DILSON DA SILVA PEREIRA FILHO

**Avaliação de marcadores moleculares na
mucosa gástrica do estômago excluído após
cirurgia bariátrica**

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

Programa de Ciências em Gastroenterologia

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Vaz Safatle-Ribeiro

São Paulo

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Pereira Filho, Dilson da Silva

Avaliação de marcadores moleculares na mucosa gástrica do estômago excluído após cirurgia bariátrica / Dilson da Silva Pereira Filho. -- São Paulo, 2013.

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

Orientadora: Adriana Vaz Safatle-Ribeiro.

Descritores: 1.Cirurgia bariátrica 2.Obesidade mórbida 3.Enteroscopia de duplo balão 4.Derivação gástrica 5.Antígeno Ki-67 6.Caspase 3 7.Genes bcl-2 8.Gastrinas

USP/FM/DBD-380/13

*“É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver ...”*

Martin Luther King

Dedicatória

A minha esposa **Saori Honjo**, com amor e admiração, por sempre acreditar em mim e me apoiar, pelas renúncias que precisou fazer para tornar os meus sonhos possíveis, por compreender meus momentos de ausência, pelo seu amor, companheirismo e carinho.

Aos meus pais, **Dilson** (*in memoriam*) e **Walkíria**, exemplos de força, sabedoria, dedicação e caráter, pela educação, incentivo, carinho, amor e apoio incondicional ao longo da minha vida.

Aos meus irmãos **César** e **Lívia**, sempre presentes na minha vida familiar, e como meus grandes incentivadores na vida pessoal e profissional.

Aos meus filhos **Daniel**, **Lucas** e **Sofia** que tanto me enchem de orgulho, amor, amizade, carinho e respeito. Que desde cedo compreenderam a minha ausência para dedicar-me a este projeto de vida.

Agradecimientos

“Feliz é aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”

Cora Coralina

Esses três anos de pesquisa resumem uma árdua jornada de desafios, construções e amadurecimento pessoal e profissional. Nenhum empreendimento é realizado de forma fácil e sem esforço. E pessoas que foram peças fundamentais nesse processo merecem o meu respeito e agradecimento:

A **Deus**, que nunca removeu os obstáculos do meu caminho, mas sempre me deu forças para superá-los;

À **Profa. Dra. Adriana Vaz Safatle-Ribeiro**, idealizadora e orientadora desta pesquisa, pelo incentivo incondicional no percurso árduo desta pesquisa, pela oportunidade de aprendizado científico e pessoal, bem como pela disponibilidade e amizade então demonstradas. É um privilégio poder aprender com seu conhecimento, experiência, visão científica, e também de sua postura humana e ética exemplar;

Ao **Prof. Dr. Ulysses Ribeiro**, co-orientador, sempre presente e dedicado, pela disponibilidade, generosidade e amizade reveladas ao longo desses anos de trabalho, assim como pelas críticas, correções e sugestões relevantes feitas durante a orientação;

Aos **Professores Dr. Ivan Cecconello e Marco Aurélio Santo** que com constantes palavras de incentivo e respeito demonstrados, fortaleceram o meu ego, mantendo-me sempre focado e estimulado a realizar um bom trabalho;

Ao **Prof. Dr. Marco Aurélio Santo** e aos **doutores Osmar Kenji e Renata Coudry**, membros da minha banca de qualificação, que cujas relevantes análises e sugestões foram fundamentais nos ajustes e correções desta tese;

À técnica em laboratório, **Thaíse Tomokane**, que com sua paciência oriental, tornou mais simples o meu aprendizado sobre imuno-histoquímica;

Ao **Sr. Marcos Retzer** pela competência e qualidade dos desenhos e arte gráfica das maravilhosas gravuras que ilustram este trabalho e, que foram gentilmente cedidas por ele e pelo **Prof. Dr. Bruno Zilberstein**;

Ao **Prof. Dr. Paulo Sakai, Eduardo Moura e Fauze Maluf** por darem o apoio técnico-científico e terem permitido o meu livre acesso as dependências dos serviços de endoscopia digestiva da FMUSP e do ICESP, o que em muito possibilitou o desenvolvimento desta pesquisa.

A elaboração de qualquer trabalho também só possível com a participação de pessoas que, mesmo sem perceberem, colaboram na amizade e companheirismo que oferecem, formando um lastro que nos mantém seguros mesmo nos momentos mais difíceis. Assim, não posso deixar de agradecer:

Ao **Prof. Dr. Paulo Roberto Arruda Alves**, que me estimulou e me fez ingressar na pós-graduação da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, orientando-me grandiosamente na minha dissertação de mestrado;

A **Dra. Elisa Baba** pelas orientações histopatológicas e pelo agradável convívio durante as jornadas de trabalho no setor de endoscopia;

Ao **Dr. Denis Pajewski** pelo estímulo, paciência e amizade no ensinamento da arte da cirurgia bariátrica, elementos necessárias para o entendimento e compreensão na elaboração deste trabalho;

A **Dra. Cintia Morioka** que com sua inteligência e amizade incondicional, contribuiu nos esclarecimentos técnicos, acadêmicos e de vida que serviram de sustentação na minha vida em São Paulo e na FMUSP;

As secretárias **Vilma, Mirtes e Fabiana** que se mantiveram como minhas verdadeiras zeladoras, ajudando-me em toda a burocracia institucional e rotina acadêmica;

A todos os pacientes que nos permitiram realizar este estudo;

Àqueles que, de alguma forma, tenham contribuído para a elaboração deste trabalho e que, por infeliz omissão de minha parte, não foram aqui lembrados.

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço 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: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

Sumário

Lista de Abreviaturas e Símbolos	
Lista de Figuras	
Lista de Tabelas	
Lista de Quadros	
Resumo	
Summary	
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
2.1 Aspectos epidemiológicos da obesidade	7
2.2 Obesidade e Câncer	10
2.3 Técnicas endoscópicas e cirúrgicas para o tratamento da obesidade	14
2.4 Acessibilidade ao estômago excluído após derivação gástrica em Y-Roux	20
2.5 Imuno-histoquímica	22
2.5.1 Ki-67	24
2.5.2 Apoptose	25
2.5.3 Gastrina	30
2.5.4 Inflamação	31
3 OBJETIVOS	33
3.1 Geral	34
3.2 Objetivo específico	34
4 MATERIAL E MÉTODO	35
4.1 Casuística	36
4.2 Critérios de inclusão na amostra	37
4.3 Critérios de exclusão na amostra	37
4.4 Avaliação endoscópica dos pacientes	37
4.5 Seleção e avaliação de grupo controle	41
4.6 Análise histológica	42
4.6.1 Histologia e <i>H. pylori</i>	42
4.7 Análise imuno-histoquímica	45
4.7.1 Reação imuno-histoquímica	45
4.7.2 Técnica imuno-histoquímica	45
4.8 Análise das reações imuno-histoquímicas	48
4.9 Análise estatística	51
5 RESULTADOS	52
5.1 Resultados da imuno-histoquímica	53
5.1.1 Ki-67	53
5.1.2 Caspase 3	55
5.1.3 Gastrina	56
5.1.4 CD3 e CD8	58
5.1.5 Bcl-2	60
5.2 Resumo dos resultados	61
6 DISCUSSÃO	62
7 CONCLUSÃO	77
8 ANEXOS	79
9 REFERÊNCIAS	86
10 APÊNDICES	109

Listas

LISTA DE ABREVIATURAS e SIGLAS

µm	– Micrômetro
AO	– Aumento ótico
Bcl-2	– Proteína Bcl-2
CCK	– Colecistocinina
CD3	– Marcador geral de células T
DBA	– Diaminobenzidina
DBP	– Derivação biliopancreática
DGYR	– Derivação Gástrica em Y-de-Roux
DMSO	– Dimetilsulfóxido
DMT2	– Diabetes mellitus tipo 2
DNA	– Ácido desoxirribonucleico
DS	– Exclusão duodenal (<i>Switch</i> Duodenal)
EDB	– Enteroscópio de duplo balão
EE	– Estômago excluído
EUA	– Estados Unidos da América
FMUSP	– Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GIP	– Polipeptídeo insulinotrópico glicose dependente
HAS	– Hipertensão arterial sistêmica
HC	– Hospital das Clínicas
HE	– Hematoxilina-eosina
<i>Hp</i> ou <i>H. pylori</i>	– <i>Helicobacter pylori</i>
IBGE	– Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IHQ	– Imuno-histoquímica
IMC	– Índice de massa corpórea
Ki-67	– Antígeno Ki-67
LABG	– Banda gástrica ajustável
LIM	– Laboratório de Investigação Médica
MI	– Metaplasia intestinal
NIH	– Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América
OMS	– Organização Mundial da Saúde
p53	– Proteína p53

PBS	– Solução salina tamponada com fosfato
SM	– Síndrome metabólica
TCR	– Receptor de antígeno de células T
TGF	– Fator de transformação do crescimento
TGI	– Trato gastrointestinal
TNF	– Fator de necrose tumoral
Tp53	– Gene P53
VIGETEL	– Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico
VIP	– Polipeptídeo vasointestinal

Lista de Figuras

Figura 1 -	BALÃO INTRAGÁSTRICO. Colocado por endoscopia, preenche grande parte do estômago, desencadeando aumento da saciedade.....	16
Figura 2 -	ENDOBARRIER. Manta plástica inserida no duodeno por endoscopia convencional, recobrindo o duodeno e o jejuno proximal por aproximadamente 60 cm	16
Figura 3 -	BANDA GÁSTRICA AJUSTÁVEL. Aplicação de banda ajustável próximo ao cárdia, criando ampulheta de 20 a 30 mL ligada ao restante do estômago. Não há ressecção	17
Figura 4 -	Técnica de MASON. Septação gástrica com aplicação de anel de contenção, porém sem ressecção gástrica ou intestinal	17
Figura 5 -	GASTRECTOMIA VERTICAL (Sleeve). Realiza-se gastrectomia vertical, tubular, a partir de 7 cm do piloro até o ângulo de His, com ressecção da grande curvatura gástrica e preservação da pequena curvatura e da região antropilórica, sem derivação gastrointestinal	17
Figura 6 -	Técnica de KREMEN. Derivação jejunoileal sem ressecção, porém com exclusão de grande parte do intestino do trânsito alimentar	17
Figura 7 -	Técnica de GRIFFEN. Septação de 85% a 90% do estômago distal e duodeno. Derivação gastrojejunal, com alça alimentar de 190 a 250 cm de intestino delgado e exclusão do restante	18
Figura 8 -	SWITCH DUODENAL. Gastrectomia tubular vertical com gastroenteroanastomose, preservando a pequena curvatura gástrica, com alça alimentar de 190 a 250 cm e exclusão do restante do intestino delgado.....	18
Figura 9 -	Técnica de SCOPINARO. Gastrectomia distal (2/3 do órgão) com derivação biliopancreática e anastomose jejunoileal a 50 cm da válvula ileocecal.....	18
Figura 10 -	DGYR. Confecção de ampulheta gástrica de 30 a 50 mL em continuidade com o esôfago e anastomose com o jejuno em Y-de-Roux. O remanescente gástrico, duodeno e parte do jejuno proximal ficam excluídos do trânsito alimentar	18
Figura 11 -	Mecanismo de apoptose (Adaptado de Pope RM, Nature Reviews, julho de 2002)	29

Figura 12 -	Videoenteroscópio de duplo balão, FUJINON, modelo EN450P5/20.....	39
Figura 13 -	Desenho gráfico que demonstra o esquema de coleta de biópsias endoscópicas realizadas neste estudo	39
Figura 14 -	Imagens do estômago excluso obtidas por enteroscopia de duplo balão.....	40
Figura 15 -	Sistema de análise e fotomicrografias	48
Figuras 16 A e B -	Imuno-histoquímica para Ki-67 (10X), A: Imunoexpressão do Ki-67 no antro do estômago excluso demonstra índice de proliferação celular aumentado na camada basal da mucosa e proliferação celular até a superfície do epitélio; B: Imunocoloração nuclear normal na camada basal do epitélio nos casos controle (antro).....	53
Figuras 17 A e B -	Imuno-histoquímica para Caspase 3. A: Epitélio do antro gástrico excluso. Fraca coloração marrom tanto citoplasmática como nuclear pode ser detectada (20X), B: Forte imunoexpressão nuclear da Caspase 3 no antro do caso controle (20X).....	55
Figuras 18 A, B, C, e D -	Imuno-histoquímica para gastrina. A, B: Epitélio do estômago excluso apresenta pouca imunorreatividade celular para gastrina (20X, 40X). C, D: No caso controle, numerosas células positiva para gastrina podem ser observadas na mucosa do antro (20X, 40X).....	57
Figuras 19 A e B -	Imuno-histoquímica para CD3. Infiltrado inflamatório crônico no epitélio do estômago excluso apresentando inúmeras células positivas para CD3. Infiltrado inflamatório de linfócitos T para as células superficiais dos pits podem ser vistos (10X).....	58
Figuras 20 A e B -	Imuno-histoquímica para CD8. Linfócitos são positivos para CD8 na mucosa do estômago excluso (10X e 20X)	59

Lista de Tabelas

Tabela 1 -	Comparação clinicopatológica entre pacientes obesos submetidos a DGYR e obesos em pré-operatório (grupo controle).....	44
Tabela 2 -	Comparação imuno-histoquímica entre pacientes submetidos a DGYR e obesos em pré-operatório (grupo controle).....	54

Lista de Gráficos

Gráfico 1 -	Mecanismos de redução do risco geral de câncer em pacientes obesos submetidos à cirurgia bariátrica. (Adaptado de Ashrafian <i>et al.</i> , 2011)	12
Gráfico 2 -	Distribuição dos pacientes (grupo caso) de acordo com o gênero	38
Gráfico 3 -	Análise histológica.....	43
Gráfico 4 -	Porcentagem de células secretoras de gastrina em antro excluso x antro controle e gastrina relacionada à presença ou ausência de <i>H. pylori</i>	56
Gráfico 5 -	Relação entre presença de folículos linfóides e <i>H. pylori</i>	60

Resumo

Pereira Filho DS. *Avaliação de marcadores moleculares na mucosa gástrica do estômago excluído após cirurgia bariátrica* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

INTRODUÇÃO: As alterações da mucosa do estômago excluído após Derivação Gástrica em Y-de-Roux (DGYR) para tratamento da obesidade mórbida não são bem conhecidas. Atualmente, pouco se sabe a respeito das consequências da cirurgia, especialmente, considerando que tal técnica necessita de vigilância para possíveis alterações de mucosa. Adicionalmente, é possível que o refluxo duodenal biliopancreático para dentro do estômago excluído, sem tamponamento pela ingestão de alimentos, pode, após décadas, danificar a mucosa gástrica e provavelmente aumentar o risco de câncer gástrico. **OBJETIVO:** Analisar as alterações da mucosa do estômago excluído através de: índice de proliferação celular (Ki-67), apoptose (caspase 3 e Bcl-2), função hormonal (gastrina) e infiltrado inflamatório (CD3 e CD8). **MÉTODOS:** Enteroscopia de duplo balão foi realizada em 35 pacientes submetidos à DGYR com mais de 36 meses de cirurgia. Foram realizadas múltiplas biópsias no coto gástrico funcional e na mucosa do estômago excluído. Biópsias gástricas de 32 pacientes obesos não operados foram utilizadas como grupo controle. Biópsias endoscópicas foram seccionadas a partir de blocos de tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina. Amostras de 4 µm de espessura foram examinadas por imuno-histoquímica pelo método de estreptavidina-biotina-peroxidase. **RESULTADOS:** Os dois grupos foram comparados por idade, gênero, presença de gastrite, metaplasia intestinal e de *Helicobacter pylori*. O número médio de células de gastrina positivas foi de 55,5 (desvio padrão (DP) = 11,7) no grupo controle e 29,6 (DP = 7,9), nos casos, $p = 0,0003$. Índice de proliferação (Ki-67) nos casos (corpo=24,7%, antro=24,9%) foi significativamente maior em comparação com os controles (corpo=15% e antro=17,7%), $p = 0,002$ e $0,01$, respectivamente. Imunoexpressão de caspase 3 foi maior nos controles em comparação ao estômago excluído (31 x 46%), $p = 0,02$. Não houve diferença estatística entre as expressões de CD3, CD8, e Bcl-2 nos controles e nos casos. Não houve associação entre os resultados imuno-histoquímicos e a presença de *Helicobacter pylori* ou alterações histológicas. **CONCLUSÕES:** Proliferação celular está aumentada e a apoptose está diminuída na mucosa do estômago excluído em comparação com os controles obesos não operados. Alterações na renovação celular e nas secreções hormonais nestas condições podem ser relevantes em seguimento a longo prazo.

Descritores: 1.Cirurgia bariátrica 2.Obesidade mórbida 3.Enteroscopia de duplo-balão 4.Derivação gástrica 5.Antígeno Ki-67 6.Caspase 3 7.Genes bcl-2 8.Gastrinas

Abstract

Pereira Filho DS. *Evaluation of molecular markers in the excluded stomach mucosal after bariatric surgery* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2013.

INTRODUCTION: Mucosal alterations in the excluded stomach mucosal after Roux-en-Y gastric bypass for morbid obesity have not been clearly clarified. Currently, little is known regarding the long-term consequences of the surgical specially considering that the technique hinders surveillance for possible mucosal alterations. Indeed, it is possible that duodenal reflux of bile and pancreatic secretions without any buffering offered by food intake may, after decades, damage the gastric epithelium and lead to an increase gastric cancer risk. **OBJECTIVE:** This study aims to analyze the mucosal alterations (proliferative status (Ki-67), apoptosis (caspase 3 and Bcl-2), inflammatory response (CD3 and CD8) and for hormonal function (gastrin)) in the excluded stomach. **METHODS:** Double-balloon enteroscopy was performed in 35 patients who underwent Roux-en-Y gastric bypass longer than 36 months. Multiple biopsies of the proximal pouch and the excluded gastric mucosa were collected. Gastric biopsies from 32 non-operated obese patients were utilized as controls. Endoscopic biopsies were cut from tissue blocks fixed in formalin and embedded in paraffin. Sections 4 µm thick were examined for immunoexpression using the streptavidin-biotin-peroxidase method. **RESULTS:** The two groups were compared for age, gender, gastritis, intestinal metaplasia, and presence of *Helicobacter pylori*. The mean number of positive gastrin cells was 55.5 (standart deviation (SD) = 11.7) in the control group and 29.6 (SD=7.9) in the cases, $p=0.0003$. Ki-67 proliferative index in cases (body=24.7%, antrum=24.9%) was significantly higher compared to controls (body=15.0% and antrum=17.7%), $p=0.002$ and 0.01 , respectively. Caspase 3 immunoexpression was higher in the controls compared to the excluded stomach (46 vs. 31%), $p=0.02$. There was no statistical difference between CD3, CD8, and Bcl-2 immunoexpressions among the controls and cases. **CONCLUSIONS:** Cell proliferation is increased and apoptosis is downregulated in the excluded gastric mucosa compared to the non-operated obese controls. Alterations in cell turnover and in hormonal secretions in these conditions may be of important in long-term follow-up.

Descriptors: 1.Bariatric surgery 2.Morbid obesity 3.Double-balloon enteroscopy 4.Gastric bypass 5.Ki-67 antigen 6.Caspase 3 7.Genes bcl-2 8.Gastrins

1 Introdução

A obesidade mórbida é uma doença crônica, multifatorial, de prevalência crescente, que se associa ao risco de desenvolvimento de diversas doenças como hipertensão arterial sistêmica (HAS), dislipidemias, diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), esteatose hepática, colelitíase, síndrome metabólica (SM), doença do refluxo gastroesofágico, além de outras condições clínicas e psicossociais. Consome grande parte dos recursos utilizados em saúde, sendo problema extremamente relevante na atualidade (NAASO; NHLBI, 2000; Gomes *et al.*, 2006).

A alta probabilidade de fracasso a longo prazo dos tratamentos conservadores baseados na utilização de dietas, medicamentos, psicoterapias e exercícios físicos faz com que estes tipos de terapias para obesidade apresentem a ineficácia como regra, promovendo assim, perda de peso insuficiente e elevado índice de reganho de peso (NIH, 1985; Martin *et al.*, 1995; Benotti; Forse, 1995).

Considera-se um indivíduo obeso aquele com Índice de Massa Corpórea (IMC, definido como o peso em quilogramas dividido pela altura em metros ao quadrado) acima de $29,9 \text{ kg/m}^2$ e obeso mórbido quando o $\text{IMC} \geq 40 \text{ kg/m}^2$ ou $\geq 35 \text{ kg/m}^2$ na presença de comorbidades. Esse parâmetro tem boa correlação com morbidade, ainda que apresente falhas, especialmente, por não fazer distinção entre massa magra e gorda (Rothman, 2008).

A partir da década de 1980, quando as manipulações sobre o estômago tomaram a dianteira (operações restritivas gástricas, com ou sem derivação intestinal), a resposta de perda de peso continuou usualmente satisfatória sem o ônus

das sérias intercorrências tardias das técnicas puramente dissabsortivas, o que influenciou favoravelmente sua utilização (Mason, 1992). A cirurgia bariátrica mostrou-se capaz de melhorar significativamente comorbidades agravadas pela obesidade mórbida, incluindo-se diabetes, hipertensão arterial, dislipidemia e apnéia obstrutiva do sono (NIH, 1992; Mason, 1992; Wooley; Garner, 1994), mostrando-se, por outro lado, como o método de maior efetividade na manutenção da redução de peso após 10 anos de tratamento (Smith *et al.*, 1995).

Neste novo arranjo visceral, que desobedece à anatomia e fisiologia, promovida pela Derivação Gástrica em Y-de-Roux (DRGY), em que se excluem o estômago, duodeno e jejuno proximal do trânsito alimentar, estes segmentos tornam-se inacessíveis pela endoscopia convencional. Todavia, Sakai *et al.*, em 2005, por meio da enteroscopia de duplo balão, conseguiram pioneiramente acessar o estômago excluído em 83,3% dos casos submetidos a DRGY para tratamento da obesidade. No segmento gástrico excluído, demonstrou-se ainda o desenvolvimento de alterações visíveis ao exame endoscópico, nominalmente gastrite, úlcera gástrica ou jejunal, proliferação bacteriana; assim como, possíveis alterações pré-neoplásicas tais quais: metaplasia intestinal, gastrite atrófica e pólipo associadas à presença de refluxo duodenogástrico (Safatle-Ribeiro *et al.*, 2007; Kuga *et al.*, 2007; Ishida *et al.*, 2007).

Sundbom *et al.* (2002) constataram, por meio de estudo cintilográfico, a presença de refluxo duodenogástrico no estômago excluído em 36% em uma série de 22 pacientes em pós-operatório de DGYR. Estes autores demonstraram, portanto, que o estômago excluído poderia estar exposto aos efeitos deletérios da bile.

Sabe-se que o refluxo duodenogástrico é um dos fatores responsáveis pela cascata de eventos que podem acarretar dano celular e progressão para o câncer do

estômago remanescente, sobretudo, após gastrectomia parcial com reconstrução a Billroth II, realizada para tratamento de doença gástrica ou duodenal benigna, com latência mínima pós-operatória de 15 anos (Toftgaard, 1989; Safatle-Ribeiro *et al.*, 1998). Revisões de casuísticas clínicas demonstram que a probabilidade de ocorrer o câncer do coto gástrico eleva-se, sobretudo, após 15 anos da cirurgia inicial e, após os 25 ou 35 anos, atinge 5 a 8 vezes mais em comparação à população de doentes não gastrectomizados da mesma faixa etária, com prevalência que varia de 0,8% a 8,9% (La Vecchia *et al.*, 1992; Fisher *et al.*, 1993; Yamashita *et al.*, 1998; Safatle-Ribeiro *et al.*, 1998).

Em virtude de ter se tornado factível acessar o estômago excluído em pacientes obesos previamente submetidos a DGYR por meio do exame de enteroscopia de duplo balão (Sakai *et al.*, 2005; Kuga *et al.*, 2007; Safatle-Ribeiro *et al.*, 2007), pode-se avaliar a mucosa deste segmento para elucidar os efeitos da mudança promovida pela operação no trânsito gastrointestinal na mucosa do estômago excluído.

