15)30112-6.

PC Sala, G Belarmino, NM Machado, et al. **Pôster** - Reduced trypsin I (PRSS1) gene expression a following roux-en-y gastric bypass surgery: potential contribution to reduced net protein intake. Evento: Congresso da ESPEN – Lisboa. Data: 5 a 8 de setembro de 2015. Clinical Nutrition, At S26, Volume: 34 DOI: 10.1016/S0261-5614(15)30160-6. SELECIONADO ENTRE OS 60 MELHORES DO CONGRESSO PARA O POSTER TOUR E GANHOU O PRÊMIO GRANT TRAVEL ENTRE OS 35 MELHORES TRABALHOS.

G Belarmino, LM Horie, **PC Sala**, et al. **Pôster** - Development of a new body adiposity score for fat mass estimation in brazilian obese population. Evento: Congresso da ESPEN – Lisboa. Data: 5 a 8 de setembro de 2015. Clinical Nutrition, At S133, Volume: 34. DOI: 10.1016/S0261-5614(15)30448-9. - SELECIONADO ENTRE OS 60 MELHORES DO CONGRESSO PARA O POSTER TOUR E GANHOU O PRÊMIO GRANT TRAVEL ENTRE OS 35 MELHORES TRABALHOS.

G Belarmino, LM Horie, **PC Sala**, et al. **Pôster** - Performance of body adiposity index in estimating fat mass in a brazilian obese population. Evento: Congresso da ESPEN – Lisboa. Data: 5 a 8 de setembro de 2015. Clinical Nutrition, 2015. DOI:10.1016/S0261-5614(15)30449-0.

Sala PC, Belarmino G, Machado NM, et al. **Pôster** - Reduced Intestinal FADS1 Gene Expression After Roux-en-Y Gastric Bypass Suggests a Potential Mechanism Contributing for Postoperative remission of Obesity-related Comorbidities and a Potential Marker for the Need of Postoperative Omega-3 Fatty Acids Supplementation. Evento: Congresso da ASPEN – Austin/Texas, apresentado em Janeiro de 2016.

Sala PC, Belarmino G, Machado NM et al. **Pôster** - Reduced Intestinal Amylase Alpha 2B (AMY2B) Gene Expression after Roux-en-Y Gastric Bypass: Contribution to Reduced Fiber Intake after Surgery. Evento: Congresso da ESPEN – Dinamarca. Data: 17 a 20 de setembro de 2016. Clinical Nutrition 35, S45-S46.

Sala PC, Belarmino G, Machado NM et al. **Pôster** - Contribution of Reduced Post-Operative Intestinal Ceruloplasmin Gene Expression Following Roux-en-Y Gastric Bypass Surgery to Copper and Iron Deficiency. Evento: Congresso da ESPEN – Dinamarca. Data: 17 a 20 de setembro de 2016. Clinical Nutrition 35, S27-S28.

Fonseca DC, **Sala P**, Belarmino G et al. **Tema Livre** - Decreased bitter taste receptor gene expression in small intestine after Roux-en-Y Gastric Bypass could contribute to reduced vegetable consumption. Evento: Congresso da ESPEN – Dinamarca. Data: 17 a 20 de setembro de 2016. Clinical Nutrition 35, S14.

Belarmino G, **Sala P**, Machado NM, et al. **Tema Livre** – Changes in Expression Intestinal Tissue of BMPs of Type 2 Diabetes Patients Submitted to Roux-em-Y Gastric Bypass. Evento: Congresso da ESPEN – Dinamarca. Data: 17 a 20 de setembro de 2016. Clinical Nutrition 35, S15.

Fonseca DC, **Sala P**, Belarmino G et al. **Pôster** - Increased ghrelin levels after Roux-en-Y gastric bypass is associated with an upregulation of ghrelin (GHRL) gene expression in excluded stomach in humans. Evento: Congresso XXI IFSO World Congress – Brasil. Data: 28 de setembro a 01 de outubro de 2016.
Prêmio: melhor pôster.

Sala P, Belarmino G, Machado NM et al. **Pôster** - Changes in intestinal gene expression after Roux-en-Y Gastric Bypass could contribute to Alzheimer Disease (AD) risk reduction. Evento: Congresso XXI IFSO World Congress – Brasil. Data: 28 de setembro a 01 de outubro de 2016.