Safatle-Ribeiro *et al.* (2007) e Kuga *et al.* (2007) constataram alta prevalência de gastrite crônica, atrofia e metaplasia intestinal na mucosa do estômago excluído em uma série de 35 pacientes obesos submetidos a DGYR.

Ishida *et al.* (2007) também avaliando o estômago excluído por enteroscopia de duplo balão em pacientes obesos submetidos a DGYR, constataram supercrescimento bacteriano em 40,5% dos pacientes e produção elevada de TNF-alfa e TGF-beta; apesar de não apresentarem manifestações clínicas secundárias a tais achados.

Deste modo, o presente estudo teve como objetivo avaliar possíveis alterações moleculares da mucosa do estômago excluído de pacientes submetidos a DGYR por meio do emprego de marcadores do índice de proliferação celular (Ki-67), da apoptose (caspase 3 e Bcl-2), da função hormonal (gastrina) e da resposta inflamatória (CD3 e CD8).

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Aspectos epidemiológicos da obesidade

A incidência da obesidade está aumentando em todo o mundo. Os Estados Unidos da América (EUA), por intermédio de seus Centros de Controle e Prevenção de Doenças Crônicas, mostram aumento constante e apreciável da obesidade entre 1985 e 2008 (CDC, 2010; WHO, 2011). Mais de 33% dos adultos são obesos (cerca de 72 milhões de pessoas) e, aproximadamente 64% dos americanos apresentam sobrepeso (Balsiger *et al.*, 2000; Flegal *et al.*, 2002). Os custos econômicos do tratamento da obesidade e suas complicações são surpreendentes, correspondendo a quase 100 bilhões de dólares por ano nos EUA. Naquele país, os custos gerados por esta moléstia alcançam a segunda colocação nos desembolsos globais de saúde, perdendo somente para as enfermidades ligadas ao tabagismo (Colditz, 1992; Balsiger *et al.*, 2000; Ludwig; Pollack, 2009; CDC, 2010).

Em 2010, o Ministério da Saúde e o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) divulgaram grande levantamento dos números do excesso de peso e obesidade no Brasil: o VIGITEL Brasil 2009 - Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL, 2009). Foi encontrado excesso de peso em 46,6%, sendo maior entre homens (51,0%) que entre mulheres (42,3%). Em ambos os gêneros, a frequência desta condição tende a aumentar com a idade. O aumento da incidência é maior entre as faixas etárias de 18 a 24 anos e, de 35 a 44 anos para homens; e entre as faixas etárias de 18 a 24 anos e de 45 e 54 anos para as mulheres, quando se observa que a frequência do excesso de peso é quase que duplicada. Entre as mulheres, a relação entre excesso de peso e

escolaridade é inversa: 50% no grupo de menor escolaridade e 31,1% no grupo de maior escolaridade. Nenhuma relação foi, contudo, observada entre excesso de peso e escolaridade no gênero masculino. A incidência de adultos obesos, em ambos os gêneros, variou de 12,7% para 13,9% no período de 2007 e 2009, respectivamente. No gênero masculino, a incidência quase triplica dos 18-24 aos 55-64 anos de idade, caindo entre aqueles com 65 anos ou mais de idade. Entre as mulheres, a incidência da obesidade mais do que triplica entre 18 a 24 e 55 a 64 anos, declinando ligeiramente entre aquelas com 65 anos ou mais de idade. Comparando estes números com os obtidos na VIGITEL 2007, houve aumento na prevalência de excesso de peso na população de 43,4% para 46,6%, respectivamente. A maior variação foi verificada entre mulheres: 37,8% e 42,3% em 2007 e 2009, respectivamente. No gênero masculino, por sua vez, houve maior prevalência de excesso de peso quando comparado ao gênero feminino, tanto em 2007 (49,2%) como em 2009 (51%) (VIGETEL, 2007; VIGETEL, 2009).

Ademais, não se esgotam os malefícios dos grandes excessos de peso. É próprio da obesidade, atrair série de transtornos familiares, profissionais, sociais, econômicos e psicológicos, capazes de gerarem desequilíbrios emocionais e interferirem na qualidade e diminuição da expectativa de vida (Stunkard; Wadden, 1992; Martin, 1999; Peeters *et al.*, 2003; Frezza *et al.*, 2006).

2.2 Obesidade e câncer

O câncer resulta do conjunto de lesões gênicas, adquiridas ou não, que somadas determinam modificações fenotípicas cuja evolução contribui para o desenvolvimento das formas clínicas da doença. Durante a progressão da doença, os tumores adquirem propriedades biológicas que afetam a evolução e o prognóstico dos pacientes. Neste contexto, participam os genes supressores de tumor, responsáveis pelo controle negativo da proliferação celular, além dos oncogenes, fatores de crescimento e seus receptores, que são importantes na progressão para o câncer (Tahara, 1990; Stermmermann *et al.*, 1994).

A associação epidemiológica entre índice de obesidade e índice de câncer vem aumentando. Conforme a Organização Mundial de Saúde (OMS), a incidência de obesidade aumenta cerca de 30 milhões de casos novos por ano, enquanto que o número total de casos de câncer tem acréscimo de 300.000 por ano (WHO, 2011). Há evidência de que a obesidade é considerada condição pré-neoplásica para diversos tumores (Smith *et al.*, 1995; Forsell; Hellers, 1997; Baltasar *et al.*, 1998; Calle; Kaaks, 2004).

No Reino Unido, estudo realizado por Reeves *et al.* (2007), com mais de um milhão de mulheres acompanhadas por mais de 5 anos, revelou significativa associação entre aumento de peso e risco de câncer, particularmente, no grupo pós-menopausa.

Várias metanálises e revisões sistemáticas confirmaram a consistente associação entre o índice de massa corpórea (IMC), mortalidade e diversos casos de câncer em homens e mulheres. Isto inclui neoplasia maligna do esôfago, pâncreas,

figado, vesícula biliar, colorretal, mama, ovário, próstata, rim, sistema imunológico (leucemia, linfoma, mieloma) e pele (melanoma) (Renehan *et al.*, 2008; Whitlock *et al.*, 2009). Estudo multicêntrico e prospectivo, após análise de mais de 900.000 adultos sobre a relação entre IMC e causas específicas de mortalidade, confirma que a mortalidade foi menor para aqueles com IMC dentro da faixa normal (22,5-25 Kg/m²) em ambos os gêneros. A cada aumento de 5 Kg/m² é esperado um aumento de 30 % em todas as causas de mortalidade e um aumento de 10 % na mortalidade para câncer (Sjostrom *et al.*, 2009).

Além do elevado risco de desenvolvimento de câncer gástrico em razão da alta prevalência da infecção pelo *H. pylori* (Erim *et al.*, 2008), pacientes obesos podem ter maior risco de desenvolver adenocarcinoma do esôfago e estômago, quando o IMC é maior que 35 kg/m² em comparação àqueles com IMC entre 18,5 e 25 kg/m² (Kubo; Corley, 2006; Yang P *et al.*, 2009).

Estudos longitudinais sobre as cirurgias bariátricas revelou que o sucesso da perda de peso também resultou na diminuição do índice de câncer (Adams *et al.*, 2007; Adams *et al.*, 2009; Sjostrom *et al.*, 2009). Pacientes obesos mórbidos submetidos à cirurgia bariátrica possuem menor índice de câncer e menor mortalidade por câncer em comparação aos obesos mórbidos não operados.

Christou *et al.* (2004) estudaram retrospectivamente 6.781 obesos mórbidos submetidos à cirurgia bariátrica entre 1986 e 2002, no qual se pode observar uma redução de 76% na incidência geral de câncer.

Tal redução pode ser explicada por vários mecanismos protetores da cirurgia bariátrica que interrompem uma série de vias metabólicas que associam obesidade

com geração e crescimento tumoral, sendo elas: 1) alteração do fluxo biliar, 2) redução do tamanho da câmara gástrica, 3) rearranjo anatômico intestinal e fluxo alterado de nutrientes, 4) manipulação vagal e 5) modulação dos hormônios entéricos, conforme os dados do Gráfico 1 (Ashrafiian *et al.*, 2011).

Gráfico 1 - Mecanismos de redução do risco geral de câncer em pacientes obesos submetidos à cirurgia bariátrica. (Adaptado de Ashrafiian *et al.*, 2011)

Entretanto, embora várias técnicas cirúrgicas bariátricas propiciem a perda de peso, algumas delas favorecem o refluxo biliopancreático do duodeno para o estômago excluído, que se mantém fora do trânsito alimentar, como na técnica da DGYR. A ausência de passagem alimentar sem o tamponamento adequado da

secreção alcalina, poderia desencadear uma sequência de eventos agressores à própria mucosa gástrica.

Ademais, Sundbom *et al.* (2002) evidenciaram, por meio de exame cintilográfico, importante refluxo duodenogástrico para o estômago excluído em 36% dos 22 pacientes operados com mais de 18 meses de DGYR. Tal fato foi claramente demonstrado em pacientes submetidos a DGYR com alça curta, onde se evidenciou no estômago excluído: lago biliar em 53% dos casos, gastrite crônica em 21% e metaplasia intestinal em 9% (Flickinger *et al.*, 1985).

Através de metanálise, onde se incluiu 3.097.794 obesos não operados, encontrou-se 9.492 casos de câncer gástrico. Estima-se então que a incidência de câncer gástrico em pacientes obesos não submetidos a quaisquer procedimentos bariátricos seja de 306/100.000; portanto, maior que a incidência estimada para pacientes submetidos a qualquer cirurgia bariátrica (24/100.000). Todavia, a incidência de câncer gástrico para pacientes obesos operados permanece ainda maior que a incidência global para câncer gástrico (7,8/100.000) (Yang *et al.*, 2009).

Mesmo com poucos relatos sobre neoplasia tardia após a DRGY; ainda assim, tumores gástricos malignos foram descritos de 5 até 22 anos, após a intervenção cirúrgica inicial (Sundbom *et al.*, 2001). Corresponde a vinte e um casos de neoplasia em pacientes obesos submetidos a DGYR, sendo 47,6% localizados no coto gástrico funcional (Papakonstantinou *et al.*, 2002; Zirak *et al.*, 2002; Jain *et al.*, 2003; Hackert *et al.*, 2004; Trincado *et al.*, 2005; Babor; Booth., 2006; Chebib *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2008; Stroh *et al.*, 2008), 38,1% no estômago excluído (Raijman *et al.*, 1991; Lord *et al.*, 1997; Khitin *et al.*, 2003; Escalona *et al.*, 2005; De Roover *et al.*, 2006; Corsini *et al.*, 2006; Harper *et al.*, 2007; Watkins *et*

al., 2007) e 14,3% na junção esofagogástrica (Hallen *et al.*, 2004; Kuruba *et al.*, 2009).

2.3 Técnicas endoscópicas e cirúrgicas para o tratamento da obesidade

Abordagens terapêuticas para perda de peso podem ser dietética, comportamental, farmacológica, endoscópica ou cirúrgica.

Os grandes dilemas da terapêutica convencional, não cirúrgica, da obesidade prendem-se à baixa eficácia das medidas farmacológicas disponíveis até o momento, e, sobretudo, ao fracasso a longo prazo, da vasta maioria dos regimes dietéticos. As intervenções comportamentais têm o potencial de ter custo menor, com menos efeitos colaterais negativos que as abordagens farmacológicas, endoscópicas ou cirúrgicas.

As abordagens medicamentosas para perda de peso têm demonstrado taxas de abandono de até 50% e alto índice de reganho de peso (Wooley; Garner, 1994; Garrido, 1998; Brolin, 2000; Pi-Sunyer *et al.*, 2006; Mann *et al.*, 2007).

Neste contexto, desde 1992, o Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América (NIH, 1992) reconhece como melhor opção para manejo da obesidade mórbida a prática de operações restritivas e derivativas gastrointestinais, por ser efetiva e duradoura no controle do peso e das doenças associadas à obesidade, sendo este seu objetivo principal. Na realidade, tais procedimentos são

bastante antigos e, por muitas décadas, diversos grupos vinham acumulando experiência com casuísticas de pacientes refratários a outras abordagens terapêuticas.

No Brasil, alguns serviços de cirurgia metabólica, buscaram pioneiramente introduzir e aprimorar técnicas operatórias, esquemas de monitorização e protocolos multidisciplinares para abordagem integrada clínico-cirúrgica deste grande mal (Garrido, 1998; Faintuch; Garrido, 2002; Faintuch *et al.*, 2002 a, b, c; Gil *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2002; Chaves *et al.*, 2002).

O progresso técnico e a aceitação pela classe médica foram em parte retardados pela ênfase inicial em se executar derivações radicais sobre o intestino delgado, que eram eficientes, porém sujeitas a graves complicações tardias, sobretudo metabólicas, hepáticas e renais (Mason, 1992; Faintuch *et al.*, 2004). De fato, apesar dos riscos, o tratamento cirúrgico para perda de peso tem menor incidência de mortalidade que a obesidade não tratada ao longo do tempo.

Métodos endoscópicos alternativos para tratamento da obesidade também têm sido realizados (Figuras 1 e 2) e podem ser empregados, especialmente, em fase pré-operatória para redução de peso nos obesos mórbidos com intenção de diminuir os riscos anestésicos (Weiner *et al.*, 1999; Sallet *et al.*, 2004; De Moura *et al.*, 2012).

Figura 1 – BALÃO INTRAGÁSTRICO. Colocado por endoscopia, preenche grande parte do estômago, desencadeando aumento da saciedade

Figura 2 - ENDOBARRIER. Manta plástica inserida no duodeno por endoscopia convencional, recobrando o duodeno e o jejuno proximal por aproximadamente 60 cm

As técnicas cirúrgicas foram concebidas para promover a perda de peso por meio de dois mecanismos diferentes: as puramente restritivas pela utilização de Banda Gástrica Ajustável (LABG) (Figura 3) ou com a redução do tamanho do reservatório gástrico (ex. Técnica de Mason e técnica de Sleeve) (Figuras 4 e 5, respectivamente), e as disabsortivas com redução na absorção intestinal dos alimentos (ex. Técnica de Kremen) (Figura 6). Existem também as mistas que combinam a restrição com algum grau de disabsorção, tais quais: cirurgia de Griffen, *Switch* Duodenal, técnica de Scopinaro e DGYR (Figuras 7, 8, 9 e 10, respectivamente) (Scopinaro *et al.*, 1998; De Maria, 2007; Pournaras; Le Roux, 2009).

Figura 3 – BANDA GÁSTRICA AJUSTÁVEL. Aplicação de banda ajustável próximo ao cárdia, criando ampulheta de 20 a 30 mL ligada ao restante do estômago. Não há ressecção

Figura 4 – Técnica de MASON. Septação gástrica com aplicação de anel de contenção, porém sem ressecção gástrica ou intestinal

Figura 5 – GASTRECTOMIA VERTICAL (Sleeve). Realiza-se gastrectomia vertical, tubular, a partir de 7 cm do piloro até o ângulo de His, com ressecção da grande curvatura gástrica e preservação da pequena curvatura e da região antropilórica, sem derivação gastrointestinal

Figura 6 – Técnica de KREMEN. Derivação jejunoileal sem ressecção, porém com exclusão de grande parte do intestino do trânsito alimentar

Figura 7 – Técnica de GRIFFEN. Septação de 85% a 90% do estômago distal e duodeno. Derivação gastrojejunal, com alça alimentar de 190 a 250 cm de intestino delgado e exclusão do restante

Figura 8 – *SWITCH* DUODENAL. Gastrectomia tubular vertical com gastroenteroanastomose, preservando a pequena curvatura gástrica, com alça alimentar de 190 a 250 cm e exclusão do restante do intestino delgado

Figura 9 – Técnica de SCOPINARO. Gastrectomia distal (2/3 do órgão) com derivação biliopancreática e anastomose jejunoileal a 50 cm da válvula ileocecal

Figura 10 – DGYR. Confecção de ampulheta gástrica de 30 a 50 mL em continuidade com o esôfago e anastomose com o jejuno em Y-de-Roux. O remanescente gástrico, duodeno e parte do jejuno proximal ficam excluídos do trânsito alimentar

A DRGY é a técnica cirúrgica mais comumente realizada em todo o mundo, correspondendo a quase 70% das operações bariátricas realizadas. É também conhecida como técnica de Fobi-Capella ou Septação Gástrica ou *Bypass* Gástrico (Figura 10).

Historicamente, em 1986, Dr. Fobi introduziu uma variação da técnica de Mason e Ito, na qual o estômago não era removido a partir do corpo, dividindo-o em duas partes separadas, uma de 100 mL, chamado coto gástrico funcional, contido por anel de silicone, e outra de 1.500 mL chamada de estômago exclusivo. Esta modificação técnica trouxe duas vantagens: cirurgia realizada em curto período de tempo, o que seria importante para reduzir as complicações cardiopulmonares já agravadas pela obesidade, e, ao mesmo tempo, evitando as complicações da gastrectomia.

Em 1991, Dr. Rafael Capella sugeriu que o tamanho do coto funcional devesse ser diminuído de 100 para 20 mL, e protegido por justaposição do intestino delgado para evitar fístulas. Permutou o anel de silicone por tira de tela de polipropileno, que foi chamada de Técnica Fobi-Capella (Capella *et al.*, 1991).

Este procedimento cria uma pequena câmara gástrica proximal com exclusão de grande parte do estômago, de todo o duodeno e de parte do jejuno proximal do trânsito alimentar. O jejuno é dividido cerca de 50 centímetros distal ao ângulo de Treitz, sendo então realizada anastomose entre a alça de jejuno distal e o pequeno reservatório gástrico. E por fim, uma jejunojejunostomia realizada a cerca de um metro distal da gastrojejunostomia (Capella *et al.*, 1991).

Esta técnica cirúrgica fornece mecanismo de ação dupla para a perda de peso: redução gástrica e nutrição ileal. Inicialmente, o paciente passa a ingerir menor quantidade de alimentos com saciedade precoce e, posteriormente, este alimento passa a chegar mais precocemente ao segmento terminal do intestino delgado, estimulando a secreção de alguns hormônios que ativam o centro da saciedade do cérebro e também melhoram a produção de insulina pelo pâncreas. Ou seja, o alimento somente entrará em contato com as secreções biliopancreáticas distalmente à anastomose. E tal encurtamento do segmento alimentar propicia menor absorção e, consequentemente, melhores resultados.

Em 1994, Wittgrove e Clark realizaram a primeira DGYR videolaparoscópica, sem a utilização do anel de silicone ou a tira de polipropileno. Até agora, a DGYR videolaparoscópica é conhecida como o "Padrão Ouro" no tratamento da obesidade mórbida.

2.4 Acessibilidade ao estômago excluído após derivação gástrica em Y-de-Roux (DGYR)

O acesso ao estômago excluído é um desafio na população de pacientes que foram submetidos à cirurgia de DGYR, uma vez que é difícil alcançá-lo por meio de endoscopia convencional ou exames radiológicos.

Exame endoscópico pelo acesso percutâneo com broncoscópio foi primeiramente relatado em 1998 (Fobi *et al.*, 1998).

Desde então, apenas alguns relatos de casos vêm sendo publicados, utilizando endoscopia percutânea para avaliar a presença de lesão no estômago excluso (Shahriari *et al.*, 2000). Novas técnicas não invasivas, como a cintilografia (Sundbom, 2002) e a endoscopia virtual foram avaliadas para exame de estômago excluso em uma série (Silecchia *et al.*, 2002).

Em 2005, Sakai *et al.*, pioneiramente, acessaram o estômago excluso com êxito em cinco dos seis casos (83,3%), após cirurgia de DGYR para a obesidade mórbida, utilizando um enteroscópio de duplo balão (EDB). O EDB foi introduzido por via oral, progredindo até a alça biliopancreática e estômago excluso, através da anastomose jejunojejunal, em que se observou mucosa gástrica com aspecto endoscópico de gastrite atrófica em três pacientes, sendo leve em dois casos e intensa em outro, além de metaplasia intestinal. Gastrite erosiva e hemorrágica foi encontrada em dois pacientes.

Kuga *et al.* (2007) encontraram gastrite enatematosa (28,6 %), erosiva (14,3 %) e atrófica (17,1 %) por meio de EDB. Após análise histológica, observou-se 100% de gastrite no estômago excluso. Pangastrite representou 94,3 %, sendo 65,7% do tipo leve e 34,3%, moderada. Gastrite atrófica histológica foi observada em 14,3% dos pacientes e metaplasia intestinal em 11,4%.

Biópsias obtidas por intermédio da EDB revelaram que a mucosa do estômago excluso pode ser atrófica e colonizada pelo *H. pylori*, ambos fatores de risco para câncer gástrico (Safatle-Ribeiro *et al.*, 2007).

Ishida *et al.* (2007) demonstraram também associação positiva entre os níveis de citocinas e invasão microbiana pelo *H. pylori* e outros germes inespecíficos. Além

disso, observaram-se hiperexpressão do Fator de Necrose Tumoral *Alfa* (TNF- α) e do Fator de Transformação do Crescimento *Beta* (TGF- β) no estômago excluso (Ishida *et al.*, 2007).

2.5 Imuno-histoquímica (IHQ)

A IHQ revolucionou a histopatologia por ser capaz de demonstrar exatamente onde uma dada proteína ou molécula está localizada dentro do tecido examinado (O'Malley; Pinder, 2006).

Refere-se ao processo de detecção de antígenos (por exemplo, proteínas) em células de uma fração de tecido, explorando o princípio dos anticorpos ligarem-se, especificamente, a antígenos em tecidos biológicos (Ramos-Vara, 2005). Ou seja, baseia-se na conjugação de distintos marcadores com moléculas de imunoglobulina, que com auxílio de um substrato específico localiza o antígeno tecidual.

Na virada dos anos de 1980-1990, a IHQ ganhou ampla aplicação na patologia cirúrgica e uma série de desenvolvimentos técnicos criou sistemas de detecção mais sensíveis. A técnica de hibridização facilitou o desenvolvimento da IHQ com a manufatura de anticorpos monoclonais altamente específicos, idênticos e em abundância. Inicialmente, os cortes congelados deram lugar aos materiais processados na rotina (fixação em formalina e embebição em parafina). A busca por um fixador ideal (preservação antigênica) foi abandonada, preservando-se praticidade, custo, eficácia para todos marcadores e preservação da morfologia.

A visualização de interação anticorpo-antígeno pode ser realizada de várias maneiras. No caso mais comum, um anticorpo é conjugado com uma enzima, tal como a peroxidase, que pode catalisar uma reação produtora de cor. A reação antígeno-anticorpo (Ag-Ac) revelada por marcador visual poderá ser examinada à microscopia óptica e/ou eletrônica (Bodey, 2002).

Os anticorpos usados na IHQ para detecção específica podem ser policlonais ou monoclonais. Os policlonais são misturas heterogêneas de anticorpos que reconhecem vários epítopes. Já os monoclonais apresentam especificidade para um único epítopo e são considerados mais específicos para antígeno alvo do que anticorpos policlonais (Bodey, 2002).

O advento da recuperação antigênica e o desenvolvimento de anticorpos monoclonais propiciaram enorme fonte de reagentes altamente específicos para a demonstração de vários antígenos tissulares ou celulares. Ambos foram fatos marcantes na evolução da IHQ (Bodey, 2002).

As reações de IHQ são amplamente empregadas e podem ser utilizadas nas mais diferentes situações dentro de um laboratório de patologia cirúrgico, sendo as mais importantes: 1) elucidação de histogênese de tumores anaplásicos; 2) determinação do órgão de origem de uma neoplasia diferenciada; 3) subtipagem de linfomas; 4) pesquisa de fatores prognósticos, terapêuticos e índices proliferativos de neoplasias; 5) identificação de estruturas, organismos e materiais secretados pelas células; e 6) detecção de células neoplásicas metastáticas, entre outras (Leong; Wright, 1987; Jaffer; Bleiweiss, 2004).

2.5.1 Ki-67

Pelo menos, existem quatro fases distintas no ciclo celular: o período antes da síntese de DNA (G1), a fase de síntese de DNA (S), o período após a replicação do DNA (G2) e a fase mitótica (M), que culmina na divisão celular (Macluskey *et al.*, 2000). As células fora do ciclo celular estão na chamada fase G0 e podem permanecer nesta fase por tempo indeterminado (Macluskey *et al.*, 2000; Munshi *et al.*, 2002). A expressão antigênica aumenta com a progressão do ciclo celular, alcançando pico nas fases G2 e M (Ravi *et al.*, 2001; Iamaroon *et al.*, 2004). O mesmo resultado pode ser encontrado tanto em linhagem de células normais como neoplásicas (Ravi *et al.*, 2001; Iamaroon *et al.*, 2004).

O anticorpo monoclonal Ki-67 corresponde à proteína nuclear humana que se expressa nas fases ativas do ciclo celular, sendo usado como marcador de proliferação celular (isto é, células nas fases G1, S, G2 e M), mas não nas células na fase G0, em razão dos processos de fosforilação.

O emprego do Ki-67 é restrito a tecido fresco, já que o epítipo não sobrevive à fixação histológica de rotina em formaldeído. MIB-1 corresponde à equivalente do anti-Ki-67 que pode ser aplicado em tecidos fixados em formalina e em tecidos rotineiramente processados e irradiados em micro-ondas (Cattoretti *et al.*, 1992).

A utilização do Ki-67, como marcador biológico nas técnicas imuno-histoquímicas, permitindo a avaliação do índice de proliferação celular em neoplasias malignas, vem sendo preconizada como importante caminho de investigação do comportamento biológico das neoplasias, tendo como consequências as contribuições para o estabelecimento do diagnóstico, do prognóstico e

desenvolvimento de novos protocolos terapêuticos. Os resultados sugerem que a expressão de Ki-67 está relacionada ao índice mitótico e, conseqüentemente, à proliferação celular e à diferenciação da neoplasia (Ravi *et al.*, 2001; Iamaroon *et al.*, 2004).

2.5.2 Apoptose

O termo apoptose surgiu na literatura médica por volta da década de 1970. A noção de que a morte fazia parte do programa de desenvolvimento da célula foi reconhecida e descrita por Glücksmann, ainda, em 1951. Seguiram-se vários trabalhos experimentais até o termo “morte celular programada” ser introduzido por Lockshin e Beaulaton, em 1974. A justificativa para o termo apoptose é a consideração de que a célula entra nessa fase sob uma série de mudanças estruturais, na ausência do fenômeno necrótico, sem alterações inflamatórias. Esse fenômeno também pode ser observado em grande quantidade de situações fisiológicas, como a atividade dos linfócitos T-*killer*, a seleção negativa do sistema imune, a atrofia induzida por estímulos fisiológicos endócrinos essenciais, o *turnover* celular de muitos tecidos tumorais e em tecidos normais, após exposição apropriada a doses baixas de radiação ionizante, quimioterapia e hipóxia. Difere da necrose, na qual ocorre a morte celular, como consequência de alterações extremas em seu microambiente (Wyllie, 1997).

As alterações estruturais que levam ao processo de apoptose são determinadas por várias interações moleculares, também chamadas de eventos efetores terminais (Wyllie, 1997). A maioria, senão todas as células vivas, contém as

moléculas que participam desses eventos, porém precisam ser ativadas. O processo de morte é o resultado da interação entre os estímulos iniciais, que podem ser fisiológicos ou produto de agressão em partes da célula e fatores que determinam a susceptibilidade celular à ativação dos eventos efetores terminais.

A apoptose pode ser ativada por vários fatores como a remoção de sinais químicos da célula (fatores de crescimento ou de sobrevivência), o ignorar de mensagens químicas por alguns receptores internos e externos, ou pela presença de sinais com informação contraditória. Pode ocorrer, como sinal apoptótico externo, a ativação de receptores da superfície celular, como FAS-receptor. O FAS-ligante se liga ao FAS-receptor da membrana - chamados *death receptors*, clivam o APAF (fator de ativação de proteases apoptóticas), iniciando a cascata de caspases. Existe vínculo entre a ação de uma caspase e a clivagem do DNA; sendo várias proteínas apontadas como alvos das caspases (Figura 11).

Caspases são um grupo de proteases com importância fundamental no processo de apoptose. Encontram-se no citoplasma celular sob a forma inativa. Existem dois tipos de caspases: caspases iniciadoras e caspases efetoras. Caspases iniciadoras (por exemplo caspase 8, caspase 9) clivam pró-formas inativas de caspases efetoras, ativando-as. Caspases efetoras (por exemplo: caspase 3, caspase 7) por sua vez, clivam outras proteínas da célula resultando no processo apoptótico.

A caspase efetora, já ativada, cliva uma proteína (ICAD, *inhibitor of caspase-activated DNase*) normalmente ligada a uma DNAase (CAD) no citoplasma. CAD se torna ativo, entra no núcleo e começa a clivar pontos específicos de DNA (clivagem entre nucleossomos), desencadeando o processo de morte celular programada (Figura 11).

A regulação da apoptose é um dos alvos atrativos para a intervenção terapêutica em algumas doenças consideradas previamente incuráveis, como a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) e o câncer, em especial, no controle das lesões gástricas pré-malignas e malignas. No caso das neoplasias, a indução da apoptose pode atuar no controle da progressão tumoral e de metástases, fato que compreende o mecanismo principal de regressão tumoral induzida por quimioterapia (Parton *et al.*, 2002). As terapias recentes são baseadas na utilização de drogas que atuam nas vias pró-apoptóticas, como ativação das caspases e restauração da função da proteína p53 ou via pró-sobrevivência, como regulação da família de genes *bcl-2* (Itoh *et al.*, 2000; Senderowicz, 2004). Por exemplo, a expressão dessas proteínas e a atividade anti-apoptótica podem ser inibidas com tecnologia *antissense* ou por antagonistas naturais, como Bax, ou ainda, por drogas que se ligam nos sítios ativos dessas proteínas (Parton *et al.*, 2002; Ghobrial *et al.*, 2005). Uma das tentativas para o tratamento do câncer com a terapia *antissense* consiste no bloqueio dos membros da família de proteínas inibidoras da apoptose (cIAP1, cIAP2, NAIP e survivinas), que constituem um grupo de supressores apoptóticos ligados ao cromossomo X, responsáveis pela inibição do processamento das caspases, assim conferindo proteção às células contra agentes anticâncer e a outros estímulos apoptóticos (Stahel; Zangemeister-Wittke, 2003).

Ademais, o entendimento mais completo dos mecanismos moleculares do *H. pylori* nos processos de proliferação celular e apoptose poderia trazer informações importantes para o controle da transformação maligna do epitélio gástrico (Ashktorab *et al.*, 2008).

Várias proteínas participam do processo de apoptose, incluindo: caspase 3 que age como iniciador e executor; Bcl-2, Bax, entre outras (Li *et al.*, 2004).

A família *bcl-2* é uma família de proteínas indutoras e repressoras de morte por apoptose que participa ativamente da regulação desse processo. A primeira anormalidade do gene produtor dessa família de proteínas foi descrita em um linfoma não-Hodgkin, folicular, de linfócitos B, identificada na translocação dos cromossomos t (14;18), porém a expressão da proteína codificada pelo gene *bcl-2* não requer a presença da translocação t (14;18). Essa troca leva à justaposição do gene *bcl-2* (habitualmente, encontrado no cromossomo 18), ao gene da cadeia pesada da imunoglobulina do cromossomo 14, resultando em altos níveis de expressão das proteínas (Parolin; Reason, 2001).

Os membros da família *bcl*, como *bcl-2* e *bcl-XL*, inibem a apoptose, pois previnem a liberação de citocromo C e são chamados de reguladores antiapoptóticos. Existem também membros dessa família que são pró-apoptóticos: *bax*, *bad*, *bak* e *bok*, entre outros. A expressão de Bcl-2 é capaz de inibir a geração de espécies reativas do oxigênio e a acidificação intracelular, bem como estabilizar o potencial de membrana da mitocôndria. A homeostasia é mantida pelo controle da quantidade de proteínas antiapoptóticas e pró-apoptóticas (Grivicich *et al.*, 2007). Estímulos, como dano ao DNA, levam ao aumento na expressão das proteínas pró-apoptóticas que agem na mitocôndria resultando na liberação para o citosol do citocromo C, presente no espaço existente entre a membrana mitocondrial externa e interna. No citosol, o citocromo C forma um complexo com o fator ativador da apoptose 1 (APAF-1), levando à ativação da caspase 9, que ativa caspases efetoras. Já os membros antiapoptóticos, como *bcl-2*, após estímulo de morte, inibem a

permeabilização da membrana externa da mitocôndria, pelo sequestro de *bax* (pró-apoptótica) ou por competir por sítios que seriam ocupados pela *bax* na membrana externa mitocondrial (Figura 11) (Parolin; Reason, 2001).

Figura 11 – Mecanismo de Apoptose (Adaptado de Pope RM, Nature Reviews, julho de 2002)

A constatação do aumento na expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2, conforme a progressão do tumor resulta em crescente tendência à sobrevivência celular, haja vista acreditar-se que essa diminuição gradual do estímulo antiapoptótico, associada ao estímulo proliferativo, resulte na produção cada vez maior de células anaplásicas e contribua para a perpetuação do fenótipo maligno (Faria *et al.*, 2006).

Clarke *et al.* demonstraram hiperexpressão de Bcl-2 na mucosa do coto gástrico de pacientes submetidos à gastrectomia parcial com reconstrução a Billroth II, mais freqüente naqueles com metaplasia intestinal incompleta (Clarke *et al.*, 1997).

2.5.3 Gastrina

Gastrina é o principal hormônio regulador da secreção ácida gástrica. No início do século XX, sua descoberta baseou-se em seu efeito profundo sobre a produção da secreção de ácido após a refeição, tornando-o um dos primeiros hormônios a serem descritos. O estudo da gastrina com isolamento e caracterização do peptídeo, em 1964, demonstrou sua ação em promover o crescimento do antro gástrico, tendo efeito proliferativo, o que tem suscitado possível influência na gênese do câncer (Gregory; Tracy, 1964; Joshi; Gardner, 1996). A clonagem e a caracterização do receptor de gastrina, em 1992, forneceram uma ferramenta valiosa no estudo dos hormônios gastrointestinais (Kopin *et al.*, 1992).

O antro é fonte rica de gastrina, porém esta tem sido encontrada em outras partes do trato gastrointestinal, especialmente, na porção proximal do intestino delgado (Korman *et al.*, 1972). A concentração intestinal de gastrina parece ser mais

alta nas porções proximais do duodeno, diminuindo rapidamente na direção distal (Brodin; Nilsson, 1982). Hiperplasia das células G é encontrada em pacientes hipoclorídricos com atrofia da mucosa gástrica (Korman *et al.*, 1972).

A liberação da gastrina é estimulada pela presença de peptídios e aminoácidos no antropilórico, pelo estiramento físico do estômago, assim como pela ação do nervo vago. A secreção da gastrina é inibida por baixo valor de pH (acidez gástrica) e pelos peptídios gastrointestinais GIP, CCK, somatostatina, secretina e VIP (Smith, 1988). A somatostatina, além de inibir diretamente a secreção de gastrina pelas células G, também inibe a inervação vagal, responsável pela estimulação das células G e inibição das células D produtoras de somatostatina (Swenson; Reec, 1996). Os receptores que mediam as respostas da gastrina causadas por alterações no conteúdo gástrico localizam-se, provavelmente, nas microvilosidades que a célula G apresenta em seu polo apical, em contato com o lúmen estomacal (Ganong, 1998).

2.5.4 Inflamação

É relevante determinar a ocorrência de inflamação crônica no estômago excluso, sobretudo se houver a presença de infecção pelo *H. pylori* (Kodaira *et al.*, 2002).

Os linfócitos T participam ativamente da resposta inflamatória na mucosa gástrica. Podem ser divididos em: linfócitos que participam da linhagem T auxiliares, pois, interagem com as células B, auxiliando-as na divisão, diferenciação celular e na produção de anticorpos e também interagem com os fagócitos mononucleares; e os

linfócitos T citotóxicos, que destroem células do hospedeiro, que se tornaram infectadas por vírus ou outros patógenos intracelulares (Hatz *et al.*, 1996).

Os linfócitos expressam um grande número de marcadores em suas membranas, que podem ser usados para distinguir várias subpopulações celulares. Pode-se utilizar anticorpos monoclonais contra estas moléculas, como por exemplo, o grupo CD (grupo de diferenciação), assim como o receptor de antígeno de células T (TCR) que pode ser dividido em TCR-1 e TCR-2 (Hatz *et al.*, 1996). O CD3 é um marcador geral de células T.

As células T TCR-2 podem ser subdivididas em duas populações não sobrepostas: células com marcador CD4, que tem principalmente a função de auxiliar (Th) e a subpopulação de células CD8 que são predominantemente citotóxicas (Tc). As células T TCR-1 são relativamente abundantes nas superfícies mucosas e epidermais e também expressam o marcador CD8 (Hatz *et al.*, 1996).

As células Th1 realizam várias funções associadas com reações de citotoxicidade e inflamação local; que são importantes no combate aos patógenos intracelulares, como: vírus, algumas bactérias e parasitas. As células Th2 são mais eficientes na indução da proliferação e produção de anticorpos pelas células B e atuam na proteção contra os organismos de vida livre. O clone Th1 secreta, preferencialmente, IL-2 e IFN-gama, e o grupo Th2 produz IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 (Ichihara *et al.*, 2003).

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Analisar as alterações moleculares da mucosa no estômago excluso e no coto gástrico funcional, após Derivação Gástrica em Y-de-Roux para tratamento da obesidade, comparados a indivíduos obesos não operados, utilizando-se marcadores imuno-histoquímicos para:

- Ki-67: índice de proliferação;
- Caspase 3 e Bcl-2: apoptose;
- Gastrina: função hormonal; e
- CD3 e CD8: infiltração inflamatória.

3.2 Objetivo Específico

Verificar a associação dos dados imuno-histoquímicos com alterações histológicas da mucosa do estômago excluso, e presença de *H. pylori*.

4 Material e Método

Estudo transversal prospectivo observacional realizado no Serviço de Endoscopia e Laboratório de Patologia do Hospital das Clínicas/FMUSP e Laboratório LIM-50 da Faculdade de Medicina da USP (Professor Venâncio Avancini Ferreira Alves e Professor Carlos Eduardo Pereira Corbett), aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) sob o número 0864/04 da CAPPesq.

4.1 Casuística

A população constituiu-se de 35 pacientes consecutivos, de ambos os gêneros e não selecionados, cuja idade variou entre 18 e 65 anos ($44,5 \pm 9,9$ anos), sendo que 85,7% (30) eram mulheres (Gráfico 2), submetidos a tratamento cirúrgico de obesidade mórbida por meio de DGYR na Divisão Cirúrgica II, Cirurgia do Aparelho Digestivo, no Departamento de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da FMUSP.

O tempo de pós-operatório médio foi de 77,5 meses, com variação de 36 a 110 meses.

4.2 Critérios de Inclusão na Amostra

- Pacientes submetidos a DGYR;
- Período de seguimento pós-operatório superior a 36 meses e que compareceram para acompanhamento ambulatorial; e
- Assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

4.3 Critérios de Exclusão na Amostra

- Enfermidade crítica, choque, coma, quadro terminal;
- Reversão da cirurgia metabólica por qualquer motivo;
- Dificuldade de entendimento ou recusa em participar do estudo; e
- Inacessibilidade ao estômago excluso por enteroscopia.

4.4 Avaliação Endoscópica dos Pacientes

Os pacientes foram submetidos a seguimento endoscópico por meio de enteroscopia de duplo balão e coleta de biópsias endoscópicas representativas do coto gástrico funcional e do estômago excluso (antro e corpo) (Figuras 12 e 13).

Estes exames foram realizados no Serviço de Endoscopia Digestiva do Departamento de Gastroenterologia da FMUSP.

Gráfico 2 – Distribuição dos pacientes (grupo caso) de acordo com o gênero

Para realização do estudo endoscópico, tanto do coto gástrico funcional como do estômago excluso foi utilizado um videoenteroscópio de duplo balão (Fujinon EN450P5/20), com 2 metros de comprimento, calibre de 8,5 mm e canal de trabalho de 2,2 mm que avançou através do esôfago (aproximadamente 40 cm), do coto gástrico funcional (5 cm), da alça jejunal do Y-de-Roux (geralmente, com 100 a 150 cm), da alça jejunal biliopancreática (cerca de 50 a 75 cm do ângulo de Treitz) e do duodeno (24 cm). Este aparelho foi utilizado conjugado a um *overtube* flexível com calibre de 12,2 mm (Figura 12).

Figura 12 - Videoenteroscópio de duplo balão, FUJINON, modelo EN450P5/20

Figura 13 – Desenho gráfico que demonstra o esquema de coleta de biópsias endoscópicas realizadas neste estudo

A análise endoscópica incluiu a confirmação da técnica cirúrgica empregada, com observação da anastomose gastrojejunal, introdução do enteroscópio pela alça jejunal e, posteriormente, pelo duodeno e estômago excluídos do trânsito. Foram colhidas quatro biópsias no coto gástrico funcional e oito biópsias no estômago excluído, sendo quatro biópsias no antro e outras quatro no corpo, para a análise histológica e IHQ (Figura 13). Avaliou-se a ocorrência de gastrite, atrofia, metaplasia intestinal ou qualquer outra alteração da mucosa. (Figura 14).

Figura 14 - Imagens do estômago excluso obtidas por enteroscopia de duplo balão: A e B: Lago bilioso; C: Metaplasia intestinal; D: Gastrite erosiva; E: Gastrite hemorrágica e F: Gastrite atrófica

4.5 Seleção e Avaliação do Grupo Controle

Fizeram parte deste grupo 32 pacientes obesos mórbidos que ainda não haviam sido submetidos à cirurgia de DGYR e que foram submetidos à endoscopia digestiva alta, como procedimento pré-operatório. Biópsias endoscópicas provenientes do antro e corpo (quatro e quatro, respectivamente) foram colhidas durante este exame para análise comparativa.

Tanto o grupo controle como o grupo operado foram semelhantes quanto a idade, gênero, alterações histológicas e presença de *H. pylori* (Tabela 1).

A rotina de terapia com inibidor de bomba de prótons (IBP) após DGYR não excedeu 30 dias. Nesta série, nenhum paciente necessitou de uso crônico de IBP nem usava nenhum tipo de medicamento no momento da pesquisa.

4.6 Análise Histológica

Todos os espécimes coletados foram examinados no Laboratório LIM-50 da Faculdade de Medicina da USP por dois patologistas experientes.

Dos blocos de tecido fixados em formalina e incluídos em parafina, foram realizados dez cortes histológicos de 4 µm de espessura de cada bloco e corados pela Hematoxilina-Eosina e Giemsa modificado. Para análise IHQ, as lâminas foram previamente tratadas com silano.

Os espécimes foram avaliados quanto ao grau de inflamação e à ocorrência de: atrofia e/ou metaplasia intestinal; hiperplasia e neoplasia intraepitelial (displasia).

A colonização dos tecidos pelo *H. pylori* foi pesquisada por meio do uso de coloração Giemsa modificada e definida como presente ou ausente.

4.6.1 Histologia e *H. pylori*

O diagnóstico histológico referente à câmara gástrica exclusiva dos pacientes foi aferido, assim como a presença de *H. pylori*. Dos 35 pacientes cujos estômagos exclusos foram acessados pela endoscopia, 7 (20%) apresentaram a bactéria em alguma porção da mucosa exclusiva, e 12 (34,3%) tinham a bactéria no coto gástrico funcional.

A presença de gastrite foi aferida endoscopicamente, sendo que 15 (42,8%) pacientes apresentaram sinais de gastrite moderada. Quanto à histologia, 21 (60%) indivíduos tinham somente edema, 9 (25,7%) apresentaram erosões, e 5 (14,3%)

apresentaram alterações compatíveis com atrofia e metaplasia intestinal (MI) (Gráfico 3) (Tabela 1) (Figura 14).

Gráfico 3 – Análise histológica

Tabela 1 - Comparação clinicopatológica entre pacientes obesos submetidos a DGYR e obesos em pré-operatório (grupo controle)

	DGYR		Controle		P
	N	%	N	%	
Número de pacientes	35		32		
Média de idade	43.4 DP = 13.8		44.7 DP = 15.2		0.84[^]
Gênero					
Mulheres	30	85.7	29	90.6	0.70*
Gastrite - Antro					
Leve	24	68.6	22	68.7	0.90*
Moderada	11	31.4	10	31.3	
Gastrite – Corpo					
Leve	23	65.7	23	71.9	0.60*
Moderada	12	34.3	9	28.1	
Gastrite – Coto gastrico funcional					-
Leve	23	65.7	-	-	
Moderada	12	34.3	-	-	
Atrofia e Met. Intestinal	5	14,3	2	6.3	0.43*
<i>H. pylori</i>	12	34.3	14	43.7	0.46*

DGYR: pacientes submetidos a DGYR;

Controle: pacientes obesos mórbidos em pré-operatório;

[^] = Teste t Student; * = Teste Qui-quadrado de Pearson ; DP = Desvio Padrão

4.7 Análise Imuno-histoquímica

4.7.1 Reação de Imuno-histoquímica

Para rastreamento de possíveis alterações da mucosa gástrica exclusiva foi realizada reação IHQ para: anticorpos monoclonais para:

- Ki-67 (MIB-1, diluição 1:50, Dako Cytomation, Carpinteria, CA, EUA);
- Bcl-2 (NCL-L-Bcl2, diluição 1:80, Novacastra, Newcastle, Reino Unido);
- Caspase 3 (anti caspase 3 humana produzida em coelho, diluição 1:100, Dako Cytomation, Carpinteria, CA, EUA);
- CD3 (anticorpo policlonal anti CD3 humano produzido em coelho), marcador de células T totais (diluição 1:100; Dako, Glostrup, Dinamarca) e
- CD8 (marcador de célula T citotóxica, diluição 1:20; Dako Cytomation, Carpinteria, CA, EUA) e gastrina (diluição 1:80; Dako Cytomation, Carpinteria, CA, EUA).

4.7.2 Técnica de Imuno-histoquímica

O método escolhido na imunocoloração foi o do complexo da estreptavidina-biotina-peroxidase (Dako Cytomation, Carpinteria, CA, EUA).

A técnica IHQ teve por base, experiências descritas anteriormente e padronizadas na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Prof. Dr. Venâncio Avancini Ferreira Alves e Prof. Dr. Carlos Eduardo Pereira Corbett, LIM 50).

Os cortes histológicos confeccionados com 4 µm de espessura foram desparafinados em xilol em estufa a 60° C por 24 horas. As lâminas foram rehidratadas com álcool absoluto, álcool a 70% e água destilada. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada, utilizando-se solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 4% em sete incubações consecutivas de 5 minutos de duração totalizando 35 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e incubados com solução de soro normal de cavalo a 10% em PBS para bloquear as ligações não específicas por 1 hora. Após o bloqueio, aplicou-se o anticorpo primário, incubando-se por 2 horas a temperatura ambiente. Após nova lavagem com PBS, com três incubações de 5 minutos, os cortes histológicos foram incubados com anticorpo secundário marcado com biotina, Link do LSAB + System-HRP (Dako Cytomation, K0690, EUA) por 30 minutos a temperatura ambiente, lavados três vezes e tratados com o complexo da estreptavidina-peroxidase LSAB + System (Dako, K0690, EUA) por 30 minutos a temperatura ambiente. Seguindo-se nova lavagem com PBS (três incubações), foram incubados em solução de tetra-hidrocloreto diaminobenzidina/PBS (Sigma, D-5637, EUA) a 0,05%, peróxido de hidrogênio a 0,04%, durante 20 minutos a temperatura ambiente ao abrigo da luz; os cortes foram lavados com água destilada, contracorados com hematoxilina de Harris e desidratados por meio de álcool etílico e xilol com posterior montagem em lâminas com Entellan (Merck, 107961, Alemanha).

Cortes histológicos de tecidos recomendados pelos fabricantes (tonsilas, mucosa gástrica normal e mucosa de cólon), previamente, conhecidos por expressar níveis elevados das proteínas de interesse foram usados como controles positivos.