Sala P, Horie LM, Belarmino G et al. **Pôster** - Comparative performance of two methods for the diagnosis of metabolic syndrome (MetS) in obese Brazilian and correlation with Edmonton Obesity Staging System (EOSS). Evento: Congresso XXI IFSO World Congress – Brasil. Data: 28 de setembro a 01 de outubro de 2016.

Sala P. Prêmio IFSO Scholarship 2016. Evento: Congresso XXI IFSO World Congress – Brasil. Data: 28 de setembro a 01 de outubro de 2016

TRABALHOS APRESENTADOS EM CONFERÊNCIAS NACIONAIS N = 11

Sala PC, Belarmino G, et al. **Tema Livre** - Redução na expressão do gene da transcobalamina I após Gastroplastia Redutora a Y-Roux pode contribuir para a deficiência de vitamina B12. Evento: Congresso Ganepão. Data: de 17 a 20 de junho de 2015.

Sala PC, Belarmino G, et al. **Tema Livre** - Redução da expressão do gene tripsina I (PRSS1) após Gastroplastia Redutora a Y-Roux: potencial contribuição para a redução da ingestão proteica após cirurgia. Evento: Congresso Ganepão. Data: 17 a 20 de junho de 2015.

Sala PC, Belarmino G, et al. **Pôster** - Gastroplastia Redutora a Y-Roux e deficiência de folato: a contribuição da reduzida expressão de genes de transportadores de folato (SLC19A1 e SLC46A1) em adição ao baixo consumo alimentar. Evento: Congresso Ganepão. Data: 17 a 20 de junho de 2015.

Sala PC, Belarmino G, et al. **Pôster** - A contribuição da reduzida expressão de genes transportadores de folato (SLC19A1 e SLC46A1) em adição ao baixo consumo alimentar na deficiência desse micronutriente após Gastroplastia Redutora a Y-Roux. Evento: Congresso SBAN. Data: 25 a 27 de agosto de 2015.

Sala PC, Belarmino G, et al. **Pôster** - Mecanismo moleculares envolvidos na deficiência de vitamina B12 após Gastroplastia Redutora a Y-Roux. Evento: Congresso SBAN. Data: 25 a 27 de agosto de 2015.

Belarmino G, Horie LM, **Sala PC**, et al. **Pôster** - Desempenho do índice de adiposidade corporal em obesos brasileiros. Evento: Congresso SBAN. Data: 25 a 27 de agosto de 2015.

Belarmino G, Horie LM, Torrinhas RSM, **Sala PC**, et al. **Pôster** - Desenvolvimento de um novo escore para estimar adiposidade corporal para obesos brasileiros. Evento: Congresso SBAN. Data: 25 a 27 de agosto de 2015.

Sala P, Belarmino G, Torrinhas RSM, et al. **PRÊMIO** - Reprogramação genética gastrointestinal do metabolismo da vitamina B12 em reposta a cirurgia de Derivação Gástrica em Y-Roux (DGYR). Evento: Congresso Ganepão. Data: 15 a 18 de Junho de 2016 - GANHOU O PRÊMIO GANEP 35 ANOS: CATEGORIA – MELHOR TRABALHO CLÍNICO.

Sala P, Belarmino G, Machado NM et al. **Tema Livre** - Derivação Gástrica em Y-Roux e Deficiência de Cobre e Ferro: A contribuição da baixa expressão intestinal do gene ceruloplasmina (CP) no pós operatório. Evento: Congresso Ganepão. Data: 15 a 18 de Junho de 2016.

Sala P, Belarmino G, Machado NM et al. **Tema Livre** - Alterações na expressão de genes intestinais após Derivação Gástrica em Y-Roux pode contribuir para a redução de risco de Alzheimer. Evento: Congresso Ganepão. Data: 15 a 18 de Junho de 2016.

Sala P, Belarmino G, Machado NM et al. **Tema Livre** - Redução da Expressão Intestinal do Gene Amylase Alpha 2B (AMY2B) após Derivação Gástrica em Y-Roux pode contribuir para menor ingestão alimentar de fibras após cirurgia. Evento: Congresso Ganepão. Data: 15 a 18 de Junho de 2016.