Para garantir a uniformidade das reações, viabilizando análise IHQ, a determinação de cada antígeno foi efetuada em única reação. Os controles negativos corresponderam a cortes histológicos dos respectivos tecido-controle recomendados, com a omissão do anticorpo primário o qual foi substituído por PBS.

4.8 Análise das reações imuno-histoquímicas

Os cortes foram analisados e fotomicrografias realizadas, utilizando-se o sistema de análise que consiste de microscópio, modelo Axioskop 2 plus, acoplado a computador, utilizando o software AxioVision, versão 4.3 (Zeiss, Alemanha) (Figura 15).

Figura 15 – Sistema de análise e fotomicrografias

Ki-67: Análise quantitativa utilizando-se microscópio com aumento óptico (AO) 40X e ocular de 10X, contando-se a porcentagem de células epiteliais glandulares marcadas por corte em quatro áreas de 100.000 μm^2 . Os campos contados continham, preferencialmente, glândulas orientadas axialmente, podendo-se visualizar desde o epitélio foveolar até a cripta. Se as glândulas não estivessem bem orientadas, eram contadas duas áreas em locais de melhor marcação e duas áreas em locais onde a marcação fosse mais intensa. Foram assinalados cortes onde a marcação predominava na cripta, onde a marcação estendia-se até próxima à luz. As células foram caracterizadas como positivas mesmo se coradas fracamente. O

marcador Ki-67 foi classificado como índice elevado de proliferação celular quando a positividade fora maior do que 25% das células e, baixo índice quando foi menor do que 25% de células positivas. Isto foi baseado na imunorreatividade para Ki-67 no estômago de indivíduos normais (Olvera *et al.*, 2005; Thomé *et al.*, 2005).

Caspase 3: Análise semiquantitativa, utilizando-se microscópio com AO de 40X e ocular de 10X. A expressão da proteína em células epiteliais da mucosa gástrica, em processo de apoptose, foi aferida, comparando-se a intensidade de marcação das células em relação ao controle positivo, variando de 0 a 4 quanto à intensidade e distribuição (intensidade: 0 = ausência de marcação; 1 = pouca intensidade; 2 = fraca intensidade; 3 = forte marcação; e 4 = intensa marcação como os controles); (distribuição de células: 0 = ausência de coloração; 1 = 10 a 25%; 2 = 26 a 50%; 3 = 51 a 75%; e 4 = 75% ou superior). A imunexpressão da caspase 3 foi considerada elevada quando houve intensidade e distribuição 3 ou 4.

Bcl-2: Análise semiquantitativa, utilizando-se microscópio com AO de 40X e ocular de 10X. A expressão da proteína em células epiteliais da mucosa gástrica foi aferida, comparando-se a intensidade de marcação das células em relação ao controle positivo, variando de 0 a 4 quanto à intensidade e distribuição (intensidade: 0 = ausência de marcação; 1 = pouca intensidade; 2 = fraca intensidade; 3 = forte marcação; e 4 = intensa marcação como os controles); (distribuição de células: 0 = ausência de coloração; 1 = 10 a 25%; 2 = 26 a 50%; 3 = 51 a 75%; e 4 = 75% ou superior). A imunexpressão do Bcl-2 foi considerada positiva se revelasse marcação citoplasmática das células glandulares epiteliais, comumente observadas no fundo das glândulas gástricas, sendo considerada elevada quando intensidade e distribuição fossem 3 ou 4.

Gastrina: Análise quantitativa, utilizando-se microscópio com AO 40X e ocular de 10X, contando-se a porcentagem de células epiteliais glandulares marcadas por corte em quatro áreas de 100.000 μm^2 . Os campos contados continham, preferencialmente, glândulas orientadas axialmente, podendo-se visualizar desde o epitélio foveolar até a cripta. Se as glândulas não estivessem bem orientadas, eram contadas duas áreas em locais de melhor marcação e duas áreas em locais onde a marcação fosse mais intensa. A imunoexpressão de gastrina foi medida pela contagem de células positivas na camada basal do epitélio. Marcação marrom fraca ou forte das células triangulares ou piramidais puderam ser vistas.

CD3 e CD8: Análise quantitativa utilizando-se microscópio com AO 40X e ocular de 10X, avaliando-se a densidade de células marcadas por corte em quatro áreas de 100.000 μm^2 . Foram assinalados cortes que continham infiltrado linfóide difuso e folículos linfóides, de modo que na contagem não foram incluídos folículos linfóides.

Os linfócitos CD3 e CD8 foram caracterizados pela marcação marrom citoplasmática do infiltrado de células epiteliais ou da presença de folículos linfóides. A inflamação foi considerada de alto grau se a intensidade e distribuição fossem 3 ou 4.

Todos os cortes de IHQ foram classificados por dois diferentes pesquisadores em modelo duplo-cego.

4.9 Análise Estatística

Os dados estão expressos como média + desvio padrão (DP) e Intervalo de Confiança e foram analisados, usando os testes t de Student não pareado, Qui-quadrado e Exato de Fischer (estudo não-paramétrico) para comparação dos resultados entre os casos e os controles, com valor de $p < 0,05$, considerado significativo.

5 Resultados

5.1 Resultados da Imuno-histoquímica

5.1.1 Ki-67

A taxa média de células epiteliais imunoreativas para o Ki-67, denotando proliferação celular, nos pacientes que foram operados foi de 24,72% no corpo; 24,88% no antro e 18,3% no coto gástrico funcional. Nos controles, a taxa média de positividade no corpo gástrico foi de 15,03% e no antro 17,7% (Tabela 2) (Figuras 16 A e B).

Figuras 16 A e B - Imuno-histoquímica para Ki-67 (10X), **A:** Imunoexpressão do Ki-67 no antro do estômago excluso demonstra índice de proliferação celular aumentado na camada basal da mucosa e proliferação celular até a superfície do epitélio; **B:** Immunocoloração nuclear normal na camada basal do epitélio nos casos controle (antro)

Tabela 2 - Comparação imuno-histoquímica entre pacientes submetidos a DGYR e obesos em pré-operatório (grupo controle)

		DGYR		Controle		P
		N	%	N	%	
Ki-67			DP		DP	
	Antro	24,88	13,8	17,7	7,87	0.01[^]
	Corpo	24,72	16	15,03	1,33	0.002[^]
	Coto funcional	18,3	12,6			
Caspase 3 elevada						
	Antro		31		46	0,02[^]
	Corpo		23,4		44	0,015[^]
	Coto funcional		49		-	
Gastrina		29,6	7.38	55,5	9,95	0.0003[^]
CD3 elevado						
	Antro		19,6		19,44	0.96[^]
	Corpo		26,5		21,3	0.19[^]
	Coto funcional		18,4		-	
CD8 elevado (% de células CD3+)						
	Antro		48.7		41	0.43*
	Corpo		43		51	0.84*
	Coto funcional		45		-	

DGYR: pacientes submetidos a DGYR; Controle: pacientes obesos mórbidos em pré-operatório.

[^] = Teste t Student; * = Teste Qui-quadrado de Pearson; DP = Desvio Padrão

5.1.2 Caspase 3

Os casos de estômago excluso tiveram padrão de intensidade/distribuição elevada no corpo de 23,4% e no antro de 31%; enquanto que nos controles tiveram padrão de intensidade/distribuição de 44% no corpo e de 46% no antro. No coto gástrico funcional observou-se um padrão de caspase 3 elevada em 49% dos casos (Tabela 2) (Figuras 17 A e B).

Figuras 17 A e B - Imuno-histoquímica para Caspase 3. A: Epitélio do antro gástrico excluso. Fraca coloração marrom tanto citoplasmática como nuclear pode ser detectada (20X), B: Forte imunoexpressão nuclear da Caspase 3 no antro do caso controle (20X)

5.1.3 Gastrina

Somente biópsias do antro gástrico continham células positivas para gastrina, detectadas pela presença de imunocoloração marrom das células piramidais no epitélio da camada basal de ambos os grupos: operados por DGYR e controle.

Nos casos submetidos a DGYR, o número médio de células marcadas para gastrina foi de 29,6 % no grupo caso e de 55,5% no grupo controle. A porcentagem média de células produtoras de gastrina no antro gástrico excluído do trânsito foi de 7,38%, enquanto que nos controles a média foi de 9,95% ($p=0,0003$). Nos pacientes com pesquisa para *H. pylori* positiva no antro, a média de células glandulares produtoras de gastrina foi de 8,54%, enquanto que naqueles sem *H. pylori* a média foi de 7,05% (Gráfico 4) (Tabela 2) (Figura 18).

Gráfico 4 - Porcentagem de células secretoras de gastrina em antro excluso x antro controle e gastrina relacionada à presença ou ausência de *H. pylori*

Figuras 18 A, B, C, e D - Imuno-histoquímica para gastrina. A, B: Epitélio do estômago excluído apresenta pouca imunorreatividade celular para gastrina (20X, 40X). C, D: No caso controle, numerosas células positiva para gastrina podem ser observadas na mucosa do antro (20X, 40X)

5.1.4 CD3 e CD8

Os pacientes submetidos a DGYR possuíam em média 26,5 linfócitos CD3 positivos por campo contado no corpo gástrico, 19,6 no antro e 18,4 no coto gástrico funcional. Os controles possuíam 21,3 linfócitos T CD3 positivos por campo em média no corpo e 19,44 no antro (Tabela 2).

Não houve diferença na porcentagem de células CD3 que foram marcadas para CD8 (48,7% nas células do antro excluso versus 41% no grupo controle, 43% no corpo excluso versus 51% nas biópsias do grupo controle (Figuras 19 e 20) (Tabela 2).

Figuras 19 A e B - Imuno-histoquímica para CD3. Infiltrado inflamatório crônico no epitélio do estômago excluso apresentando inúmeras células positivas para CD3. Infiltrado inflamatório de linfócitos T para as células superficiais dos *pits* podem ser vistos (10X)

Figuras 20 A e B - Imuno-histoquímica para CD8. Linfócitos são positivos para CD8 na mucosa do estômago excluso (10X e 20X)

Os cortes com folículos linfóides foram assinalados, de modo que 34,8% dos pacientes colonizados por *H. pylori* tinham folículos visíveis, versus 17,4% dos pacientes sem a bactéria (Tabela 2) (Gráfico 5).

A porcentagem de células proliferativas em pacientes com e sem *H. pylori* foi semelhante (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Relação entre presença de folículos linfóides e *H. pylori*

5.1.5 Bcl-2

A imunoexpressão do Bcl-2 na mucosa gástrica exclusiva foi representada pela coloração citoplasmática intensa de células epiteliais glandulares, geralmente nas glândulas gástricas profundas. Não houve diferença na imunorreatividade do Bcl-2 em comparação com os casos controle.

5.2 Resumo dos Resultados

- 1) O índice proliferativo da mucosa gástrica exclusiva, denotado pela positividade do Ki-67, foi significativamente maior do que nos controles;
- 2) A imunoexpressão de Caspase 3 estava diminuída no estômago exclusivo em comparação com os controles;
- 3) Houve imunorreatividade intensa e difusa para Bcl-2 na mucosa gástrica, tanto nos casos como nos controles, não havendo diferença estatística entre os mesmos;
- 4) Houve redução no número de células produtoras de gastrina na mucosa do antro gástrico exclusivo em relação ao grupo controle; e
- 5) Não houve diferença na imunoexpressão de células CD3 e CD8 quando se comparou grupo operado e grupo controle.

6 Discussão

A obesidade mórbida é condição clínica grave porque implica em piora da qualidade de vida, possui alta morbidade e redução da expectativa de vida (Brolin, 2000).

Estudos apontam que existem cerca de 937 milhões de adultos com sobrepeso e 396 milhões de obesos no mundo; ou seja, aproximadamente, um terço da população mundial é considerada portadora de sobrepeso ou obesa (WHO, 2011).

A prevalência de obesidade nos Estados Unidos da América (EUA) vem gradualmente aumentando (30,5% em 2000), principalmente em jovens e, conseqüentemente, aumentando o número de cirurgias bariátricas (140.000 em 2005) (Buchwald; Oien, 2009).

Abordagens medicamentosas demonstram taxas de abandono do tratamento de até 50% e alto índice de reganho de peso. O tratamento tradicional com dieta, exercícios e medicação, geralmente, proporciona redução de 5 a 10% do peso corpóreo; enquanto que, o reganho de peso excede 90% em 5 anos (Wadden *et al.*, 1989; Safer, 1991).

Em 2007, a American Psychological Association após revisão de 31 estudos, demonstrou que após dois anos, cerca de dois terços dos pacientes acabam pesando mais do que antes do início do regime (Mann *et al.*, 2007).

Em virtude da alta probabilidade de fracasso dos tratamentos conservadores, o tratamento cirúrgico mostrou-se capaz de alterar significativamente comorbidades

agravadas pela obesidade mórbida, revelando-se como o método de melhor efetividade na manutenção do peso após 10 anos de tratamento (Kelly *et al.*, 2008).

Várias cirurgias restritivas e malabsortivas foram desenvolvidas nas últimas quatro décadas como método durável para perda de peso, mas que não são isentas de complicações como úlcera anastomótica, fístula gastrogástrica, sangramento pós-operatório, estenose anastomótica e hérnia interna (Mason; Ito, 1967; Griffen *et al.*, 1977; Garrido, 1998; Brolin, 2000; Gentileschi *et al.*, 2002; Buchwald; Williams, 2004).

Dentre as opções cirúrgicas atualmente disponíveis, a DGYR, tanto pelo método aberto quanto laparoscópico, é um dos procedimentos cirúrgicos mais realizados mundialmente para tratamento da obesidade desde o início da década de 90, principalmente por ser eficaz e seguro, com manutenção dos resultados da perda de peso e com controle das comorbidades tanto a médio quanto em longo prazo (Consensus, 1991; Pories *et al.*, 1995; MacGregor, 2002; Buchwald; Oien, 2009).

Patterson *et al.* (2003) apontam que a expectativa de vida melhora em média 11% após DGYR laparoscópica quando comparada com dieta e exercícios simplesmente. Flum e Dellinger (2004) acharam que os pacientes obesos mórbidos tiveram decréscimo de 33% no risco de morte após DGYR.

Com a perda de peso, controle ou resolução de comorbidades, acredita-se que haja promoção na qualidade e expectativa de vida dos pacientes obesos mórbidos operados, assemelhando-se a expectativa de vida de indivíduos normais.

Os mecanismos responsáveis pela perda de peso e pelo controle das doenças associadas incluem não só o grande efeito restritivo e algum grau de má-absorção

que esta cirurgia produz, mas também efeitos hormonais responsáveis pelo controle do apetite e velocidade do trânsito intestinal do alimento (Le Roux; Bloom, 2005). O efeito endócrino que este procedimento produz faz com que se obtenha a resolução do diabetes tipo 2 e da dislipidemia antes mesmo que ocorra grande perda de peso, fato este que pode acontecer no período pós-operatório mais precoce (Rubino *et al.*, 2004).

As alterações nas secreções hormonais após DGYR podem ser responsáveis por mudanças epiteliais. Por exemplo, a grelina que é potente orexígeno peptídeo (estimula o apetite), possui participação na resposta adaptativa à perda de peso. Ao contrário do que se espera, a quantidade de grelina nos obesos é menor do que nas pessoas com peso ideal. Os obesos têm maior sensibilidade a este hormônio e um mecanismo que reduz sua produção quando ganha peso. Após a DGYR, a grelina está diminuída, e já é sabido que este hormônio altera a taxa de apoptose epitelial (Cummings *et al.*, 2002).

Desta maneira, existe preocupação sobre as possíveis alterações na mucosa do estômago excluído após a DGYR, principalmente pelo fato de que tais pacientes permanecerão por 30 a 50 anos com este segmento excluído do trânsito alimentar e inacessível pelo exame de endoscopia convencional, sendo possível estudá-lo, apenas, através da enteroscopia assistida por balão, seja mono ou duplo. Portanto, várias diretrizes recomendam a realização de endoscopia digestiva alta no pré-operatório de todos pacientes obesos antes da cirurgia bariátrica, independente da presença ou ausência de sintomas (Sauerland *et al.*, 2005). A identificação de lesões no pré-operatório de pacientes assintomáticos poderá alterar o tipo de abordagem cirúrgica (Azagury *et al.*, 2006).

Com o uso do enteroscópio de duplo balão, pode-se avaliar o trato alimentar modificado após DGYR, nas quais é possível examinar alça alimentar, alça biliar e estômago excluso, com índice de sucesso de 87,5% (Sakai *et al.*, 2005). Todavia, a utilização da enteroscopia resolveu parcialmente esta dificuldade, pois nos casos de falha da EDB em que o estômago excluso não foi acessado, restam como opções para estes pacientes a cirurgia, gastroscopia virtual, ou gastrostomia percutânea (Fobi *et al.*, 1998; Silecchia *et al.*, 2002; Goitein *et al.*, 2006).

Apesar de excluído do trânsito alimentar após DGYR, a câmara gástrica está sujeita a refluxo duodenogástrico em até 36% dos casos (Sundbom *et al.*, 2002). A exposição crônica à secreção bilioduodenopancreática parece estar associada ao desenvolvimento de alterações histológicas consideradas como condições pré-cancerosas (gastrite crônica atrófica e metaplasia intestinal) e lesão pré-cancerosa (displasia gástrica) (Miwa *et al.*, 1995; Kondo, 2002; Kuga *et al.*, 2007; Ishida *et al.*, 2007; Safatle-Ribeiro *et al.*, 2007).

Pode-se fazer uma analogia, ainda que não seja perfeita, com a existência de câncer de coto gástrico após gastrectomia parcial a Billroth II para tratamento de doença ulcerosa benigna, sendo esta neoplasia mais frequente naqueles pacientes que tinham no mínimo 15 anos de seguimento pós-operatório, com incidência de 8,4% (Safatle-Ribeiro *et al.*, 1998). Os prováveis mecanismos fisiopatológicos para este evento incluem: refluxo enterogástrico de secreção pancreatobiliar, hipo ou acloridria com subsequente crescimento bacteriano e exposição de agentes carcinogênicos como ácidos biliares e nitrosaminas, efeito da regulação hormonal secundária à vagotomia e hipogastrinemia (Sinning *et al.*, 2007; Ishida *et al.*, 2007).

Kuga *et al.* (2007) constataram endoscopicamente gastrite enantematosa, erosiva, hemorrágica e atrófica, presentes em 74% de 35 pacientes obesos operados à DGYR. Interessantemente, a mucosa do coto gástrico funcional estava normal em 97% dos casos. Este dado indica que a aparência macroscópica do coto gástrico funcional não é fator preditivo das lesões no estômago excluído (Kuga *et al.*, 2007; Safatle-Ribeiro *et al.*, 2007; Ishida *et al.*, 2007)

Adicionalmente, Safatle-Ribeiro *et al.* (2007) relataram a presença de *H. pylori* no estômago excluído após DGYR nesta série de 35 pacientes. Ishida *et al.* observaram, ainda, alteração na população bacteriana e produção de TNF- α e TGF- β (Ishida *et al.*, 2007)

Embora não existam referências da prevalência de câncer gástrico após cirurgia de DGYR, o diagnóstico desta doença foi sempre secundário ao início de sintomatologia inespecífica ou intercorrência clínica, tais quais: vômitos incoercíveis, sangramento, emagrecimento e dor abdominal; sintomas estes que se confundem com os esperados no pós-operatório de cirurgia bariátrica, o que acaba por contribuir para o diagnóstico de doença maligna em estado avançado.

Na literatura médica (*PubMed*) foram relatados vinte e um casos, sendo incluídos os da junção gastroesofágica (14,3%), do coto gástrico funcional (47,6%) e do estômago excluído (38,1%). Destes, 71,4% ocorreram em mulheres com idade média de 55 anos (38-71 anos), cujo período de latência entre a DGYR e o diagnóstico de câncer gástrico foi de aproximadamente 10 anos (Menéndez *et al.*, 2012).

No nosso estudo não houve associação direta entre tempo de cirurgia e aparecimento de metaplasia intestinal e atrofia de mucosa do estômago excluso; todavia, estas lesões não existiam na mucosa gástrica, no pré-operatório, dos pacientes submetidos a DGYR para tratamento da obesidade.

Menéndez *et al.* (2012), através de estudo retrospectivo, ao avaliarem 22.094 pacientes operados entre 1990-2003 e seis casos de câncer gástrico descritos neste mesmo período, sugerem que a incidência de câncer gástrico seria de 24/100.000 pacientes obesos submetidos a qualquer procedimento bariátrico. A incidência estimada de câncer gástrico em pacientes sem nenhuma cirurgia bariátrica (306/100.000) é mais alta do que a estimada para os pacientes obesos operados (24/100.000) e, embora se acredite que a cirurgia bariátrica possa reduzir o risco de câncer, estes dados são mais altos do que a incidência global de câncer gástrico (7,8/100.000) (Menéndez *et al.*, 2012).

Desta forma, pela possibilidade do estômago excluso ser alvo de danos epiteliais, alguns cirurgiões bariátricos têm demonstrado preocupação e recomendado a DGYR com ressecção do estômago distal como tratamento para pacientes obesos mórbidos oriundos de regiões que possuem alta incidência de câncer gástrico, tais quais os do Japão, Coreia, Chile, Argentina, Brasil, Colômbia e México (Csendes *et al.*, 2005; Madan *et al.*, 2005; Braghetto *et al.*, 2011).

Csendes *et al.*, ao executarem 400 DGYR, associaram a gastrectomia do estômago distal e obtiveram resultados muito similares àqueles com DGYR apenas, eliminando potenciais riscos como úlcera anastomótica, fístula gastrogástrica, sangramento pós-operatório devido à úlcera péptica e gastrite, além do eventual desenvolvimento de câncer gástrico (Csendes *et al.*, 2005).

No caso de neoplasias, a seleção de painéis de anticorpos (Ac) pode ser dirigida a conjuntos de diagnósticos diferenciais baseados na morfologia, seguindo-se uma reação complementar com seleção de Ac, avaliando-se caso a caso. Em ambas às situações, faz-se necessário a correlação com o contexto clinicomorfológico. Por sua vez, a evolução da IHQ deveu-se ao advento da recuperação antigênica e ao desenvolvimento de anticorpos monoclonais; fatos marcantes que propiciaram uma enorme fonte de reagentes altamente específicos para a demonstração de vários antígenos tissulares ou celulares. Isso possibilitou aos pesquisadores o uso de marcadores como fatores preditivo e de prognóstico (Bodey, 2002).

Portanto, no presente estudo, definiu-se um painel de marcadores moleculares para analisar, através do estudo IHQ, a taxa de proliferação celular, apoptose, função hormonal da gastrina, assim como a resposta inflamatória na mucosa do estômago excluído em pacientes obesos submetidos a DGYR e no tecido gástrico de indivíduos obesos não operados, como grupo controle. Em última análise, propôs-se, assim, identificar marcadores moleculares para a detecção precoce de possíveis alterações de mucosa do estômago excluído após DGYR.

O anticorpo monoclonal Ki-67 é uma proteína humana nuclear que se expressa em todas as fases ativas do ciclo celular sendo amplamente utilizado na rotina patológica como marcador de proliferação celular. Possui a capacidade de reconhecer um epítopo num antígeno lábil nuclear que está presente nas células em proliferação, mas não em células na fase G0 do ciclo celular, devido a processos de fosforilação (Cattoretti *et al.*, 1992). Sua superioridade como marcador de proliferação celular deve-se à pequena influência sofrida por ação de fatores internos

e externos, além da sua expressão nuclear em período definido do ciclo, constituindo método útil e simples para se estimar a atividade proliferativa (Vieira *et al.*, 2009; Menezes *et al.*, 2010).

Neste estudo, o índice proliferativo das células epiteliais medido pelo Ki-67 revelou-se aumentado nos casos quando comparado aos controles, tanto no antro quanto no corpo gástrico, podendo indicar aumento da cinética celular no epitélio da mucosa gástrica exclusiva.

A homeostase epitelial gástrica é mantida por um equilíbrio entre taxa de proliferação celular e morte celular programada ou apoptose (Correa, 1992). O desequilíbrio entre estes dois processos conduz ao aumento da proliferação da mucosa gástrica, que pode aumentar o efeito carcinogênico no DNA, aumentando o risco de alterações mutacionais e o desenvolvimento de câncer gástrico. Por outro lado, a apoptose, um mecanismo de regulação gênica de morte celular, desempenha papel essencial na eliminação de células desnecessárias ou danificadas do organismo (Clarke *et al.*, 1997; Shiotani *et al.*, 2005; Yang L *et al.*, 2006).

A apoptose tem função essencial na manutenção da integridade da mucosa gastrointestinal. Sua desregulação está associada à ocorrência de lesões, tais como gastrite atrófica, úlceras pépticas, metaplasia intestinal, e carcinogênese gástrica (Yang L *et al.*, 2006). A hiperexpressão de genes anti-apoptóticos e a hipoeexpressão de genes pró-apoptóticos podem resultar em alterações epiteliais que favoreçam a desregulação da apoptose, evitando a morte de células alteradas geneticamente que podem, por ventura, adquirir mutações que as tornem imortais.

Caspase 3 é importante elemento promotor de apoptose e possui estreita correlação com formação do câncer gástrico quando está hipoexpressa, sendo indicador potencial de formação e progressão tumoral. Demonstrou-se que a expressão da caspase 3 foi hiperexpressa na gastrite atrófica crônica, com ou sem metaplasia intestinal e displasia de baixo ou moderado grau; enquanto que, se apresenta hipoexpressa na displasia grave e carcinoma gástrico (Yang L *et al.*, 2006).

Os resultados do presente estudo demonstraram que, apesar da ausência de displasia ou câncer, a imunoexpressão da caspase 3 estava diminuída no estômago excluído em comparação com o grupo controle. Este resultado foi independente da presença ou ausência de *H. pylori*, o que significa que a infecção por *H. pylori* não é o único elemento responsável pela alteração na expressão da caspase 3 no epitélio gástrico.

Supõe-se que com apoptose reduzida e hiperproliferação celular aumentada, esteja estabelecido o desequilíbrio no ciclo celular, podendo predispor o epitélio gástrico ao risco de dano genotóxico e mutagênico. Com apoptose reduzida, mais células sobrevivem e proliferam, propiciando, desta maneira, o acúmulo de possíveis mutações, e conduzindo a maior risco de carcinogênese em longo prazo.

Interessantemente, Bcl-2 é proteína que suprime a apoptose e, conseqüentemente, aumenta a sobrevivência celular. Surgiu como chave reguladora da apoptose porque pode proteger células da morte induzida por diversos agentes que incluem radiação, quimioterapia ou deficiência do fator de crescimento (Soini *et al.*, 1998; Scopa, 2001). Em alguns estudos, a expressão da proteína Bcl-2 tem sido correlacionada a prognóstico favorável em diversos tumores malignos (Pezzella *et al.*, 1993; Diebold *et al.*, 1996), enquanto em outros, esta expressão tem sido

relacionada com pior prognóstico (Saegusa *et al.*, 1995; Bubendorf *et al.*, 1996). Contudo, outros investigadores relatam não haver correlação entre a expressão do Bcl-2 e prognóstico (Koshida *et al.*, 1997; Tsamandas *et al.*, 2007).

Em relação a expressão do Bcl-2 no câncer gástrico, estudos prévios mostraram que o Bcl-2 está expresso mais frequentemente nos tumores de grau leve ou estágio precoce, mas que não apresentavam nenhum impacto no desfecho destes pacientes (Müller *et al.*, 1998; Kopp *et al.*, 2005; Zafirellis *et al.*, 2005; Lauwers *et al.*, 1995). Por outro lado, Clarke *et al.* demonstraram associação entre Bcl-2 e metaplasia intestinal incompleta, além da hiperexpressão em pacientes com tumor do coto gástrico (Clarke *et al.*, 1997).

Erkan *et al.* (2012) comparando biópsias de indivíduos com metaplasia intestinal, gastrite crônica ativa e mucosa gástrica normal pela análise do índice de apoptose, proliferação e expressão do Bcl-2, concluíram que não houve diferença estatística ($p>0,05$) entre apoptose e Bcl-2. A expressão do Ki-67 foi significativamente mais alta no grupo com metaplasia intestinal quando comparada com os grupos de gastrite crônica ativa e mucosa gástrica normal ($29,90\pm22,87$ x $18,18\pm16,22$ x $18,54\pm20$, respectivamente) ($p=0,012$). Embora metaplasia intestinal apresente aumento na proliferação celular, nenhuma elevação foi observada na apoptose. Tal fato pode ser um fator importante na progressão para câncer gástrico.

Os resultados deste estudo não mostraram diferença na imunorreatividade do Bcl-2 da mucosa gástrica exclusiva em comparação com os controles, provavelmente porque este marcador possa participar de um mecanismo ou via alternativa da apoptose.

Teoricamente, a inexistência de alimento no estômago excluso não promove sua distensão mecânica e impede sua alcalinização por meio do efeito tampão dos alimentos. O pH baixo intragástrico estimula a produção de secretina e somatostatina, que conseqüentemente, inibe a secreção de gastrina. Isto pode funcionar como um *feedback* negativo conduzindo a uma prolongada diminuição de gastrina.

Como a gastrina funciona como hormônio trófico que estimula a reparação da mucosa, a sua redução poderia contribuir para o desenvolvimento de atrofia de mucosa no estômago excluso (Leme *et al.*, 2003; Hedbreg *et al.*, 2005; Beckman *et al.*, 2010).

Sunbom *et al.* (2007) estudaram a gastrinemia de pacientes obesos mórbidos no pré-operatório e com 1, 6 e 12 meses após a DGYR, constatando queda gradual da gastrina sérica no pós-operatório, chegando a níveis inferiores aos do pré-operatório; provavelmente, decorrente de disfunção vagal e perda ponderal.

Anderi Jr *et al.* (2008) ao dosarem a gastrinemia, por radioimunoensaio, no pré e no 60º dia pós-operatório de 20 pacientes obesos submetidos à DGYR, observaram valores normais (inferiores a 200ng/mL) nos 20 pacientes e sem diferenças estatísticas significantes.

Apesar deste estudo não ter realizado a dosagem de gastrinemia antes e depois da DGYR; tanto os estudos experimentais como em humanos demonstraram diminuição da gastrina sérica após exclusão gastroduodenal (Leme *et al.*, 2003; Anderi *et al.*, 2008).

Portanto, a exclusão gástrica do trânsito alimentar e a inexistência de estímulo para secreção de gastrina, poderia explicar a causa da importante redução da imunoexpressão de células produtoras de gastrina na mucosa gástrica excluída nos casos em comparação com os controles ($p = 0,0003$).

Diversos fatores também corroboram para alterações endoscópicas e histológicas relacionadas ao processo inflamatório da mucosa do estômago excluído após DGYR, provavelmente, pelo já citado refluxo duodenogástrico e infecção pelo *H. pylori* (Kuga *et al.*, 2007; Safatle-Ribeiro *et al.*, 2007).

A infecção pelo *H. pylori* é mais prevalente na população de obesos e possui índices médios de 61,3% e, naqueles submetidos a cirurgia bariátrica, estes índices variam de 24 a 70% (Ramaswamy *et al.*, 2004; Yang CS *et al.*, 2006; Azagury *et al.*, 2006).

Por ser um importante agente etiológico de gastrite e úlcera péptica, a infecção pelo *H. pylori* parece estar relacionada com a cronificação destas lesões e evolução para condições pré-malignas (gastrite atrófica e metaplasia intestinal).

Segundo Hunt *et al.* (1995), Misiewicz (1995) e Vaira *et al.* (2000), a colonização do tecido gástrico pelo *H. pylori* é quase sempre acompanhada por uma resposta inflamatória na mucosa subjacente, induzindo um infiltrado inflamatório na de neutrófilos, monócitos, linfócitos e plasmócitos e a expressão de citocinas pró-inflamatórias como interleucinas (1, 2, 6 e 8), fator de necrose tumoral (alfa) e interferon.

No presente estudo, o *H. pylori* estava positivo em 7/35 pacientes (20%) do estômago excluído e no coto gástrico proximal em 12/35 pacientes (34,3%).

O complexo de proteína CD3 é expressa no início da maturação das células T, onde se localiza no citoplasma de uma localização perinuclear. Como produto de maturação de células T, a expressão de CD3 citoplasmático é perdida e o antígeno CD3 é encontrada na superfície das células. A especificidade do antígeno CD3 para a linhagem de células T e sua aparição no início do processo de maturação de células T torna-o um marcador de célula T ideal, tanto para a detecção de células T normais e neoplasias de células T (linfomas e leucemias) (Chetty; Gatter, 1994; Salvadori *et al.*, 1994; Vernau; Moore, 1999).

O antígeno CD3 é mais frequentemente expresso por células T, que são um subconjunto de linfócitos que amadurecem no timo e caracterizados pela expressão do TCR. Por esta razão, o complexo CD3 pode ser eficazmente utilizado como marcador de célula T. A combinação de anticorpos conjugados contra CD3 com os outros marcadores de linfócitos, tais como CD3, CD4, CD45RA, CD45RO, CD56 e CD16, dá a possibilidade de distinguir as diferentes populações de linfócitos e da sua fase de maturação.

A análise IHQ para CD3 e CD8 não demonstrou diferença no número das populações de células T em ambos os grupos (casos e controle), talvez indicando que o infiltrado inflamatório observado não seja a principal alteração histológica observada nestes estômagos exclusivos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A obesidade mórbida tem alcançado *status* de epidemia de saúde pública no Brasil e no mundo, e a DGYR representa a técnica cirúrgica mais utilizada para esta morbidade, inclusive em pacientes jovens (NAASO, 2000; Gomes *et al.*, 2006).

Neste estudo observou-se redução do índice de células em apoptose, proliferação celular aumentada e expressão de gastrina diminuída.

É provável que, ao examinar outros marcadores moleculares, novos esclarecimentos surjam sobre o estado de saúde da mucosa do estômago excluído de pacientes submetidos a DGYR.

Alterações na renovação celular nestes pacientes podem ter relevância no acompanhamento a longo prazo, podendo implicar em intervenções terapêuticas futuras para os pacientes obesos mórbidos.

Desta maneira, seria pertinente além da realização da endoscopia digestiva alta no pré-operatório de cirurgia bariátrica, o seguimento endoscópico com avaliação do estômago excluído após a DGYR.

7 Conclusão

Dentro das condições de realização desta pesquisa, pode-se concluir:

- 1) O painel de marcadores moleculares empregados foi suficiente para demonstrar aumento no índice de proliferação celular e diminuição da apoptose no epitélio do estômago exclusivo de pacientes obesos operados à DGYR, quando comparados ao grupo controle de pacientes obesos não operados.
- 2) Observou-se ainda diminuição da secreção de gastrina na mucosa gástrica exclusiva desses obesos operados.
- 3) Não houve associação entre os marcadores imuno-histoquímicos e as alterações histológicas e/ou a presença de *H. pylori*.

8 Anexos

Tabela Geral de Observações 1

Casos	Tempo após cirurgia (meses)	Gênero	Idade	Histologia		Gastrite	<i>H. pylori</i>		
				Corpo Excluso	Antro Excluso		Corpo Excluso	Antro Excluso	Coto gástrico
1	54	M	51	atrofia + MI	edema	moderada	negativo	negativo	positivo
2	48	F	50	edema	edema	leve	negativo	negativo	negativo
3	48	F	49	atrofia	atrofia + MI	leve	negativo	negativo	negativo
4	36	F	61	edema	erosão	leve	negativo	negativo	negativo
5	60	F	33	edema	edema	leve	negativo	negativo	negativo
6	88	F	55	atrofia + MI	atrofia + MI	moderada	negativo	negativo	negativo
7	55	F	38	edema	edema	moderada	positivo	positivo	positivo
8	92	F	46	edema	edema	leve	positivo	negativo	positivo
9	100	F	52	edema	erosão	moderada	negativo	negativo	negativo
10	100	F	57	edema	erosão	moderada	positivo	positivo	positivo
11	72	F	47	atrofia + MI	edema	moderada	negativo	negativo	negativo
12	92	F	32	edema	sem gastrite	leve	negativo	negativo	negativo
13	94	F	45	edema	edema	leve	negativo	negativo	negativo
14	65	F	27	edema	edema	leve	negativo	negativo	negativo
15	90	M	43	atrofia	erosão	moderada	positivo	negativo	positivo
16	56	F	37	edema	edema	leve	positivo	negativo	positivo
17	77	M	47	edema	erosão	leve	negativo	negativo	negativo
18	61	F	33	edema	edema	moderada	negativo	negativo	negativo
19	76	M	42	edema	erosão	leve	negativo	negativo	negativo
20	84	F	51	edema	edema	moderada	negativo	negativo	positivo

continua

Tabela Geral de Observações 1 (conclusão)

Casos	Tempo após cirurgia (meses)	Gênero	Idade	Histologia		Gastrite	<i>H. pylori</i>		
				Corpo Excluso	Antro Excluso		Corpo Excluso	Antro Excluso	Coto gástrico
21	77	F	22	edema	erosão	leve	negativo	negativo	negativo
22	72	F	51	edema	edema	leve	negativo	negativo	positivo
23	68	F	30	sem gastrite	erosão	leve	negativo	negativo	negativo
24	75	F	33	edema	edema	leve	negativo	negativo	negativo
25	76	F	33	edema	edema	leve	negativo	negativo	negativo
26	74	F	40	edema	edema	leve	negativo	negativo	positivo
27	84	F	48	edema + MI	edema	moderada	positivo	positivo	positivo
28	96	F	56	edema	edema	moderada	negativo	negativo	negativo
29	80	F	50	edema	edema	moderada	negativo	negativo	negativo
30	110	F	46	edema	edema	moderada	positivo	positivo	positivo
31	91	F	51	edema	edema	leve	negativo	negativo	negativo
32	102	F	41	edema	edema	leve	negativo	negativo	negativo
33	89	F	57	edema	edema	moderada	negativo	negativo	negativo
34	92	M	34	edema	edema	moderada	negativo	negativo	positivo
35	81	F	31	edema	erosão	leve	negativo	negativo	negativo

Tabela Geral de Observações 2

Casos	Gastrina			CD3			Ki-67						Bcl-2			Caspase 3					
	Corpo	Antro					Corpo		Antro		Coto		Corpo	Antro	Coto	Corpo	Antro		Coto		
		Posi- tivo	%	Posi- tivo	%	Posi- tivo	%	Intens	Dist	Intens	Dist	Intens					Dist				
1	10	34	10.37	187	109	77	23	6.93	54	15.25	*	*	FL	-	-	2	2	2	3	1	1
2	3	20	3	116	84	48	141	52.61	64	16.2	77	15.49	-	2/1	2/3	0	0	1	1	1	1
3	0	6	3.35	104	73	66	128	31.76	97	38.34	53	25.85	-	2/3	-	1	2	2	1	2	1
4	0	57	14.73	88	24	2	48	14.41	174	42.23	82	22.84	2/1	-	-	1	1	1	1	1	1
5	0	14	3.06	100	60	65	30	8.4	21	10.45	7	2.79	2/1	-	-	3	2	1	2	3	2
6	0	15	5.88	62	147	75	151	31.26	124	33.6	92	30.56	-	-	2/1	3	3	4	2	3	2
7	0	21	8.3	151	194	131	83	23.51	138	31.01	*	*	-	2/2 basal	-	2	1	2	1	2	2
8	0	68	14.29	83	32	88	15	7.85	33	10.78	52	17.28	FL			1	1	1	1	1	1
9	3	14	3.4	85	29	21	58	15.03	99	22.35	*	*	3/3 basal	2/3 basal	3/3 basal	1	2	1	2	1	1
10	0	6	1.39	212	194	167	177	36.27	140	32.56	87	19.29	3/3 basal	3/2	3/3	4	3	4	3	4	3
11	0	37	8.39	136	103	90	104	23.42	47	17.87	38	13.06	2/2	3/2	2/1 basal	3	3	3	3	1	1
12	0	0	0	82	60	49	104	21.89	61	16.85	86	26.22	2/1	2/2	2/3	2	3	2	3	2	2
13	0	43	8.67	158	117	51	164	53.77	182	35.62	61	21.33	3/3	3/2	-	3	4	2	3	2	3
14	0	24	14.29	81	99	73	31	11.27	137	34.16	59	19.73	2/2 basal	3/1 basal	3/3	3	4	2	3	0	0
15	0	24	10.39	111	120	151	168	56.95	188	58.2	91	34.08	2/3 basal	3/1 basal	3/3	1	1	1	1	1	1
16	0	35	11.04	55	64	120	45	16.07	66	26.51	68	12.69	2/2	2/1		2	1	2	1	2	2
17	0	26	7.85	79	49	63	81	20.82	153	40.91	*	*	3/2	2/2	2/2 basal	3	2	1	2	2	3
18	0	34	9.63	155	47	44	134	56.54	112	36.48	117	33.52	3/2	3/2	-	2	3	0	0	0	0

continua

Tabela Geral de Observações 2 (conclusão)

Casos	Gastrina			CD3			Ki-67						Bcl-2			Caspase 3					
	Corpo		Antro				Corpo		Antro		Coto		Corpo	Antro	Coto	Corpo		Antro		Coto	
		Posi- tivo	%	Corpo	Antro	Coto	Posi- tivo	%	Posi- tivo	%	Posi- tivo	%				Intens	Dist	Intens	Dist	Intens	Dist
19	0	41	11.08	59	29	19	185	55.22	97	32.88	38	10.53	2/4	3/3	3/3	4	3	3	2	2	2
20	0	0	0	137	107	125	127	43.34	41	10.15	72	18.56	2/3	2/3	3/3	3	3	1	1	2	2
21	0	7	2.88	77	56	40	27	7.65	89	34.63	43	15.14	3/2	3/3	-	4	4	4	4	3	2
22	0	0	0	62	67	48	106	32.52	43	17.13	97	30.41	2/3	2/3	3/3	3	3	3	3	3	2
23	0	21	5.34	108	49	38	116	28.78	15	5.54	46	13.26	3/3	3/3	2/3	3	3	4	4	3	3
24	0	48	20.96	50	46	73	50	12.14	34	10.46	62	17.03	2/3	2/3	2/3	2	2	2	2	0	0
25	0	51	11.49	74	37	55	72	16.94	28	10.26	19	6.57	3/2	3/2	-	1	2	3	3	3	2
26	0	53	10.27	68	*	52	17	4.64	102	31.58	40	12.46	2/3	2/3	-	1	2	1	2	1	2
27	0	0	0	186	163	67	33	12.99	79	24.61	102	52.31	2/3 basal	3/2	3/1	2	2	2	1	2	2
28	0	0	0	94	42	25	36	13.85	14	6.48	39	14.89	2/2	2/3	3/2 basal	2	3	1	3	2	2
29	0	20	5.88	116	*	34	65	32.66	96	32.99	46	16.61	3/2	3/2	-	3	4	2	2	3	4
30	0	83	24.48	87	93	59	51	21.79	29	11.65	122	28.84	3/2	2/2	3/2	3	2	2	1	2	1
31	0	30	6.71	110	56	46	84	22.46	47	14.46	9	3.27	2/3	3/2	3/2	2	1	2	3	2	3
32	3	0	0	89	89	57	21	9.05	32	12.45	32	12.26	2/3	3/2	3/2	2	3	2	3	3	3
33	0	0	0	253	177	129	131	28.17	155	47.69	88	38.43	FL	3/2	3/2	2	3	2	3	3	3
34	0	13	5	69	106	164	92	38.17	76	34.23	97	33.11	2/3	3/2	-	2	2	3	3	3	3
35	0	66	16.3	117	77	114	45	20.18	149	39.52	113	34.98	3/3	2/3	3/3	2	3	3	3	3	2

Tabela Geral de Observações 3

Controles	Histologia MI		Gastrite	H. pylori	Gastrina - Antro		Caspase 3				CD3		Ki-67				Bcl-2	
	Corpo	Antro			Posi- tivo	%	Corpo		Antro		Corpo	Antro	Corpo		Antro		Corpo	Antro
							Intens	Dist	Intens	Dist			Posi- tivo	%	Posi- tivo	%		
1	-	-	moderada	-	41	11.23	3	3	3	4	320	92	27	5.06	123	33.06	2/2	2/2
2	-	-	leve	-	15	4.4	2	3	2	2	*	19	29	8.26	43	8.98	2/3	2/3
3	-	-	leve	+ antro	98	20.29	2	3	2	3	68	107	30	12.99	26	11.16	3/2	3/3
4	-	-	leve	-	59	15.61	3	3	3	3	41	66	43	16.23	41	10.46	2/1	2/2
5	-	-	leve	+ antro	63	14.29	2	3	3	3	47	40	58	19.4	119	26.74	2/3	2/1
6	-	-	leve	-	60	16.53	3	3	3	3	*	92	108	34.39	98	34.27	2/1	2/1
7	-	-	leve	-	0	0	3	3	3	1	20	23	27	9.31	22	7.72	3/2	2/2
8	atrofia + MI	atrofia + MI	moderada	+ antro	0	0	2	3	3	3	74	53	62	27.56	44	14.62	2/3	2/3
9	-	-	leve	+ antro	14	3.92	4	4	3	4	84	92	25	7.51	89	30.8	2/3	3/2
10	-	-	moderada	+ antro	0	0	3	3	3	3	72	68	16	7.34	*	*	2/3	2/3
11	atrofia + MI	-	leve	-	59	23.14	2	2	2	3	140	94	*	*	51	24.29	2/2	3/2
12	-	-	leve	+	0	0	2	3	2	3	48	não	23	4.6	25	7.8	2/3	1/1
13	-	-	leve	-	70	25.9	2	3	2	2	10/50	50/50	18	3.6	22	9.5	2/4	2/4 basal
14	-	-	leve	-	57	15.5	2	1	3	2	5	50/10	20	13.3	28	20.7	2/4	1/2
15	-	-	leve	-	120	27.8	2	1	2	2	5	5	21	14	25	13.5	3/4 basal	1/3
16	-	-	leve	+	89	14.3	3	2	2	2	70	80	30	13.4	40	16.2	2/4	1/3

continua

Tabela Geral de Observações 3 (conclusão)

Controles	Histologia MI		Gastrite	H. pylori	Gastrina - Antro		Caspase 3				CD3		Ki-67				Bcl-2	
	Corpo	Antro					Corpo		Antro		Corpo	Antro	Corpo		Antro		Corpo	Antro
					Positivo	%	Intens	Dist	Intens	Dist			Positivo	%	Positivo	%		
17	-	-	leve	-	86	22.9	3	2	3	2	35	30	28	12.5	38	26.2	3/4	2/2
18	-	-	moderada	+	35	14.4	3	3	3	3	20	5	20	22.5	30	12	3/3	2/2
19	-	-	leve	-	35	15.2	2	3	2	3	40	30	60	18.6	42	30.4	3/4	1/2
20	-	-	leve	-	98	18.7	2	3	2	3	45	28	40	10.8	48	39.7	2/3	2/2
21	-	-	moderada	+	60	16.2	2	2	2	2	20	5	15	12.4	28	17.8	4/3	3/3
22	-	-	moderada	+	0	0	1	1	1	2	15	20	17	10.8	18	15.9	2/2	2/3
23	-	-	leve	-	55	16	3	3	3	3	12	13	28	9.85	25	9.8	3/2	3/2
24	-	-	leve	+	100	13.6	3	3	3	3	20	31	25	9.32	28	15.6	4/3	3/3
25	-	-	leve	-	70	21.4	3	3	4	3	25	21	28	18.9	22	9.6	3/3	2/3
26	-	-	moderada	+	0	0	4	3	4	3	23	15	28	16.6	32	25.4	4/3	3/3
27	-	-	leve	-	95	20.2	3	3	4	3	21	18	18	11.5	22	15.4	2/3	3/2
28	-	-	leve	-	110	16.8	3	3	4	4	15	14	19	13.1	31	18.4	3/3	2/3
29	-	-	moderada	+	120	17.9	3	3	4	4	20	10	16	10.5	47	34.6	4/2	3/2
30	-	-	leve	-	155	21.4	3	3	3	3	30	40	12	9.2	10	6.8	3/3	2/3
31	-	-	moderada	+	115	20.3	3	3	3	3	16	25	35	23.5	22	14.3	3/2	3/2
32	-	-	leve	-	110	25	3	3	3	4	15	18	25	11	50	27.9	2/3	3/2

9 Referências

Adams TD, Gress RE, Smith SC, Halverson RC, Simper SC, Rosamond WD, Lamonte MJ, Stroup AM, Hunt SC. Long-term morality after gastric bypass surgery. *N Engl J Med*. 2007;357(8):753-61.