Bolsa de Pós Doutorado Aprovada

Priscila Sala <sala.priscila@gmail.com>

[FAPESP] - Divulgação de Resultado de Despacho

sage@fapesp.br <sage@fapesp.br>
Para: sala.priscila@gmail.com

9 de dezembro de 2016 21:16

Prezado(a) Senhor(a):

Ref.: 2016/19170-1

Comunicamos que sua solicitação de bolsa, constante do processo acima referido, foi analisada e aprovada pela FAPESP.

Por favor, aguarde o email com as instruções para confirmação de interesse pela concessão.

Para conhecimento do conteúdo do despacho, por favor, acesse o Sistema SAGE (www.fapesp.br/sage), selecionando o item do menu Meus Processos>>Número do Processo e, em Mais Informações, a opção Despacho.

Com exceção de bolsa de Pós Doutorado, a transcrição do parecer está disponível exclusivamente para o orientador, sendo de sua responsabilidade escolher os trechos a serem compartilhados com o candidato.

Caso se aplique, o benefício de auxílio instalação deve ser objeto de Solicitação de Mudança a ser apresentada no momento do Aceite da Concessão. Por favor, verifique os critérios de elegibilidade e as instruções para apresentação no site da FAPESP, em <http://www.fapesp.br/7771>.

Para qualquer consulta ou comunicação sobre esta correspondência, por favor, use exclusivamente os serviços do "Converse com a FAPESP" em www.fapesp.br/converse.

Atenciosamente,

Carlos Henrique de Brito Cruz
Diretor Científico

PENDÊNCIAS

1. Comprovante de Conclusão no Doutorado
2. Comprovante de demissão/afastamento da função de Professor Visitante no Ganep Nutrição Humana, conforme consta no Sistema Lattes atualizado em 22/09/16.

**ALTERAÇÕES NA EXPRESSÃO GÊNICA E IDENTIFICAÇÃO DA
ASSINATURA EPIGENÉTICA GASTROINTESTINAL RELACIONADAS A
RESOLUÇÃO PRECOCE E RECIDIVA TARDIA DO DIABETES TIPO 2 EM
PACIENTES APÓS 2 ANOS DA DERIVAÇÃO GÁSTRICA EM Y-ROUX**

RESUMO – BOLSA PÓS DOUTORADO

RESUMO: Derivação Gástrica em Y-Roux (DGYR) é um método efetivo para tratar obesidade, e seus efeitos metabólicos incluem controle glicêmico precoce, antes mesmo que ocorra perda ponderal significativa. No entanto, na prática clínica é comum que alguns pacientes não alcancem a remissão completa do DM2, ou que apresentem a recidiva da doença em longo prazo. Os mecanismos envolvidos na remissão precoce e recidiva tardia do DM2 após DGYR ainda são pouco compreendidos, mas como parte do estudo temático 2011/09612-3 foram identificadas alterações precoces (3 meses pós-op) na expressão de genes gastrointestinais (GI) envolvidos com a homeostase glicêmica. Atualmente sabe-se que a expressão de genes é diretamente influenciada por eventos epigenéticos como a metilação do DNA. Muito tipicamente, a hipometilação do DNA desencadeia um aumento na expressão gênica, enquanto a hipermetilação diminui a expressão dos genes-alvo. Com base nessas observações, no presente estudo pode constituir uma valiosa oportunidade (dada a limitação universal para coleta de biópsias GI) de se conhecer o comportamento tardio das alterações transcriptômicas e epigenéticas teciduais e sistêmicas induzidas por DGYR que possam estar relacionadas com a remissão e recidiva de DM2. Para isso, pretende-se avaliar alterações da expressão gênica GI 2 anos após DGYR e compará-las com aquelas encontradas nos 3 meses pós-operatório. Em adição, pretende-se avaliar alterações epigenéticas no pré-op, e pós-op de 3 meses e 2 anos da DGYR. Nossos dados poderão ser úteis para identificar genes relacionados com a recidiva de DM2 a longo prazo, e também, identificar as alterações epigenéticas que podem estar interferindo na resolução do DM2 e na recidiva da doença, no grupo de pacientes não respondedores à DGYR no que tange à melhora na homeostase glicêmica.