Adams TD, Stroup AM, Gress RE, Adams KF, Calle EE, Smith SC, Halverson RC, Simper SC, Hopkins PN, Hunt SC. Cancer incidence and mortality after gastric bypass surgery. *Obesity (Silver Spring)*. 2009 Apr;17(4):796-802.

Anderi Jr E, Rossi FMB, Souza CK, Silva AL. Estudo da gastrinemia pré e pós-operatória em pacientes submetidos à gastroplastia vertical com banda e reconstrução em Y de Roux por obesidade mórbida. *Rev Col Bras Cir*. 2008;35(6):392-6.

Ashktorab H, Dashwood RH, Dashwood MM, Zaidi SI, Hewitt SM, Green WR, Lee EL, Daremipouran M, Nouraie M, Malekzadeh R, Smoot DT. H. pylori-induced apoptosis in human gastric cancer cells mediated via the release of apoptosis-inducing factor from mitochondria. *Helicobacter*. 2008 Dec;13(6):506-17.

Ashrafian H, Ahmed K, Rowland SP, Patel VM, Gooderham NJ, Holmes E, Darzi A, Athanasiou T. Metabolic surgery and cancer: protective effects of bariatric procedures. *Cancer*. 2011;117(9):1788-99.

Azagury D, Dumonceau JM, Morel P, Chassot G, Huber O. Preoperative work-up in asymptomatic patients undergoing Roux-em-Y gastric bypass: Is endoscopy mandatory? *Obes Surg*. 2006; 16(10):1304-11.

Babor R, Booth M: Adenocarcinoma of the gastric pouch 26 years after loop gastric bypass. *Obes Surg*. 2006;16:935-8.

Balsiger BM, Murr MM, Poggio JL, Sarr MG. Bariatric surgery. Surgery for weight control in patients with morbid obesity. *Med Clin North Am*. 2000; 84(2):477-89.

Baltasar A, Bou R, Arlandis F, Martinez R, Serra C, Bengochea M, Miro J. Vertical banded gastroplasty at more than 5 years. *Obes Surg.* 1998;8:29-34.

Beckman LM, Beckman TR, Earthman CP. Changes in gastroin- testinal hormones and leptin after Roux-en-Y gastric bypass pro- cedure: a review. *J Am Diet Assoc.* 2010;110(4):571-84.

Benotti PN, Forse RA. The role of gastric surgery in the multidisciplinary management of severe obesity. *Am J Surg.* 1995;169(3):361-367.

Bodey B. The significance of immunohistochemistry in the diagnosis and therapy of neoplasms. *Expert Opin Biol Ther.* 2002;2(4):371-93.

Braghetto I, Csendes A, Korn O, Gutierrez L, Brunet L, Lanzarini E, Mushle M, Valladares H, Rojas J. Laparoscopic resectional gastric bypass in patients with morbid obesity: experience on 112 consecutive patients. *J Gastrointest Surg.* 2011 Jan;15(1):71-80.

Brodin K, Nilsson G. Increase in duodenal tissue gastrin in dogs following antrectomy with gastroduodenostomy and after total gastrectomy with oesophagoduodenostomy. *Acta Physiol Scand.* 1982;116(2):113-20.

Brolin RE. Complications of surgery for severe obesity. *Gen Surg.* 2000; 17:55-61.

Bubendorf L, Sauter G, Moch H, Jordan P, Blochlinger A, Gasser TC, Mihatsch MJ. Prognostic significance of Bcl-2 in clinically localized prostate cancer. *Am J Pathol.* 1996;148:1557-1565.

Buchwald H, Oien DM. Metabolic/bariatric surgery worldwide 2008. *Obes Surg.* 2009; 19:1605-11.

Buchwald H, Williams SE. Bariatric surgery worldwide. *Obes Surg.* 2004;14:1157-64.

Calle EE, Kaaks R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Cancer*. 2004;4:579-591.

Capella RF, Capella JF, Mandac H, Nath P. Vertical banded gastroplasty-gastric bypass: preliminary report. *Obes Surg*. 1991;1:389-395.

Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schlüter C, Galle J, Gerdes J. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB-1 and MIB-3) detect proliferating cells in microwave-processed formallin-fixed paraffin sections. *J Pathol*. 1992;168(4):357-63.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Behavioral risk factor surveillance system survey data. Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention. Disponível em: www.cdc.gov/obesity/data/trends.html. Acesso em: January 28, 2010).

Chaves LCL, Faintuch J, Kahwage S, Alencar FA. Vitamin B1-related neurologic problems in weight-losing morbidly obese patients. *Clin Nutr*. 2002; 21(Suppl 1):18.

Chebib I, Beck PL, Church NG, Medlicott SA: Gastric pouch adenocarcinoma and tubular adenoma of the pylorus: a field effect of dysplasia following bariatric surgery. *Obes Surg*. 2007;17:843-846.

Chetty R, Gatter K. CD3: Structure, function and the role of immunostaining in clinical practice. *J Pathol*. 1994;173(4), 303-7.

Christou NV, Sampalis JS, Liberman M, Look D, Auger S, McLean AP, MacLean LD. Surgery decreases long-term mortality, morbidity, and health care use on morbidly obese patients. *Ann Surg*. 2004;240(3):416-23.

Clarke MR, Safatle-Ribeiro AV, Ribeiro U, Sakai P, Reynolds JC. Bcl-2 protein expression in gastric remnant mucosa and gastric cancer 15 or more years after partial gastrectomy. *Mod Pathol*. 1997;10:1021-7.

Colditz GAL. Economic costs of obesity. *Am J Clin Nutr.* 1992;55(Suppl 2):503S-507S.

Consensus Development Conference Panel. Gastrointestinal surgery for severe obesity. *Ann Intern Med.* 1991;115:956-61.

Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process - first American Cancer Society award lecture on cancer epidemiology and prevention. *Cancer Res.* 1992;52:6735-40.

Corsini DA, Simoneti CA, Moreira G, Lima SE Jr, Garrido AB. Cancer in the excluded stomach 4 years after gastric bypass. *Obes Surg.* 2006 Jul;16(7):932-4.

Csendes A, Burdiles P, Papapietro K, Diaz JC, Maluenda F, Burgos A, Rojas J. Results of gastric bypass plus resection of the distal excluded gastric segment in patients with morbid obesity. *J Gastrointest Surg.* 2005;9(1):121-31.

Cummings DE, Weigle DS, Frayo RS, Breen PA, Ma MK, Dellinger EP, Purnell JQ. Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *N Engl J Med.* 2002;346 (21): 1623-30.

De Maria EJ. Bariatric surgery for morbid obesity. *N Engl J Med.* 2007;356:2176-83.

De Moura EG, Martins BC, Lopes GS, Orso IR, de Oliveira SL, Galvão Neto MP, Santo MA, Sakai P, Ramos AC, Garrido Júnior AB, Mancini MC, Halpern A, Cecconello I. Metabolic improvements in obese type 2 diabetes subjects implanted for 1 year with an endoscopically deployed duodenal-jejunal bypass liner. *Diabetes Technol Ther.* 2012 Feb;14(2):183-9.

De Roover A, Detry O, Leval L, Coimbra C, Desalve C, Honore P, Meurisse M. Report of two cases of gastric cancer after Roux-en-Y gastric bypass and gastrointestinal stroma tumor (GIST) after vertical banded gastroplasty. *Obes Surg.* 2006; 16:928-931.

- Diebold J, Baretton G, Felchner M, Meier W, Dopfer K, Schmidt M, Lohrs U. Bcl-2 expression, p53 accumulation and apoptosis in ovarian carcinomas. *Am J Clin Pathol.* 1996;105:341-9.
- Erim T, Cruz-Correa MR, Szomstein S, Velis E, Rosenthal R. Prevalence of *Helicobacter pylori* seropositivity among patients undergoing bariatric surgery: a preliminary study. *World J Surg.* 2008; 32:2021-5.
- Erkan G, Gonul II, Kandilci U, Dursun A. Evaluation of apoptosis along with BCL-2 and Ki-67 expression in patients with intestinal metaplasia. *Pathol Res Pract.* 2012; 208(2); 89-93.
- Escalona A, Guzman S, Ibanez L, Meneses L, Huete A, Solar A. Gastric cancer after Roux-en-Y gastric bypass. *Obes Surg.* 2005;15(3):423-7.
- Faintuch J, Garrido Jr AB. Questões fisiológicas sobre o marca-passo gástrico. *Boletim Cir Obes.* 2002;3(1):4-5.
- Faintuch J, Gil SZ, Ribeiro Jr N, Garrido Jr AB, Gama-Rodrigues JJ. Nutritional deficiencies after gastric bypass for morbid obesity. *Clin Nutr.* 2002;21(Suppl 1):68.
- Faintuch J, Ishida RK, Jacabi M, Ribeiro AS, Kuga R, Sakai P, Barbeiro HV, Barbeiro DF, Soriano FG, Cecconello I. Increased gastric cytokine production after Roux-en-Y gastric bypass for morbid obesity. *Arch Surg.* 2007;142(10):962-8.
- Faintuch J, Machado PLRC, Rudner MA, Matsuda M, Garrido Jr AB, Gama-Rodrigues JJ. Quality of life after bariatric intervention. *Obes Surg.* 2002;12:487.
- Faintuch J, Matsuda M, Cruz ME, Silva MM, Teivelis MP, Garrido AB Jr, Gama-Rodrigues JJ. Severe protein-calorie malnutrition after bariatric procedures. *Obes Surg.* 2004;14:175-81.

Faintuch J, Rudner MA, Machado PLRC, Matsuda M, Garrido Jr AB, Gama-Rodrigues JJ. Influence of bariatric surgery on comorbidities and complications. *Obes Surg.* 2002;12:486.

Faria MHG, Patrocínio RGSV, Moraes Filho MO, Rabenhorst SHB. Expressão das proteínas BCL-2 e BAX em tumores astrocíticos humanos. *J Bras Patol Med Lab.* 2006;42(4):271-278.

Fisher SG, Davis F, Nelson R, Weber L, Goldberg J, Haenszel W. A cohort study of stomach cancer risk in men after gastric surgery for benign disease. *J Natl Cancer Inst.* 1993;85(16):1303-10.

Flegal KM, Carroll MD, Ogden CL, Johnson CL. Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2000. *JAMA.* 2002;288:1723-7.

Flickinger EG, Sinar DR, Pories WJ, Sloss RR, Park HK, Gibson JH. The bypassed stomach. *Am J Surg.* 1985;149:151-6.

Flum D, Dellinger E. Impact of gastric bypass operation on survival: a population-based analysis. *J Am Coll Surg.* 2004;199:543-51.

Fobi MA, Chicola K, Lee H. Access to the bypassed stomach after gastric bypass. *Obes Surg.* 1998;8:289-95.

Forsell P, Hellers G. The Swedish adjustable gastric banding (SAGB) for morbid obesity: 9-year experience and a 4-year follow-up of patients operated with a new adjustable band. *Obes Surg.* 1997;7:345-51.

Frezza EE, Wachtel MS, Ewing BT. The impact of morbid obesity on the state economy: an initial evaluation. *Surg Obes Relat Dis.* 2006; 2(5):504-8.

Ganong WF. *Fisiologia Médica.* 17. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998. 578 p.

Garrido Jr AB. Situações especiais: tratamento da obesidade mórbida. In: Halpern A. Obesidade. São Paulo: Lemos Editorial; 1998. p. 331-40.

Gentileschi P, Kini S, Catarci M, Gagner M. Evidence based medicine: open and bariatric surgery. *Surg Endosc*. 2002;16(5):736-44.

Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J Clin*. 2005;55(3):178-94.

Gil SZ, Faintuch J, Matsuda M, Garrido Jr AB, Silva MM, Gama-Rodrigues JJ. Early and late complications after gastroplasty with bypass. *Obes Surg*. 2002;12:486.

Goitein D, Gagné DJ, Papasavas PK, McLean G, Foster RG, Beasley HS, Caushaj PF. Percutaneous computed tomography-guided gastric remnant access after laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass. *Surg Obes Relat Dis*. 2006;2(6):651-5.

Gomes MB, Giannella Neto D, De Mendonça E, Tambascia MA, Fonseca RM, Réa RR, Macedo G, Modesto Filho J, Schmid H, Bittencourt AV, Cavalcanti S, Rassi N, Faria M, Pedrosa H, Dib SA. Prevalência de sobrepeso e obesidade em pacientes com diabetes mellitus do tipo 2 no Brasil: Estudo multicêntrico nacional. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2006;50(1):136-44.

Gregory RA, Tracy HJ. The constitution and properties of two gastrins extracted from hog antral mucosa. *Gut*. 1964; 5:103-14.

Griffen WO Jr., Young VL, Stevenson CC. A prospective comparison of gastric and jejunoileal bypass procedures for morbid obesity. *Ann Surg*. 1977;186:500-9.

Grivicich I, Regner A, Rocha AB. Morte celular por apoptose. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 2007; 53(3):335-343.

Hackert T, Dietz M, Tjaden C, Sieg A, Buchler MW, Schmidt J. Band erosion with gastric cancer. *Obes Surg*. 2004; 14:559-561.

Hallen JW, Leeman MF, Richardson JD. Esophageal carcinoma following bariatric procedures. *JSLs*. 2004; 8(4):372-375.

Harper JL, Beech D, Tichansky DS, Madan AK. Cancer in the bypassed stomach presenting early after gastric bypass. *Obes Surg*. 2007 Sep;17(9):1268-71.

Hatz RA, Meimarakis G, Bayerdorffer E, Stolte M, Kirchner T, Enders G. Characterization of lymphocytic infiltrates in *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *Scand J Gastroenterol*. 1996;31:222-8.

Hedberg J, Hedenström H, Nilsson S, Sundbom M, Gustavsson S. Role of gastric acid in stomal ulcer after gastric bypass. *Obes Surg*. 2005 Nov-Dec;15(10):1375-8.

Hunt RH, Malfertheiner P, Yeomans ND, Hawkey CJ, Howden CW. Critical issues in the pathophysiology and management of peptic ulcer disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1995;7(7): 685-99.

Iamaroon A, Khemaleelekul U, Pongsiwit S, Pintong J. Coexpression of p53 and Ki67 and lack of EBV expression in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol. Med*. 2004; 33(1): 30-6.

Ichihara F, Kono K, Takahashi A, Kawaida H, Sugai H, Fujii H. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gastric and esophageal cancers. *Clin Cancer Res*. 2003;9(12):4404-8.

Inoue H, Rubino F, Shimada Y, Lindner V, Inoue M, Riegel P, Marescaux J. Risk of gastric cancer after Roux-en-Y gastric bypass. *Arch Surg*. 2007;142(10):947-53.

Ishida RK, Faintuch J, Paula AM, Risttori CA, Silva SN, Gomes ES, Mattar R, Kuga R, Ribeiro AS, Sakai P, Barbeiro HV, Barbeiro DF, Soriano FG, Cecconello I. Microbial flora of the stomach after gastric bypass for morbid obesity. *Obes Surg*. 2007;17(6):752-8. Erratum in: *Obes Surg*. 2007;17(7):996.

- Ishida RK. Flora bacteriana e citocinas pró-inflamatórias no trato digestório exclusivo após cirurgia de derivação em Y de Roux para obesidade mórbida [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 73 p.
- Itoh M, Chiba H, Noutomi T, Takada E, Mizuguchi J. Cleavage of Bax and Bcl-2 (L) during carboplatin-mediated apoptosis in squamous cell carcinoma cell line. *Oral Oncol.* 2000;36(3):277-85.
- Jaffer S, Bleiweiss IJ. Beyond hematoxylin and eosin: the role of immunohistochemistry in surgical pathology. *Cancer Invest.* 2004;22(3):445-65.
- Jain PK, Ray B, Royston CM. Carcinoma in the gastric pouch years after banded gastroplasty. *Obes Surg.* 2003; 13:136-137.
- Joshi SN, Gardner JD. Gastrin and colon cancer: a unifying hypothesis. *Dig Dis.* 1996; 14:334-44.
- Kelly T, Yang W, Chen CS, Reynolds K, He J. Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. *Int J Obes (Lond).* 2008, 32:1431-7.
- Khitin L, Roses RE, Birkett DH. Cancer in the gastric remnant after gastric bypass: a case report. *Curr Surg.* 2003;60(5):521-3.
- Kodaira MS, Escobar MS, Escobar SMU, Grisi S. Aspectos epidemiológicos do *Helicobacter pylori* na infância e adolescência. *Revista Saúde Pública.* 2002;36(3): 356-69.
- Kondo K. Duodenogastric reflux and gastric stump carcinoma. *Gastric Cancer.* 2002;5(1):16-22.
- Kopin AS, Lee YM, McBride EW, Miller LJ, Lu M, Lin HY, Kolakowski LF Jr, Beinborn M. Expression cloning and characterization of the canine parietal cell gastrin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992; 89(8):3605-9.

- Kopp R, Diebold J, Dreier I, Cramer C, Glas J, Baretton G, Jauch KW. Prognostic relevance of p53 and Bcl-2 immuno- reactivity for early invasive pT1/pT2 gastric carcinomas. *Surg Endosc.* 2005;19: 1507-12.
- Korman MG, Soveny C, Hansky J. Extragastric gastrin. *Gut.* 1972;13(5):346-8.
- Koshida Y, Saegusa M, Okayasu I. Apoptosis, cell proliferation and expression of Bcl-2 and bax in gastric carcinomas: immunohistochemical and clinicopathological study. *Br J Cancer.* 1997;75(3): 367-73.
- Kubo A, Corley DA. Body massindex and adenocarcinomas of the esophagus or gastric cardia: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006; 15:872-8.
- Kuga R, Safatle-Ribeiro AV, Faintuch J, Ishida RK, Furuya CK Jr, Garrido AB Jr, Cecconello I, Ishioka S, Sakai P. Endoscopic findings in the excluded stomach after Roux-en-Y gastric bypass surgery. *Arch Surg.* 2007;142(10):942-6.
- Kuruba R, Jawad M, Karl RC, Murr MM. Technique of resection of esophageal adenocarcinoma after Roux-em-Y gastric bypass and literature review of esophagogastric tumors after bariatric procedures. *Obes Surg Relat Dis.* 2009; 5:576-81.
- La Vecchia C, Negri E, D'Avanzo B, Moller H, Franceschi S. Partial gastrectomy and subsequent gastric cancer risk. *J Epidemiol Community Health.* 1992;46(1):12-4.
- Lauwers GY, Scott GV, Karpeh MS. Immunohistochemical evaluation of Bcl-2 protein expression in gastric adenocarcinomas. *Cancer.* 1995; 75:2209-13.
- Le Roux CW, Bloom SR. Why do patients lose weight after Roux-en-Y gastric bypass? *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(1):591-2.

Leme PLS, Malheiros CA, Rodrigues FCM, Zanqui AB, Carvalho DLM, Rahal F. Gastroduodenal exclusion and truncalvagotomy: weight and seric gastrin alterations. Experimental study on rats. *Rev Col Bras Cir.* 2003;30(6):416-23.

Leong A S-Y, Wright J. The contribution of immunohistochemical staining in tumor diagnosis. *Histopathology.* 1987;11(12):1295-305.

Li Y-H, Wang C, Meng K, Chen LB, Zhou X-J. Influence of surviving and caspase 3 on cell apoptosis and prognosis in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2004;10(13):1984-8.

Lockshin RA, Beaulaton J. Programmed cell death. *Life Sci.* 1974;15(9):1549-65.

Lord RV, Edwards PD, Coleman MJ. Gastric cancer in the bypassed segment after operation for morbid obesity. *Aust N Z J Surg.* 1997;67(8):580-2.

Ludwig DS, Pollack HA. Obesity and the economy: from crisis to opportunity. *JAMA.* 2009; 301(5):533-5.

MacGregor A. The story of obesity surgery. American Society for Metabolic & Bariatric Surgery; 2002, updated 2005. Disponível em: <http://www.asmb.org/html/story-of-obesity-surgery/chapter1.html>.

Macluskey M, Chandrachud LM, Pazouki S, Green M, Chisholm, DM, Ogden GR, Shor AM. Apoptosis, proliferation, and angiogenesis in oral tissues. Possible relevance tumour progression. *J Pathol.* 2000; 191(4): 368-75.

Madan AK, Lanier BJ, Tichansky DS, Ternovits CA. Laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass with subtotal gastrectomy. *Obes Surg.* 2005;15(9):1332-5.

Mann T, Tomiyama AJ, Lew AM, Samuels B, Chatman J. Medicare's search for obesity treatments: diets are not the answer. *Am Psychol.* 2007;62(3):220-33.

Martin LF, Hunter SM, Lauve RM, O'Leary JP. Severe obesity: expensive to society, frustrating to treat, but important to confront. *South Med J*. 1995;88(9):895-902.

Martin LF. The biopsychological characteristics of people seeking treatment for obesity. *Obes Surg*. 1999;9:235-43.

Mason EE, Ito C. Gastric bypass surgery in obesity. *Surg Clin North Am*. 1967;47:1345-52.

Mason EE. Gastric surgery for morbid obesity. *Surg Clin North Am*. 1992;72:501-13.

Menéndez P, Padilla D, Villarejo P, Menéndez JM, Lora D. Does bariatric surgery decrease gastric cancer risk? *Hepatogastroenterology*. 2012;59(114):409-12.

Menezes HL, Jucá MJ, Gomes EG, Nunes BL, Costa HO, Matos D. Analysis of the immunohistochemical expressions of p53, bcl-2 and Ki-67 in colorectal adenocarcinoma and their correlations with the prognostic factors. *Arq Gastroenterol*. 2010;47(2):141-7.

Misiewicz JJ. Current insights in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1995;7: 701-3.

Miwa K, Hattori T, Miyazaki I. Duodenogastric reflux and foregut carcinogenesis. *Cancer*. 1995;75(Suppl.6):1426-32.

Müller W, Schneiders A, Hommel G, Gabbert HE. Prognostic value of Bcl-2 expression in gastric cancer. *Anticancer Res*. 1998; 18: 4699-704.

Munshi HG, Ghosh S, Mukhopadhyay S, Wu YI, Sen R, Green KJ, Stack MS, Sharon S. Proteinase suppression by E-cadherin-mediated cell-cell attachment in premalignant oral keratinocytes. *J Biol Chem*. 2002; 277(41):38159-67.

National Institutes of Health: Implications of obesity. National Institutes of Health consensus development conference statement. *Ann Intern Med.* 1985; 103:1073-7.

NIH Consensus Development Conference. Gastrointestinal surgery for severe obesity. Consensus statement 1991. *Am J Clin Nutr.* 1992; 55(Suppl 2):615S-619S.

North American Association for the Study of Obesity (NAASO) and National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI). The Practical Guide: Identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity in adults. NIH Publication #00-4084, Oct 2000.

Olvera M, Wickramasinghe K, Brynes R, Bu X, Ma Y, Chandrasoma P. Ki67 expression in different epithelial types in columnar lined oesophagus indicates varying levels of expanded and aberrant proliferative patterns. Article first published online: 25 Jul 2005. Doi: 10.1111/j.1365-2559.2005.02200.x

O'Malley F, Pinder S. *Breast Pathology*. 1st. Ed. Elsevier; 2006.

Papakonstantinou A, Moustafellos P, Terzis I, Stratopoulos C, Hadjiyannakis EI. Gastric cancer occurring after vertical banded gastroplasty. *Obes Surg.* 2002; 12(1): 118-120.

Parolin MB, Reason IJM. Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares. *Arq Gastroenterol.* 2001;38(2):138-44.

Parton M, Krajewski S, Smith I, Krajewska M, Archer C, Naito M, Ahern R, Reed J, Dowsett M. Coordinate expression of apoptosis-associated proteins in human breast cancer before and during chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 2002;8(7):2100-8.

Patterson EJ, Urbach DR, Swanstrom LL. A comparison of diet and exercise therapy versus laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass surgery for morbid obesity: a decision analysis model. *J Am CollSurg.* 2003;196:379-84.

Peeters A, Barendregt JJ, Willekens F, Mackenbach JP, Al Mamun A, Bonneux L; NEDCOM, the Netherlands Epidemiology and Demography Compression of Morbidity Research Group. Obesity in adulthood and its consequences for life expectancy: a life-table analysis. *Ann Intern Med.* 2003; 138(1):24-32.

Pezzella F, Turley H, Kuzu I, Tungekar MF, Dunnill MS, Pietce CB, Harris A, Gatter KC, Mason DY. Bcl-2 protein in non- small cell lung carcinoma. *N Engl J Med.* 1993; 329: 690-694.

Pi-Sunyer FX, Aronne LJ, Heshmati HM, Devin J, Rosenstock J, for the RIONASG. Effect of rimonabant, a cannabinoid-1 receptor blocker, on weight and cardiometabolic risk factors in overweight or obese patients: RIO-North America: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2006; 295:761-75.

Pope RM. Apoptosis as a therapeutic tool in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol.* 2002 Jul;2(7):527-35. Review.

Pories WJ, Swanson MS, Mac Donald KG, Long SB, Morris PG, Brown BM, Barakat HA, deRamon RA, Israel G, Dolezal JM, et al. Who would have thought it? An operation proves to be the most effective therapy for adult onset diabetes mellitus. *Ann Surg* 1995;222(3):339–50; discussion 350–2.

Pournaras DJ, Le Roux CW. Obesity, gut hormones and bariatric surgery. *World J Surg.* 2009; 33(10): 1983-8.

Prospective Studies Collaboration, Whitlock G, Lewington S, Sherliker P, Clarke R, Emberson J, Halsey J, Qizilbash N, Collins R, Peto R. Body-mass index and cause specific mortality in 900 000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies. *Lancet* 2009, 373:1083-96.

Raijman I, Strother SV, Donegan WL. Gastric cancer after gastric bypass for obesity. Case report. *J ClinGastroenterol.* 1991;13(2):191-4.

- Ramaswamy A, Lin E, Ramshaw BJ, Smith CD. Early effects of *Helicobacter pylori* infection in patients undergoing bariatric surgery. Arch Surg. 2004; 139(10):1094-6.
- Ramos-Vara JA. Technical aspects of immunohistochemistry. Vet Pathol. 2005;42(4): 405-26.
- Ravi DK, Ramadas K, Mathew BS, Panikkar KR, Nair MK, Pillai MR. Apoptosis, angiogenesis and proliferation: trifunctional measure of tumor response to radiotherapy for oral cancer. Oral Oncol. 2001; 37(2): 164-71.
- Reeves GK, Pirie K, Beral V, Green J, Spencer E, Bull D; Million Women Study Collaboration. Cancer incidence and mortality in relation to body mass index in the Million Women Study: cohort study. BMJ. 2007;335:1134.
- Renahan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. Lancet. 2008;371:569-78.
- Rothman KJ. BMI-related errors in the measurement of obesity. Int J Obes (Lond). 2008;32 Suppl 3:S56-9. doi: 10.1038/ijo.2008.87
- Rubino F, Gagner M, Gentileschi P, Kini S, Fukuyama S, Feng J, Diamond E. The early effect of the Roux-en-Y gastric bypass on hormones involved in body weight regulation and glucose metabolism. Ann Surg. 2004;240(2):236-42
- Saegusa M, Takano Y, Hashimura M, Okayasu I, Shiga J. The possible role of Bcl-2 expression in the progression of tumors of the uterine cervix. Cancer. 1995; 76: 2297-303.
- Safatle-Ribeiro AV, Kuga R, Iriya K, Ribeiro Jr U, Faintuch J, Ishida RK, Corbett CE, Garrido AB Jr, Ishioka S, Sakai P. What to expect in the excluded stomach mucosa after vertical banded Roux-en-Y gastric bypass for morbid obesity. J Gastrointest Surg. 2007; 11(2):133-7.

Safatle-Ribeiro AV, Ribeiro Jr U, Reynolds JC. Gastric stump cancer: what is the risk? Dig Dis. 1998;16(3):159–68.

Safatle-Ribeiro AV, Ribeiro Jr. U, Clarke MR, Sakai P, Gama-Rodrigues JJ, Safatle NF, Garrido Jr. AB, Reynolds JC. Relationship between persistence of *Helicobacter pylori* and dysplasia, intestinal metaplasia, atrophy, inflammation, and cell proliferation following partial gastrectomy. Dig Dis Sci 1999;44: 243-252.

Safatle-Ribeiro AV, Ribeiro Jr U, Sakai P, Clarke MR, Fylyk SN, Ishioka S, Gama-Rodrigues J, Finkelstein SD, Reynolds JC. Integrated p53 histopathologic/genetic analysis of premalignant lesions of the esophagus. Cancer Detect Prev. 2000; 24(1):13-23.

Safer DJ. Diet, behavior modification, and exercise: a review of obesity treatments from long-term perspective. South Med J. 1991;84(12):1470-4.

Sakai P, Kuga R, Safatle-Ribeiro AV, Faintuch J, Gama-Rodrigues JJ, Ishida RK, Furuya CK Jr, Yamamoto H, Ishioka S. Is it feasible to reach the bypassed stomach after Roux-en-Y gastric bypass for morbid obesity? The use of the double-balloon enteroscope. Endoscopy. 2005; 37:566-9.

Sallet JA, Marchesini JB, Paiva DS, Komoto K, Pizani CE, Ribeiro ML, Miguel P, Ferraz AM, Sallet PC. Brazilian multicenter study of the intragastric balloon. Obes Surg. 2004;14(7):991-8.

Salvadori S, Gansbacher B, Pizzimenti AM, Zier KS. Abnormal signal transduction by T cells of mice with parental tumors is not seen in mice bearing Il-2 secreting tumors. J Immunol. 1994;153(11), 5176-82.

Sauerland S, Angrisani L, Belachew M, Chevallier JM, Favretti F, Finer N, Fingerhut A, Garcia Caballero M, Guisado Macias JA, Mittermair R, Morino M, Msika S, Rubino F, Tacchino R, Weiner R, Neugebauer EA; European Association

for Endoscopic Surgery. Obesity surgery: evidence-based guidelines of the European Association for Endoscopic Surgery (EAES). *Surg Endosc* 2005;19(2):200-21.

Scopa CD, Vagianos C, Kardamakis D, Kourelis TG, Kalofonos HP, Tsamandas AC. Bcl-2/bax ratio as a predictive marker for therapeutic response to radiotherapy in patients with rectal cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2001;9: 329-334.

Scopinaro N, Adami GF, Marinari GM, Gianetta E, Traverso E, Friedman D, Camerini G, Baschieri G, Simonelli A. Biliopancreatic diversion. *World J Surg*. 1998; 22(9): 936-46.

Senderowicz AM. Targeting cell cycle and apoptosis for the treatment of human malignancies. *Curr Opin Cell Biol*. 2004;16(6):670-8.

Shahriari A, Hinder RA, Stark ME, Williams HJ, Lange SM. Recurrent severe gastrointestinal bleeding complicating treatment of morbid obesity. *J Clin Gastroenterol*. 2000;31:19-22.

Shiotani A, Iishi H, Ishiguro S, Tatsuta M, Nakae Y, Merchant JL. Epithelial cell turnover in relation to ongoing damage of the gastric mucosa in patients with early gastric cancer: increase of cell proliferation in pre-malignant lesions. *J Gastroenterol*. 2005;40(4):337-44.

Silecchia G, Catalano C, Gentileschi P, Elmore U, Restuccia A, Gagner M, Basso N. Virtual gastroduodenoscopy: a new look at the bypassed stomach and duodenum after laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass for morbid obesity. *Obes Surg*. 2002;12:39-48.

Silva MM, Seragine AC, Matsuoka VF, Silva AR, Reimão R, Faintuch J, Garrido Jr AB. Sleep aberrations in bariatric surgery candidates. *Obes Surg*. 2002; 12:487.

- Sinning C, Schaefer N, Standop J, Hirner A, Wolff M. Gastric stump carcinoma—epidemiology and current concepts in pathogenesis and treatment. *Eur J Surg Oncol*. 2007;33(2):133-9.
- Sjostrom L, Gummesson A, Sjostrom CD, Narbro K, Peltonen M, Wedel H, Bengtsson C, Bouchard C, Carlsson B, Dahlgren S, Jacobson P, Karason K, Karlsson J, Larsson B, Lindroos AK, Lönroth H, Näslund I, Olbers T, Stenlöf K, Torgerson J, Carlsson LM; Swedish Obese Subjects Study. Effects of bariatric surgery on cancer incidence in obese patients in Sweden (Sweden Obese Subjects Study): a prospective, controlled intervention trial. *Lancet Oncol*. 2009;10(7):653-62.
- Smith EL, Hill RL, Lehman JR, Leikowitz RJ, Hor RJ, White A. *Bioquímica: mamíferos*. Tradução Patricia Lydie. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. 620 p.
- Smith SC, Goodman GN, Edwards CB. Roux-en-Y gastric bypass. A 7-year retrospective review of 3855 patients. *Obes Surg*. 1995; 5:314-318.
- Soini Y, Paakko P, Letho V-P. Histopathological evaluation of apoptosis in cancer. *Am J Pathol*. 1998;153: 1041-53.
- Stahel RA, Zangemeister-Wittke U. Antisense oligonucleotides for cancer therapy – an overview. *Lung Cancer*. 2003.;41 Suppl 1:S81-8.
- Stermmermann G.; Heffelfinger SC, Noffsinger A, Hui YZ, Miller MA, Fenoglio-Preiser CM. The molecular biology of esophageal and gastric cancer and their precursors: oncogenes, tumor suppressor genes, and growth factors. *Hum Pathol*. 1994;25:968-81.
- Stroh C, Hohmann U, Urban H, Manger T. Gastric cancer after laparoscopic adjustable gastric banding. *Obes Surg*. 2008; 18:1200-2.

Stunkard AS, Wadden TA. Psychological aspects of severe obesity. *Am J Clin Nutr.* 1992;55(Suppl2):524S-532S.

Sun C, Jackson CS, Reeves M, Rendon S. Metastatic adenocarcinoma of the gastric pouch 5 years after Roux-en-Y gastric bypass. *Obes Surg.* 2008; 18:345-348.

Sundbom M, Hedenstrom H, Gustavsson S. Duodenogastric bile reflux after gastric bypass: a cholescintigraphic study. *Dig Dis Sci.* 2002;47:1891-6.

Sundbom M, Holdstock C, Engstrom BE. Early changes in ghrelin following roux-en-y gastric bypass: Influence of vagal nerve functionality? *Obes Surg.* 2007;17(3):304-310.

Sundbom M, Nyman R, Hedenstrom H, Gustavsson S. Investigation of the excluded stomach after Roux-en-Y gastric bypass. *Obes Surg.* 2001;11:25-7.

Swenson MJ, Reec WO. Dukes. *Fisiologia dos animais domésticos.* 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 856 p.

Tahara E. Growth factors and oncogenes in human gastrointestinal carcinomas. *Cancer Res Clin Oncol.* 1990;116:121-31.

Thomé JA, Fett-Conte AC, Cordeiro JA. Avaliação morfológica e imuno-histoquímica de linfomas gástricos primários. *J Bras Patol Med Lab.* 2005; 41(2):117-24.

Toftgaard C. Gastric cancer after peptic ulcer surgery. A historic prosoective cohort investigation. *Ann Surg.* 1989;210(2): 159-164.

Trincado MT, del Olmo JC, Garcia Castano J, Cuesta C, Blanco JI, Awad S, Carbajo MA. Gastric pouch carcinoma after gastric bypass for morbid obesity. *Obes Surg.* 2005;15(8):1215-7.

- Tsamandas AC, Kardamakis D, Petsas T, Zolota V, Vassiliou V, Makatsoris, T, Kalofonos HP, Vagianos C, Scopa CD. Bcl-2, bax and p53 expression in rectal adenocarcinoma. Correlation with classic pathologic prognostic factors and patients' outcome. In Vivo 2007;21: 113-8.
- Vaira D, Ricci C, Perna F, Gatta L, Tampieri A, Miglioli M. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: which is the best test? The stool test. Dig Liver Dis. 2000 Dec;32 Suppl 3:S193-5.
- Vernau W, Moore PF. An immunophenotypic study of canine leukemias and preliminary assessment of clonality by polymerase chain reaction. Vet Immunol Immunopathol. 1999;69(2-4):145-64.
- Vieira FLP, Guimarães MAM, Aarestrup, FM, Vieira BJ. Avaliação do índice proliferativo pela expressão de Ki-67 em amostras de carcinoma de células escamosas da mucosa bucal e correlação com a graduação histológica. Odontol Clín-Cient. 2009; 8(4):359-363.
- VIGETEL, 2007. Disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/vigitel2007_final_web.pdf
- VIGETEL, 2009. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/vigitel_2009_preliminar_web_20_8_10.pdf
- Wadden TA, Sternberg JA, Letizia KA, Stunkard AJ, Foster GD. Treatment of obesity by very low calorie diet, behavior therapy, and their combination: a five-year perspective. Int J Obes. 1989;13 (suppl 2) 39-46.
- Watkins BJ, Blackmun S, Kuehner ME. Gastric adenocarcinoma after Roux-en-Y gastric bypass: access and evaluation of excluded stomach. Surg Obes Relat Dis. 2007;3(6):644-7.

Weiner R, Gutberlet H, Bockhorn H. Preparation of extremely obese patients for laparoscopic gastric banding by gastric-balloon therapy. *Obes Surg*. 1999; 9(3):261-4.

Whitlock G, Lewington S, Sherliker P, Clarke R, Emberson J, Halsey J, Qizilbash N, Collins R, Peto R; Prospective Studies Collaboration. Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies. *Lancet*. 2009;373:1083-96.

Wooley SC, Garner DM. Dietary treatments for obesity are ineffective. *Brit Med J*. 1994;309(6955):655-6.

World Health Organization. Obesity and Overweight Fact Sheet No 311. Geneva, Switzerland. WHO; 2011. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>.

Wyllie AH. Apoptosis: an overview. *Br Med Bull*. 1997;53(3):451-65.

Yamashita Y, Chung YS, Maeda K, Sawada T, Yoshikawa K, Mzekawa Z, Yamamoto T, Sowa M. Multiple early gastric stump carcinomas after gastrectomy for peptic ulcer. *Am J Gastroenterol*. 1998;93(9):1575-8.

Yang CS, Lee WJ, Wang HH, Huang SP, Lin JT, Wu MS. The influence of *Helicobacter pylori* on the development of gastric ulcer in symptomatic patients after bariatric surgery. *Obes Surg*. 2006;16(6):735-9.

Yang L, Wu DY, Xin Y. Down-regulation of caspase 3 expression in precancerous lesions and its relation to gastric carcinogenesis. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*. 2006;28(5):357-60. □

Yang P, Zhou Y, Chen B, Wan HW, Jia GQ, Bai HL, Wu XT. Overweight, obesity and gastric cancer risk: results from a meta-analysis of cohort studies. *Eur J Cancer*. 2009; 45(16):2867-2873.

Zafirellis K, Karameris A, Milingos N, Androulakis G. Molecular markers in gastric cancer: can p53 and Bcl-2 protein expressions be used as prognostic factors? *Anticancer Res.* 2005;25: 3629-36.

Zirak C, Lemaitre J, Lebrun E, Journe S, Carlier P. Adenocarcinoma of the pouch after silastic ring vertical gastropasty. *Obes Surg.* 2002; 12:693-4.

Apêndice

Epithelial Cell Turnover Is Increased in the Excluded Stomach Mucosa After Roux-en-Y Gastric Bypass for Morbid Obesity

Adriana V. Safatle-Ribeiro · Pedro A. Petersen ·
Dilson S. Pereira Filho · Carlos E. P. Corbett ·
Joel Faintuch · Robson Ishida · Paulo Sakai ·
Ivan Cecconello · Ulysses Ribeiro Jr.

Published online: 29 April 2013
© Springer Science+Business Media New York 2013

Abstract

Background Mucosal alterations after Roux-en-Y gastric bypass for morbid obesity have not been clearly evaluated. This study aims to analyze the mucosal alterations (proliferative status (Ki-67); apoptosis (caspase-3 and BCL-2); hormonal function (gastrin)) in the excluded stomach.

Methods Double-balloon enteroscopy was performed in 35 patients who underwent Roux-en-Y gastric bypass longer than 36 months. Multiple biopsies of the proximal pouch and the excluded gastric mucosa were collected. Gastric biopsies from 32 non-operated obese patients were utilized as controls. Endoscopic biopsies were cut from tissue blocks fixed in formalin and embedded in paraffin. Sections 4 µm thick were examined for immunoreexpression using the streptavidin biotin peroxidase method.

Results The two groups were comparable for age, gender, gastritis, intestinal metaplasia, and *Helicobacter pylori*. The mean number of positive gastrin cells was 55.5 (standard deviation (SD)=11.7) in the control group and 29.6 (SD=7.9) in the cases, $p=0.0003$. Ki-67 proliferative index in cases (body=24.7 %, antrum=24.9 %) was significantly higher compared to controls (body=15.0 % and antrum=17.7 %), $p=0.002$ and 0.01, respectively. Caspase-3 immunoreexpression was higher in the controls compared to

the excluded stomach (46 vs. 31 %), $p=0.02$. There was no statistical difference between CD3, CD8, and Bcl-2 immunoreexpressions in the control and cases.

Conclusions Cell proliferation is increased and apoptosis is downregulated in the excluded gastric mucosa compared to the non-operated obese controls. Alterations in cell turnover and in hormonal secretions in these conditions may be of relevance in long-term follow-up.

Keywords Bariatric surgery · Morbid obesity · Double-balloon endoscopy · Enteroscopy · Roux-en-Y gastric bypass · Ki-67 · Caspase-3 · Bcl-2 · Gastrin

Introduction

Morbid obesity incidence has increased worldwide leading to low quality of life expectancy in children, adolescents, and adults [1]. Surgical therapy offers the best long-term approach to treat morbid obesity with long limb vertical banded Roux-en-Y gastric bypass (RYGB) as the gold standard [2, 3]. However, currently, little is known regarding the long-term consequences of the procedure especially given that the technique hinders surveillance for possible mucosal alterations. This is because RYGB excludes the distal part of the stomach and the duodenum from the food transit, turning these areas unreachable to conventional endoscopy and therefore to surveillance. Double-balloon endoscopy (DBE) has partially solved this access problem as it can reach the excluded stomach endoscopically in 87.5 % of the cases [4]. Failing DBE, the available

A. V. Safatle-Ribeiro (✉) · P. A. Petersen · D. S. Pereira Filho ·
C. E. P. Corbett · J. Faintuch · R. Ishida · P. Sakai · I. Cecconello ·
U. Ribeiro Jr.
Departments of Gastroenterology and Pathology, University of São
Paulo School of Medicine, Rua Treze de Maio, 1954, Cj. 54,
São Paulo, SP, Brazil 01327-002
e-mail: adrisafateribeiro@terra.com.br

options for the remaining patients with unreachable excluded stomach are surgery, virtual gastroscopy, or percutaneous gastrostomy [5–7].

Some alterations have been reported to affect the excluded stomach of RYGB patients. A scintigraphy study evidenced duodenogastric bile reflux in 36 % of RYGB patients, suggesting that more than one third of them had their excluded stomach exposed to the potential harmful effects of bile. Indeed, it is possible that duodenal reflux of bile and pancreatic secretions without any buffering offered by food intake may, after decades, damage the gastric epithelium and lead to an increase gastric cancer risk [8]. Biopsies obtained through DBE revealed that the excluded stomach can be atrophic and colonized by *Helicobacter pylori*, both risk factors for gastric cancer [9, 10]. A positive correlation between cytokine levels and microbial invasion by *H. pylori* and other nonspecific bacteria was observed [11]. Additionally, overexpression of tumor necrosis factor alpha and transforming growth factor beta were seen in the excluded stomach [12]. Cases of gastric cancer developed in the bypassed stomach have been described after RYGB, and the diagnosis of cancer varies from 4 to 22 postoperative years [13–20].

Thus, we examined whether the excluded stomach mucosa of patients who underwent RYGB longer than 36 months already contained molecular alterations. By using immunohistochemistry, we tested a panel of molecular markers such as Ki-67 for proliferation rate, caspase-3 and Bcl-2 for apoptosis; CD3 and CD8 for inflammatory response, and gastrin for hormone function. Ultimately, we

aimed to validate some molecular markers which could be used in the early detection of possible alterations of the excluded stomach mucosa.

Materials and Methods

Patients

The study was approved by the Hospital Ethics Committee of the University of São Paulo School of Medicine, Brazil. Informed consent was obtained from all patients.

Sixty-seven patients aged 18–65 years old were referred to take part in the study by the Gastrointestinal Surgery Unit of the Department of Gastroenterology of the University of São Paulo School of Medicine. Thirty-five of them had been submitted to a RYGB [3] (RYGB group) for a period longer than 36 months. To be included in this group, the excluded stomach of these patients had to be accessible by a complete endoscopic examination by DBE. In this case, the enteroscope had to be advanced through the esophagus (40 cm), proximal gastric pouch (5 cm), Roux-en-Y jejunum loop (usually with 100 to 150 cm), biliopancreatic jejunal limb (60 to 75 cm from the Treitz' ligament), and duodenum (20 cm). The Roux-en-Y limb and the biliary loop have similar length in all patients and followed the hospital routine.

The control group was composed of 32 patients who were morbidly obese but had not been submitted to RYGB. Both RYGB and control groups were comparable regarding age, body mass index, gender, histopathological mucosal alterations, and rate of *H. pylori* infection (Table 1). Routine

Table 1 Clinicopathologic comparisons between patients who underwent Roux-en-Y gastric bypass and preoperative obese patients

	RYGB		Control		p value
	N	%	N	%	
Number of patients	35		32		
Mean age	43.4 SD=13.8		44.7 SD=15.2		0.84 ^a
BMI, kg/m ²	53.3 (preoperative)		50.8		0.74 ^a
Gender					
Women	30	85.7	29	90.6	0.70 ^b
Gastritis—antrum					
Mild	24	68.6	22	68.7	0.90 ^b
Moderate	11	31.4	10	31.3	
Gastritis—body					
Mild	23	65.7	23	71.9	0.60 ^b
Moderate	12	34.3	9	28.1	
Gastritis—proximal pouch					
Mild	23	65.7	—	—	—
Moderate	12	34.3	—	—	
Intestinal metaplasia	5	14.3	2	6.3	0.43 ^b
<i>H. pylori</i>	12	34.3	14	43.7	0.46 ^b

^aStudent's *t* test

^bPearson Chi-square test

proton pump inhibitors therapy after gastric bypass usually does not exceed 30 days. No patient in this series required chronic proton pump inhibitors management. Endoscopic assessment was conducted on the basis of nonspecific complaints. There were no patients with current ulcer or gastritis at the time of the investigation nor was any medical prescription in use.

For the subsequent histopathological and immunohistochemical analyses, biopsies were collected through DBE procedures: four biopsies from the proximal gastric pouch mucosa and eight from the excluded stomach mucosa (four at the body and four at the antrum).

Histopathologic Evaluation

Endoscopic biopsies collected as described above were cut from tissue blocks fixed in formalin and embedded in paraffin. Sections 4 μm thick were stained by hematoxylin and eosin and modified Giemsa staining.

The grade of inflammation and the presence or absence of atrophy and/or intestinal metaplasia in the gastric mucosa were also noted. Colonization of the tissues by *H. pylori* was detected using a modified Giemsa staining and recorded as present or absent.

Immunohistochemistry Evaluation

The collected formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies' tissue blocks were sectioned for immunohistochemical analysis.

To perform immunohistochemical analysis, monoclonal antibodies against Ki-67 (MIB-1, dilution 1:50, Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA), Bcl-2 (NCL-L-Bcl2, dilution 1:80, Novocastra, Newcastle, UK), caspase-3 (rabbit antihuman caspase-3; dilution 1:100, Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA), CD3 (rabbit polyclonal antihuman CD3; total T cell marker; dilution 1:100; Dako, Glostrup, Denmark), CD8 (cytotoxic T cell marker, dilution 1:20; Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA), and gastrin (dilution 1:80; Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA) were utilized. Streptavidin-biotin-immunohistochemistry was the chosen method (Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA).

Briefly, tissue block sections were treated with 4 % hydrogen peroxidase (H_2O_2) in methanol for 35 min to eliminate endogenous peroxidase activity. The sections were placed in the microwave oven for 10 min for antigen retrieval as previously described [21, 22], rinsed in phosphate-buffered saline (PBS), and incubated with 10 % normal horse serum to block nonspecific binding. Upon removal of the serum, the primary monoclonal antibody was applied at room temperature. Following further washing with PBS, sections were incubated with biotinylated anti-mouse

immunoglobulin for 30 min at room temperature. After washing twice with PBS, sections were treated with Vectastain Elite horseradish peroxidase complex (Vector Laboratory, Burlingame, CA) for 30 min at room temperature. Following another rinse with PBS, sections were then incubated with diaminobenzidine 0.05 % and 0.04 % H_2O_2 for 20 min. After a final wash with distilled water, the sections were counterstained with Harris Alum Hematoxylin, dehydrated through graded alcohols to xylene, and coverslipped. Sections of gastric adenocarcinoma and PBS replacing primary antibody were used as positive and negative controls, respectively.

For Ki-67, the cells were characterized as positive even if stained weakly. The Ki-67 index was calculated as the percentage of positive cells (counting the cells with positive nuclei and dividing themselves for the total number of cells). A minimum of 1,000 cells were counted, in the hot spot areas, using $\times 400$ magnification of an optic microscope. The Ki-67 marker was classified as high index of cellular proliferation when the positivity was greater than 25 % of the cells and low index when the cellular distribution was lesser than 25 % of the positive cells. This was based on the normal stomach immunoreactivity for Ki-67 (data not shown).

Specific cytoplasmic immunoreactivity for caspase-3, Bcl-2 protein, and for CD3 and CD8 was scored semiquantitatively on a graded scale of 0 through 4 for both intensity and distribution (intensity: 0 = absence staining; 1 = hardly visible staining; 2 = easily visible, however weak; 3 = intense, however not as much as the control; and 4 = so intense as the control; distribution: 0 = absence of coloration, 1 = 10 to 25 %, 2 = 26 to 50 %, 3 = 51 to 75 %, and 4 = 75 % and higher). Caspase-3 immunoreactivity was rated as high grade if 3 or 4 for intensity or distribution. Bcl-2 positivity revealed cytoplasmic staining of glandular epithelial cells.

Gastrin immunoreactivity was measured by counting the positive cells in the basal layer of the epithelium. Strong or weak brown staining of triangular or pyramidal cells could be seen.

CD3 and CD8 lymphocytes were characterized by cytoplasmic brown staining of infiltrating epithelial cells or the presence of lymphoid follicles. Inflammation was rated as high grade if 3 or 4 for intensity or distribution.

All immunohistochemistry sections were scored independently by two different investigators in a blind fashion.

Statistical Analysis

Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation. Data were analyzed using unpaired Student's *t* test, rank test, Chi-square, and Fisher's Exact Test with two tailed *p* value < 0.05 considered significant.

Table 2 Immunohistochemistry comparisons between operated and control patients

	RYGB		Control		<i>p</i> value
	<i>N</i>	%	<i>N</i>	%	
Ki-67		SD		SD	
Antrum	24.88	13.8	17.7	7.87	0.01 ^a
Body	24.72	16.0	15.03	1.33	0.002 ^a
Pouch	18.3	12.6			
High caspase-3					
Antrum		31		46	0.02 ^a
Body		23.4		44	0.015 ^a
Pouch		49		—	
Gastrin—antrum	29.6	7.38	55.5	9.95	0.0003 ^a
High CD-3					
Antrum		19.6		19.44	0.96 ^a
Body		26.5		21.3	0.19 ^a
Pouch		18.4		—	
High CD8 (% of CD3+ cells)					
Antrum		48.7		41	0.43 ^b
Body		43		51	0.84 ^b
Pouch		45		—	

RYGB patients submitted to Roux-en-Y gastric bypass, *Control* morbidly obese patients who had not been submitted to Roux-en-Y gastric bypass, *SD* standard deviation

^aStudent's *t* test

^bPearson Chi-square test

Results

As mentioned previously, RYGB and control patients groups were comparable regarding age, gender, grade of gastritis, intestinal metaplasia, and the presence of *H. pylori*. Of the operated patients, 30 (85.7 %) were females and the mean age was 43.4 years old (22–61 years old). The mean postoperative time was 77.6 months (range 36–110 months; Table 1).

Ki-67 brown nuclear cytoplasmic staining was observed in the basal cell layer of the gastric epithelium of both RYGB and control groups. Ki-67 proliferative index in the excluded gastric mucosa was significantly higher than in controls, either in the gastric antrum or body ($p=0.01$ and $p=0.002$, respectively; Table 2). Increased proliferation cell rate was found in the superficial layer of the epithelium in the excluded gastric antrum (Fig. 1a).

Bcl-2 immunorexpression in the gastric mucosa was represented by rare cytoplasmic staining of glandular epithelial cells, usually in the deep gastric glands in all studied cases. Lymphocytes and lymphoid aggregates of the lamina propria stained strongly and provided a positive internal control. There was no difference in the Bcl-2 immunoreactivity of the excluded gastric mucosa compared to the controls.

Caspase-3 immunohistochemistry revealed a cytoplasmic labeling of gastric epithelial cells. Caspase-3 immunorexpression was decreased in the excluded stomach compared to the controls (Fig. 2), both in the antrum and in the body ($p=0.02$ and $p=0.015$, respectively; Table 2).

Caspase-3 detection was similar between *H. pylori*-positive- and *H. pylori*-negative excluded mucosa. Ki-67 index in caspase-3-positive group was significantly lower than that in caspase-3-negative group ($p<0.05$).

Fig. 1 a, b Ki-67 immunohistochemistry ($\times 10$). a Ki-67 immunorexpression in the excluded stomach antrum. Increased proliferative index in the basal layer of the mucosa and abnormal

proliferating cells in the superficial layer of the epithelium can be seen. b Normal brown nuclear immunostaining in the basal layer of the epithelium in a control case (antrum)

Fig. 2 **a, b** Caspase immunohistochemistry. **a** Epithelium of the excluded gastric antrum. Faint cytoplasmic and nuclear brown staining can be detected ($\times 20$). **b** Strong nuclear caspase-3 immunorexpression in control antrum case ($\times 20$)

Gastrin-positive cells were detected by the presence of brownish immunostaining of pyramidal cells in the basal layer of the gastric antrum epithelium of both RYGB and control groups (Fig. 3). Gastrin immunorexpression was restricted to the gastric antrum in both groups. There was a major reduction in gastrin cells immunorexpression in the excluded gastric mucosa compared to the controls ($p=0.0003$; Table 2 and Fig. 3).

Most of the epithelial lymphocytes were stained by the marker CD3 revealing T cells. Lymphoid follicles within the mucosa and submucosa with immunostained lymphocytes were also noted (Fig. 4). A variable number of T cell lymphocytes (CD3+) also were immunostained for CD8 (Fig. 5), varying from 20 to 60 % of the CD3-positive area (mean=48.5 %).

There was no difference regarding CD3 and CD8 staining in the operated and control patients (Table 2).

Discussion

Although first described in late 1960s, most of the Roux-en-Y gastric bypasses using a long limb have been performed since

the 1990s [2, 3]. Mucosal alterations may occur in the excluded stomach after a long period following RYGB.

We examined a panel of molecular markers for proliferation rate, apoptosis, inflammatory response, as well as gastrin hormone function in the excluded stomach mucosa of RYGB patients and in the gastric tissue of control obese subjects. Ultimately, we wanted to identify markers for early detection of possible alterations of the excluded stomach mucosa.

Increased proliferation cell rate was found in the epithelium of the excluded stomach when compared to the stomach of non-operated obese patients. The antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67 is a human nuclear protein that is expressed in all active parts of the cell cycle and is widely used in routine pathology as a proliferation marker. The monoclonal antibody Ki-67 recognizes a labile epitope on a nuclear antigen that is present in proliferating cells (i.e., cells in the G1, S, G2, and M phases) but not in cells in the G0 phase [23]. Ki-67 reactive cells were detected in the superficial layer of the epithelium, which is not so frequent in the normal gastric mucosa, demonstrating once more an increased cell turnover in the bypass patients.

Apoptosis has an essential function in maintaining the integrity of the gastrointestinal mucosa. Its deregulation is

Fig. 3 **a–d** Gastrin immunohistochemistry. **a, b** Epithelium of the excluded stomach shows few positive immunoreactivity cells for gastrin ($\times 20$, $\times 40$). **c, d** In control case, numerous positive cells for gastrin can be observed in the antrum mucosa ($\times 20$, $\times 40$)

Fig. 4 a, b CD3 immunohistochemistry of the excluded stomach. Chronic inflammatory infiltrate in the epithelium of the excluded stomach showing numerous positive cells for CD3 T lymphocytes. Inflammatory infiltrate to the superficial cells of the pits can be seen ($\times 10$)

associated with the occurrence of lesions including atrophic gastritis, peptic ulcers, intestinal metaplasia, and stomach tumorigenesis [24]. Caspase-3 is a critical apoptosis-promoting element and closely correlation with gastric cancer formation occurs when it is downregulated, being a potential indicator of tumor formation and progression. It has been demonstrated that caspase-3 protein expression was upregulated in chronic atrophic gastritis with or without intestinal metaplasia and low or moderately dysplasia, while downregulated in severe dysplasia and gastric carcinoma, and significantly positively correlated with cell apoptosis [24]. Conversely, our results demonstrated that, despite of the absence of dysplasia or cancer, the caspase-3 immunorexpression was already decreased in the excluded stomach compared to the obese controls. This result was independent of the presence or absence of *H. pylori*, meaning that *H. pylori* infection is not the only one element responsible for the alterations in these gastric epithelia.

Alterations in hormonal secretions after Roux-en-Y gastric bypass may be responsible for these epithelial changes. For instance, ghrelin is decreased after Roux-en-Y gastric bypass, and it is already known that this hormone alters the epithelial apoptosis rate [25]. Vitamin B₁₂ and iron deficiency (61.8 and 29.8 %, respectively) are not uncommon after RYGB. Stratification according to these findings was not conducted in this investigation; however, attention to these parameters should be given in the future [26].

Our results did not reveal any difference in Bcl-2 immunoreactivity of the excluded gastric mucosa compared to the controls, probably because this marker represents a different mechanism or route of apoptosis.

There was a major reduction in gastrin cells immunorexpression in the excluded gastric mucosa compared to the controls, $p=0.0003$. Gastrin is produced in G cells of the gastric antrum and, in lower quantity, in the proximal small intestine, colon, and pancreas. It stimulates the acid secretion during meal ingestion. Because the bypassed stomach is excluded of the transit, there is no stimulus to its secretion, and this fact may explain the cause of the reduction found in our patients. Low intragastric pH (high intragastric acidity) activates the calcitonin gene-related peptide neurons that, via an axon reflex, stimulate and thus inhibit gastric secretion. The absence of mechanical gastric distension associated to the absence of food buffering maintains low intragastric pH, which stimulates secretin and somatostatin production that consequently inhibits gastrin secretion. This may function as a negative feedback leading to a sustained decreased gastrin. Gastrin also functions as a trophic hormone to stimulate mucosal repair and could also contribute to the presence of atrophy in the bypassed stomach [25, 27, 28]. A pitfall of this study is the lack of serum gastrin measurements before and after surgical treatment; however, both experimental and human studies have demonstrated a decreased serum gastrin after gastroduodenal exclusion [28, 29].

Immunohistochemistry for CD3 and CD8 did not demonstrate any difference in number of these T cell populations in both groups. Inflammatory infiltration was not the major histologic alteration sought in these excluded stomachs and may not participate actively of the cascade that leads to increased epithelial cell turnover in this setting.

Gastric epithelial homeostasis is maintained by a balance between cell proliferation rate and programmed cell death or

Fig. 5 a, b CD8 immunohistochemistry. Lymphocytes are positive for CD8 in the mucosa of the excluded stomach ($\times 10$ and $\times 20$)

apoptosis [30]. An imbalance of these two processes leading to increased proliferation of the gastric mucosa may enhance the effect of carcinogens on DNA, increasing the risk of mutational changes and the development of gastric cancer. On the other hand, apoptosis, a genetically regulated mechanism of cell death, plays an essential role in eliminating unnecessary or damaged cells from the organism [21, 24]. The panel of molecular markers employed in this study has shown that cell proliferation is increased and apoptosis is downregulated in the excluded stomach mucosa compared to the non-operated obese controls. It is likely that examining other molecular markers will shed further light into the health status of the excluded stomach mucosa of RYGB patients.

Alterations in cell turnover in these patients may be of relevance in long-term follow-up and have occasionally implicated in therapeutic interventions [31]. RYGB represents one of the most common surgical techniques for the morbidly obese, including young patients [1, 2]. Because of the possibility that the excluded stomach might be a target for epithelium damage, some researchers have advocated distal subtotal gastrectomy [32–34]. On the other hand, cancer in the excluded stomach is still rare. Eight cancer cases encompassing the excluded stomach were identified by Menéndez et al. in 2012, among a total of 21 gastric and esophagogastric junction tumors diagnosed after RYGB. These authors calculated a total incidence of 24/100,000, slightly higher than in the general population (7.8/100,000), however much lower than the estimated incidence of gastric cancer in patients without any bariatric procedure. Even considering the possibility of underreporting, the authors have suggested that bariatric treatment is protective [35]. The parallel may not be perfect; however, gastric stump cancers after gastrectomy for benign ulcer disease were clearly recognized only 40 years after widespread adoption of Billroth II gastrectomy, being more frequent in those with at least 15 years of follow-up [36, 37].

In conclusion, a panel of molecular markers could substantiate that cell proliferation is increased and apoptosis is downregulated in the excluded stomach mucosa, in comparison with the non-operated obese controls. No significant histological aberrations or actual malignancies were detected, and the findings do not match the excellent oncologic record of RYGB. In such circumstances, additional molecular and genetic markers as well as continued follow-up will be useful to shed light on the natural history of such intriguing changes.

Acknowledgments The authors thank Thaise Yumie Tomokani and Bruna Souza de Quevedo for their technical assistance. This work was supported by a grant from the Foundation of Support to the Research of the State of São Paulo (FAPESP, no. 06/537414).

Conflict of Interest The authors of this manuscript—Adriana V. Safatle-Ribeiro, M.D., PhD; Pedro A. Petersen, M.D.; Dilson S. Pereira Filho, M.D.; Carlos E. P. Corbett, M.D., PhD; Joel Faintuch,

M.D., PhD; Robson Ishida, M.D.; Paulo Sakai, M.D., PhD; Ivan Cecconello, M.D., PhD; and Ulysses Ribeiro Jr. M.D., PhD—have no conflict of interest.

References

- Weber M, Clavien PA. Bariatric surgery—a successful way to battle the weight crisis. *Br J Surg*. 2006;93:259–60.
- Consensus Development Conference Panel. Gastrointestinal surgery for severe obesity. *Ann Intern Med*. 1991;115:956–61.
- Capella RF, Capella JF, Mandec H, et al. Vertical banded gastroplasty-gastric bypass: preliminary report. *Obes Surg*. 1991;1(4):389–95.
- Sakai P, Kuga R, Safatle-Ribeiro AV, et al. Is it feasible to reach the bypassed stomach after Roux-en-Y gastric bypass for morbid obesity? The use of the double-balloon enteroscope. *Endoscopy*. 2005;37:566–9.
- Fobi MA, Chicola K, Lee H. Access to the bypassed stomach after gastric bypass. *Obes Surg*. 1998;8(3):289–95.
- Goitein D, Gagné DJ, Papasavas PK, et al. Percutaneous computed tomography-guided gastric remnant access after laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass. *Surg Obes Relat Dis*. 2006;2(6):651–5.
- Silecchia G, Catalano C, Gentileschi P, et al. Virtual gastroduodenoscopy: a new look at the bypassed stomach and duodenum after laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass for morbid obesity. *Obes Surg*. 2002;12(1):39–48.
- Sundbom M, Hedenstrom H, Gustavsson S. Duodenogastric bile reflux after gastric bypass: a cholestygraphic study. *Dig Dis Sci*. 2002;47:1891–6.
- Safatle-Ribeiro AV, Kuga R, Iriya K, et al. What to expect in the excluded stomach mucosa after vertical banded Roux-en-Y gastric bypass for morbid obesity. *J Gastrointest Surg*. 2007;11(2):133–7.
- Kuga R, Safatle-Ribeiro AV, Faintuch J, et al. Endoscopic findings in the excluded stomach after Roux-en-Y gastric bypass surgery. *Arch Surg*. 2007;142(10):942–6.
- Faintuch J, Ishida RK, Jacobi M, et al. Increased gastric cytokine production after Roux-en-Y gastric bypass for morbid obesity. *Arch Surg*. 2007;142(10):962–8.
- Ishida RK, Faintuch J, Paula AM, et al. Microbial flora of the stomach after gastric bypass for morbid obesity. *Obes Surg*. 2007;17(6):752–8. Erratum in: *Obes Surg*. 2007 Jul;17(7):996.
- Rajman I, Strother SV, Donegan WL. Gastric cancer after gastric bypass for obesity. Case report. *J Clin Gastroenterol*. 1991;13(2):191–4.
- Lord RV, Edwards PD, Coleman MJ. Gastric cancer in the bypassed segment after operation for morbid obesity. *Aust N Z J Surg*. 1997;67(8):580–2.
- Khitin L, Roses RE, Birkett DH. Cancer in the gastric remnant after gastric bypass: a case report. *Curr Surg*. 2003;60(5):521–3.
- Escalona A, Guzman S, Ibanez L, et al. Gastric cancer after Roux-en-Y gastric bypass. *Obes Surg*. 2005;15(3):423–7.
- Trincado MT, del Olmo JC, Garcia Castano J, et al. Gastric pouch carcinoma after gastric bypass for morbid obesity. *Obes Surg*. 2005;15(8):1215–7.
- Corsini DA, Simonetti CA, Moreira G, et al. Cancer in the excluded stomach 4 years after gastric bypass. *Obes Surg*. 2006;16(7):932–4.
- Harper JL, Beech D, Tichansky DS, et al. Cancer in the bypassed stomach presenting early after gastric bypass. *Obes Surg*. 2007;17(9):1268–71.
- Watkins BJ, Blackmun S, Kuehner ME. Gastric adenocarcinoma after Roux-en-Y gastric bypass: access and evaluation of excluded stomach. *Surg Obes Relat Dis*. 2007;3(6):644–7.

21. Clarke MR, Safatle-Ribeiro AV, Ribeiro U, et al. Bcl-2 protein expression in gastric remnant mucosa and gastric cancer 15 or more years after partial gastrectomy. *Mod Pathol*. 1997;10:1021–7.
22. Safatle-Ribeiro AV, Ribeiro Jr U, Sakai P, et al. Integrated p53 histopathologic/genetic analysis of premalignant lesions of the esophagus. *Cancer Detect Prev*. 2000;24(1):13–23.
23. Cattoretto G, Becker MH, Key G, et al. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB-1 and MIB-3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol*. 1992;168:357–63.
24. Yang L, Wu DY, Xin Y. Down-regulation of caspase-3 expression in precancerous lesions and its relation to gastric carcinogenesis. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*. 2006;28(5):357–60.
25. Beckman LM, Beckman TR, Earthman CP. Changes in gastrointestinal hormones and leptin after Roux-en-Y gastric bypass procedure: a review. *J Am Diet Assoc*. 2010;110(4):571–84.
26. Dalcanele L, Oliveira CP, Faintuch J, et al. Long-term nutritional outcome after gastric bypass. *Obes Surg*. 2010;20(2):181–7.
27. Hedberg J, Hedenström H, Nilsson S, et al. Role of gastric acid in stomal ulcer after gastric bypass. *Obes Surg*. 2005;15(10):1375–8.
28. Leme PLS, Malheiros CA, Rodrigues FCM, et al. Gastroduodenal exclusion and truncal vagotomy: weight and seric gastrin alterations. Experimental study on rats. *Rev Col Bras Cir*. 2003;30(6):416–23.
29. Anderi Jr E, Rossi FM, Souza CK, et al. Estudo da gastrinemia pré e pós-operatória em pacientes submetidos à gastroplastia vertical ncom banda e reconstrução em Y de Roux por obesidade mórbida. *Rev Col Bras Cir*. 2008;35(5):392–6.
30. Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process—first American Cancer Society award lecture on cancer epidemiology and prevention. *Cancer Res*. 1992;52:6735–40.
31. Shiotani A, Iishi H, Ishiguro S, et al. Epithelial cell turnover in relation to ongoing damage of the gastric mucosa in patients with early gastric cancer: increase of cell proliferation in pre-malignant lesions. *J Gastroenterol*. 2005;40(4):337–44.
32. Csendes A, Burdiles P, Papapietro K, et al. Results of gastric bypass plus resection of the distal excluded gastric segment in patients with morbid obesity. *J Gastrointest Surg*. 2005;9(1):121–31.
33. Madan AK, Lanier BJ, Tichansky DS, et al. Laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass with subtotal gastrectomy. *Obes Surg*. 2005;15(9):1332–5.
34. Braghetto I, Csendes A, Korn O, et al. Laparoscopic resectional gastric bypass in patients with morbid obesity: experience on 112 consecutive patients. *J Gastrointest Surg*. 2011;15(1):71–80.
35. Menéndez P, Padilla D, Villarejo P, et al. Does bariatric surgery decrease gastric cancer risk? *Hepatogastroenterology*. 2012;59(114):409–12.
36. Safatle-Ribeiro AV, Ribeiro Jr U, Reynolds JC. Gastric stump cancer: what is the risk? *Dig Dis*. 1998;16(3):159–68.
37. Sinning C, Schaefer N, Standop J, et al. Gastric stump carcinoma—epidemiology and current concepts in pathogenesis and treatment. *Eur J Surg Oncol*. 2007;33(2):133–9.

São Paulo, 21 de maio de 2009.

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. Eduardo Massad
DD. Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de
Pesquisa CAPPesq – Diretoria Clínica

Prezado Prof. Eduardo,

Informamos a V.Sa., que o projeto intitulado: “AVALIAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES DA MUCOSA GÁSTRICA NO ESTÔMAGO EXCLUSO APÓS CIRURGIA BARIÁTRICA” – nº CAPPesq 0864/04, atualmente sob a responsabilidade da Dra. Adriana Vaz Safatle-Ribeiro, será apresentado como Tese de Doutorado pelo aluno Dilson da Silva Pereira Filho.

O aluno irá desenvolver a parte molecular desta pesquisa, a qual se encontra em fase final da análise estatística dos dados.

Solicitamos, portanto, uma aprovação que conste o nome do aluno – nível Doutorado e da sua orientadora, para posterior envio ao Serviço de Pós-Graduação.

Atenciosamente,

Dra. Adriana Vaz Safatle-Ribeiro
Pesquisador Responsável

Dr. Dilson da Silva Pereira Filho
Pós-Graduando - Doutorado

Aprovação pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Ao

Departamento de Gastroenterologia

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 16.12.09, tomou conhecimento que o Protocolo de Pesquisa nº **0864/04 "Avaliação de marcadores moleculares da mucosa gástrica no estômago excluído após cirurgia bariátrica"**, que será tese de doutorado do aluno Dilson da Silva Pereira Filho tendo como orientadora Dra. Adriana Vaz safatle-Ribeiro

CAPPesq, 16 de dezembro de 2009.

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente da Comissão Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa