DANIELLE CRISTINA FONSECA CANDIAN

**Respostas transcriptômica e sistêmica de hormônios
gastrintestinais à derivação gástrica em Y de Roux e sua
correlação com homeostase glicêmica em pacientes obesas
portadoras de diabetes mellitus tipo 2**

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

Programa de Ciências em Gastroenterologia

Orientador: Prof. Dr. Dan Linetzky Waitzberg

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 5890, de 20 de dezembro de 2010.

A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

**São Paulo
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Candian, Danielle Cristina Fonseca

Respostas transcriptômica e sistêmica de hormônios
gastrintestinais à derivação gástrica em Y de Roux e
sua correlação com homeostase glicêmica em pacientes
obesas portadoras de diabetes mellitus tipo 2 /
Danielle Cristina Fonseca Candian. -- São Paulo,
2018.

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

Programa de Ciências em Gastroenterologia.

Orientador: Dan Linetzky Waitzberg.

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

USP/FM/DBD-055/18

Responsável: Kátia Maria Bruno Ferreira - CRB-8/6008

*Dedico este trabalho a **Deus**, que, com sua infinita sabedoria, é guia de minha trajetória.*

*Aos meus pais, **Jairo e Rosana Fonseca**, que inúmeras vezes renunciaram a seus desejos e planos para permitir que eu realizasse meus sonhos. Pelo carinho, pela dedicação, pelo apoio incondicional em todos os momentos. Obrigada por sempre me mostrarem a importância da família, da honestidade e da persistência. Sem vocês esta conquista não seria possível.*

*À minha irmã, **Débora**, e a meus avós **Helena e Marques**, pelo amor, pelo apoio, pela confiança e pela motivação sem limites. Obrigada por chorar meu choro e sorrir meu riso, vocês me impulsionaram em direção às vitórias deste desafio.*

*Ao meu esposo, companheiro, confidente e melhor amigo, **André Candian**, pela paciência, pelo carinho e pelo apoio sem igual em todos os momentos. Obrigada por aceitar trilhar novos caminhos ao meu lado, encarar todos os desafios sem nunca fraquejar, e, acima de tudo, nunca me deixar ter dúvidas sobre onde é o meu porto seguro. Você foi fundamental para eu chegar até aqui.*

*A meus sogros **Lúcia e Adilson**, e a meu cunhado **Lucas**, pelo carinho e pelo apoio em todos os momentos dessa caminhada, sua torcida por mim sempre me inspirou.*

AGRADECIMENTOS

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

Antoine de Saint-Exupéry

Agradeço ao meu orientador **Dan L. Waitzberg**, por acreditar que eu era capaz e ver potencial onde eu mesma não conseguia enxergar. Só tenho a agradecer a seus ensinamentos, a suas orientações, a suas palavras de incentivo, a seus puxões de orelha, a sua paciência e a sua dedicação. É inenarrável a alegria de poder realizar este trabalho ao lado de alguém que transborda sabedoria e conhecimento. Muito obrigada.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**), pelo apoio financeiro ao projeto temático (2011/09612-3), e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**), pela bolsa de mestrado que me foi concedida.

A todos os professores, e funcionários da Disciplina de Cirurgia do Aparelho Digestivo do HC-FMUSP que me acolheram no programa de pós-graduação. E um obrigado especial à **Vilma de Jesus Libério**, pela paciência em sempre “tirar só mais uma duvidazinha”, obrigada pelo carinho e pela gentileza.

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

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

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

Às enfermeiras **Janete, Francisca e Maria**, por sempre se disponibilizarem a realizar as coletas de material para o estudo.

Às **pacientes** por terem participado desta pesquisa, sem elas nada disso seria possível. Vocês são exemplos de perseverança.

À minha amiga, companheira, “chefa”, madrinha e professora de genética **Priscila Sala**, por me apresentar para esse mundo fascinante da genética que acabou se tornando minha grande paixão. Obrigada por acreditar que eu era capaz, você foi o presente que a FMUSP me deu. Obrigada por ser meu Norte, por puxar minha orelha e me contrabalancear, desde o início, nos completamos. Uma funciona de dia, a outra à noite, uma dupla dinâmica! Muito mais que uma colega de trabalho, você se tornou, ao longo desses 3 anos, uma irmã para mim.

À **Raquel Torrinhas**, pelo apoio, pelo incentivo, e por sempre estar disposta a ajudar aos outros. Obrigada por renunciar ao seu tempo livre para me auxiliar, você é um exemplo de pessoa e profissional! Tenho muita admiração por você e pela forma com que você transborda conhecimento e didática. Obrigada por compartilhar comigo sua sabedoria.

À **Graziela Ravacci**, por ser inspiração para vida e para ciência. Se, um dia, for um terço da pesquisadora que você é, já me sentirei realizada! Obrigada pelo ombro nos momentos de desabafo, e pelos clarões de ideias nos momentos de discussões de dados.

À **Alweyd Tesser**, por me apresentar ao mundo da ciência, obrigada por ter se lembrado de mim quando uma oportunidade surgiu.

À **Natasha Mendonça Machado**, por me receber com tanta paciência no início da minha jornada científica. Por me ensinar todos os procedimentos com tanta dedicação e tanto cuidado. Obrigada por sua amizade, e por ser uma inspiração de quanta determinação e garra uma pessoa pode ter.

À **Beatriz Ferreira**, a vida me presenteou com você ao fim da graduação. Começamos a vida profissional juntas, e estamos trilhando caminhos muito parecidos, com muito carinho, parceria e companheirismo! Obrigada pela ajuda de sempre, na ciência e na vida. É bom demais saber que posso contar com uma pessoa maravilhosa como você!

À **Jéssica Reis**, pela doçura das palavras de apoio sempre que precisei. Você é uma pessoa de coração enorme. Obrigada por tudo.

Ao **Leandro Ferreira**, que, por horas e horas, tentou clarear na minha cabeça a bendita estatística.

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

A todos **da equipe Metanutri – LIM-35**, os quais, de alguma forma, me auxiliaram ou ensinaram lições valiosas. Obrigada pela convivência e pelos ensinamentos diários, cada um de vocês contribuiu de alguma forma, para que eu fosse quem sou hoje.

Aos amigos de longa data, **Yanessa Lopes, Bruna Gaspar, Vivian Strake, Vivian Salvador, Camilla Fiora, Marco Taddeo, André Muner, Felipe Fontana, Fernanda Huy, Mayara Souza, Ana Caroline**, e todos aqueles que foram importantes mas pela minha memória não ser tão boa, posso ter esquecido de mencionar, muito obrigada por sempre “estarem por perto”, mesmo que não em presença física, obrigada por me apoiarem, torcerem por mim e acreditarem acima de tudo que eu conseguiria.

*“O homem não teria alcançado o possível se, repetidas vezes,
não tivesse tentado o impossível”.*

Max Weber

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

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

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

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

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

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE QUADROS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	2
2 REVISÃO DA LITERATURA	7
2.1 Diabetes mellitus tipo 2 e obesidade	7
2.2 Derivação gástrica em Y de Roux no tratamento de DM2 relacionado à obesidade.....	8
2.3 Potencial papel de hormônios gastrintestinais na homeostase glicêmica observada após DGYR	9
2.4 Hipóteses que relacionam hormônios GI com homeostase glicêmica após cirurgia bariátrica	19
3 OBJETIVOS	23
3.1 Objetivo primário	23
3.2 Objetivos secundários	23
4 MÉTODOS	25
4.1 Local de desenvolvimento do estudo	25
4.2 Aspectos éticos	25
4.3 Desenho do protocolo de estudo	25
4.4 Seleção de pacientes.....	26
4.5 Composição corporal e dados para caracterização das pacientes .	27
4.6 Obtenção dos tecidos gástrico e intestinal	27
4.7 Obtenção de amostras de plasma e soro	31
4.8 Derivação gástrica em Y de Roux.....	32
4.9 Avaliação das respostas transcriptômica e sistêmica de hormônios gastrintestinais à DGYR	33
4.10 Avaliação da expressão gênica gástrica e intestinal	34

4.11 Análises bioquímicas sistêmicas	35
4.12 Análises estatísticas.....	37
5 RESULTADOS	40
5.1 Características descritivas e de resposta clínica da amostra	40
5.2 Expressão de genes gastrintestinais	44
5.3 Concentrações sistêmicas de hormônios gastrintestinais em jejum e perante teste de refeição mista	47
5.4 Correlação da expressão de genes que transcrevem hormônios gastrintestinais com marcadores bioquímicos da homeostase glicêmica	50
5.5 Análises de correlação entre hormônios gastrintestinais sistêmicos e marcadores bioquímicos da homeostase glicêmica.....	52
5.6 Resumo dos principais achados	52
6 DISCUSSÃO	55
6.1 Da contribuição científica	55
6.2 Dos pontos fortes e limitações	56
6.3 Dos resultados.....	59
7 CONCLUSÃO.....	67
8 ANEXOS.....	69
8.1 Anexo A – Aprovação do estudo pela Comissão de Ética para Análises de Projetos de Pesquisas do Hospital das Clínicas da FMUSP (CAPPesq).....	69
8.2 Anexo B – Desmembramento do projeto temático pela CAPPesq... 70	
8.3 Anexo C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).... 72	
8.4 Anexo D – Análise de correlação de marcadores da homeostase glicêmica com a expressão dos genes gastrintestinais no ER..... 76	
8.5 Anexo E – Medidas descritivas e valor p da comparação dos momentos em cada instante do teste de refeição mista para hormônio GLP-1 entre pré e pós-operatório..... 77	
8.6 Anexo F – Medidas descritivas e valor p da comparação dos momentos em cada instante do teste de refeição mista para hormônio GIP entre pré e pós-operatório	78
8.7 Anexo G – Medidas descritivas e valor p da comparação dos momentos em cada instante do teste de refeição mista para hormônio PYY entre pré e pós-operatório.	79
8.8 Anexo H – Medidas descritivas e valor p da comparação dos momentos em cada instante do teste de refeição mista para hormônio Grelina entre pré e pós-operatório	80

8.9 Anexo I – Medidas descritivas e valor p da comparação dos momentos em cada instante do teste de refeição mista para glicose e insulina, na amostra total de pacientes e nos subgrupos RP e RC.....	81
8.10 Anexo J – Curva de glucagon frente teste de refeição mista, antes e após 3 meses de derivação gástrica em Y de Roux.....	82
9 REFERÊNCIAS	84
10 APÊNDICES	
10.1 Apêndice A - Publicação sobre as alterações do gene da grelina em pacientes com DM2 submetidos à DGYR	

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	porcentagem
<	menor
≤	menor ou igual
=	igual
≥	maior ou igual
>	maior
®	Marca Registrada Nacional
μl	microlitros
AC	alça comum
ACTB	beta-actina
ADA	Associação Americana de Diabetes [<i>American Diabetes Association</i>]
AL	alça alimentar
AUC	área sob a curva
B2M	beta 2 microglobulina
CAPPesq	Comissão de Ética para Análises de Projetos de Pesquisas
cDNA	DNA complementar
cm	centímetros
DGYR	Derivação Gástrica em Y de Roux
dL	decilitro
DM	diabetes mellitus
DM2	diabetes mellitus do tipo 2
DPP4	<i>dipeptidyl peptidase 4</i>
EDB	enteroscopia de duplo balão
EE	estômago corpo médio ou estômago excluso
ER	estômago corpo alto ou estômago remanescente
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

GAPDH	<i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
GCG	preproglucagon
GHRL	grelina
GI	gastrintestinal
GIP	peptídeo inibitório gástrico
GJ	glicemia de jejum
GLP- 1	peptídeo glucagon-símile 1
GOAT	enzima grelina-o-aciltransferase
GRPP	glicentina
h	horas
H1	hipótese
HbA1c	hemoglobina glicada
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HDL	lipoproteína de alta densidade
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDF	Federação Internacional de Diabetes [<i>International Diabetes Federation</i>]
IMC	Índice de Massa Corporal
kg	quilogramas
LDL	lipoproteína de baixa densidade
LIM	Linha de Investigação Médica
m	metros
m ²	metro quadrado
mg	miligramas
min	minutos
mL	mililitros
MPGF	fragmento principal do proglucagon
ng	nanogramas
O ₂	oxigênio
°C	graus Celsius

p=	valor de p
PC 1/3	enzima pró-hormônio convertase
PNS	Pesquisa Nacional de Saúde
PYY	peptídeo YY
Q25	intervalo interquartil 25
Q75	intervalo interquartil 75
RC	Remissão Completa
rho	coeficiente de correlação
RI	resistência à insulina
RI	resistência à insulina
RIN	<i>RNA integrity number</i>
RNA	ácido ribonucleico
RNAm	RNA mensageiro
RP	Remissão Parcial
rpm	rotação por minuto
RT-qPCR	reação de transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia de polimerase quantitativa
T0	pré-operatório
T1	pós-operatório
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGI	trato gastrointestinal
TM	<i>trade mark</i> (marca registrada internacional)
VLDL	lipoproteína de muito baixa densidade
Y2R	receptores do tipo Y2
β	beta
μg	microgramas
μU	microunidades

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Processamento do peptídeo proglucagon em diferentes tecidos gastrintestinais, com base em estudos experimentais e clínicos.....	10
Figura 2 -	Processamento do peptídeo insulíntrópico dependente de glicose (GIP), por meio de seu gene precursor GIP no tecido gastrintestinal.....	13
Figura 3 -	Processamento do peptídeo tirosina tirosina, por meio da transcrição e tradução do gene PYY.....	15
Figura 4 -	Processamento e acilação da grelina por meio da transcrição e tradução do gene GHRL	17
Figura 5 -	Representação das hipóteses que relacionam hormônios GI com homeostase glicêmica após DGYR.	21
Figura 6 -	Desenho do protocolo de estudo, com descrição dos procedimentos gerais de exames e coletas de amostras em suas respectivas consultas.	26
Figura 7 -	Marcação da mucosa intestinal com tinta nanquim (seta vermelha) durante o exame pré-operatório.	29
Figura 8 -	Trajetória percorrida pelo enteroscópio no pós-operatório da DGYR	30
Figura 9 -	Mudanças anatômicas induzidas pela DGYR: anatomia gastrintestinal normal e alterada após DGYR.	32
Figura 10 -	Curva padrão dos hormônios gastrintestinais estudados e de glucagon para sua dosagem plasmática.	37

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** - Curvas de glicose (A) e (B) e insulina (C) e (D) obtidas na amostra geral de pacientes e nos subgrupos de grau de remissão de diabetes mellitus tipo 2 durante teste de refeição mista, antes e após 3 meses de derivação gástrica em Y de Roux44
- Gráfico 2** - Concentração plasmática mediana de hormônios gastrintestinais em resposta ao teste de refeição mista, antes e após 3 meses de derivação gástrica em Y de Roux48

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** - Resumo dos achados da literatura sobre hormônios GI e glucagon após DGYR. 19
- Quadro 2** - Grau de correlação segundo correlação de Spearman. 38
- Quadro 3** - Resumo das modificações transcriptômicas ao longo do intestino e de níveis de hormônios gastrintestinais e sua correlação com marcadores da homeostase glicêmica..... 53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Dados descritivos de 20 pacientes obesas e diabéticas avaliadas antes e 3 meses após derivação gástrica em Y de Roux.	41
Tabela 2 -	Dados de antropometria de 20 pacientes obesas e diabéticas avaliadas antes e 3 meses após derivação gástrica em Y de Roux.	41
Tabela 3 -	Dados clínicos de homeostase glicêmica de 20 pacientes obesas e diabéticas avaliadas antes e 3 meses após derivação gástrica em Y de Roux.....	42
Tabela 4 -	Alteração da expressão global (Microarray) e alvo (RT-qPCR) de genes que transcrevem hormônios envolvidos na homeostase glicêmica em diferentes segmentos gastrintestinais de mulheres obesas após 3 meses de derivação gástrica em Y de Roux	46
Tabela 5 -	Medidas descritivas da comparação da área sob a curva (AUC) dos níveis sistêmicos de hormônios gastrintestinais, glucagon e insulina antes e após 3 meses de derivação gástrica em Y de Roux	49
Tabela 6 -	Análise de correlação de marcadores da homeostase glicêmica com a expressão dos genes gastrintestinais no duodeno de pacientes obesas com diabetes mellitus tipo 2 submetidas à derivação gástrica em Y de Roux.	50
Tabela 7 -	Análise de correlação de marcadores da homeostase glicêmica com a expressão dos genes gastrintestinais no jejuno de pacientes obesas com diabetes mellitus tipo 2 submetidas à derivação gástrica em Y de Roux	51
Tabela 8 -	Análise de correlação de marcadores da homeostase glicêmica com a expressão dos genes gastrintestinais no íleo de pacientes obesas com diabetes mellitus tipo 2 submetidas à derivação gástrica em Y de Roux	51
Tabela 9 -	Correlação de marcadores bioquímicos de homeostase glicêmica com níveis plasmáticos de hormônios gastrintestinais em pacientes obesas com diabetes mellitus tipo 2 submetidas à derivação gástrica em Y de Roux	52

RESUMO

Candian DCF. *Respostas transcriptômica e sistêmica de hormônios gastrintestinais à derivação gástrica em Y de Roux e sua correlação com homeostase glicêmica em pacientes obesas portadoras de diabetes mellitus tipo 2* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

Indivíduos obesos, portadores de diabetes mellitus tipo 2 (DM2), atingem controle glicêmico poucos dias após realização de derivação gástrica em Y de Roux (DGYR), antes mesmo de ocorrer perda de peso significativa. Entre os mecanismos propostos, para explicar o rápido controle glicêmico, a alteração da produção de hormônios gastrintestinais é muito estudada, porém pouco se explorou a expressão tecidual dos genes que os transcrevem. O presente estudo avaliou a resposta, em curto prazo, da expressão gástrica e intestinal de genes que transcrevem peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1), peptídeo insulínico dependente de glicose (GIP), peptídeo tirosina-tirosina (PYY) e grelina, e de níveis sistêmicos desses hormônios à DGYR, bem como, sua correlação com homeostase glicêmica pós-operatória. Mulheres obesas portadoras de DM2 (n=20) foram avaliadas antes e após 3 meses de DGYR. Todas as pacientes foram avaliadas em conjunto e, posteriormente, divididas em dois subgrupos de doentes, determinados pelo grau de remissão pós-operatória de DM2 (parcial ou completa) de acordo com o critério ADA. Biopsias do corpo e fundo gástrico, duodeno, jejuno e íleo foram coletadas por enteroscopia de duplo balão para análise de expressão dos genes *GCG* (precursor do GLP-1), *GIP* (precursor do GIP), *PYY* (precursor de PYY) e *GHRL* (precursor da grelina). As análises de expressão gênica foram feitas por abordagem global e alvo, por meio das técnicas de microarray e RT-qPCR, respectivamente. Concentrações plasmáticas dos hormônios transcritos pelos genes avaliados também foram dosadas em jejum e após teste de refeição mista, bem como níveis circulantes de peptídeo C, hemoglobina glicada (jejum), glicose, insulina e glucagon (jejum e após teste de refeição mista). Essa abordagem permitiu avaliar a correlação de dados teciduais de expressão gênica e de níveis circulantes de hormônios GI com marcadores sistêmicos de homeostase glicêmica. Após DGYR, alterações significativas na expressão de *GCG*, *GIP*, *PYY* e *GHRL* ocorreram ao longo dos segmentos GI estudados, em paralelo à melhora significativa de marcadores plasmáticos da homeostase glicêmica. Particularmente, aumento da expressão de *GCG* e diminuição da expressão de *GIP* ao longo do intestino foram acompanhados por alterações sistêmicas concordantes dos hormônios por eles transcritos. Essas alterações transcriptômicas se correlacionaram direta (*GCG*) e inversamente (*GIP*) com níveis de insulina e glicose, e, inversamente, com níveis de hemoglobina glicada (*GCG* e *GIP*). Apenas o hormônio GLP-1 se correlacionou inversamente com níveis de hemoglobina

glicada. Além disso, as pacientes com remissão completa de DM2 apresentaram, em relação às medidas pré-operatórias, aumento de GCG no jejuno e íleo, e aumento significativo da área sob a curva de GLP-1 ativo após DGYR. No estômago excluso, ocorreu aumento da expressão de *GHRL*, mas os níveis sistêmicos de grelina não sofreram alterações significativas no pós-operatório. De acordo com nossos dados, DGYR modificou a expressão de genes que transcrevem hormônios GI capazes de influenciar a homeostase glicêmica. Essas alterações foram acompanhadas por modificações concordantes de níveis sistêmicos das incretinas GLP-1 e GIP e se correlacionaram com marcadores de melhora da homeostase glicêmica. Em conjunto, nossos resultados sugerem que DGYR pode influenciar a homeostase glicêmica por mecanismos que incluem modificação transcriptômica de genes relacionados a hormônios gastrintestinais.

Descritores: cirurgia bariátrica; derivação gástrica; diabetes mellitus tipo 2; trato gastrointestinal; expressão gênica; incretinas

ABSTRACT

Candian DCF. *Transcriptomic and systemic responses of gastrointestinal hormones to Roux-en-Y gastric bypass and its correlation with glycemic homeostasis in obese patients with type 2 diabetes mellitus* [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

Obese subjects with type 2 diabetes mellitus (T2DM) achieve glycemic control few days after Roux-en-Y gastric bypass (RYGB), even before significant weight loss occurs. Among all proposed mechanisms to explain the rapid glycemic control after surgery, alteration of gastrointestinal (GI) hormones production is widely studied, however, GI expression of these genes is still little explored. The present study evaluated the short-term response of gastric and intestinal expression of genes transcribing glucagon-like peptide 1 (GLP-1), glucose-dependent insulintropic peptide (GIP), tyrosine-tyrosine peptide (PYY), and ghrelin and systemic levels of these hormones after RYGB, as well as their correlation with postoperative glycemic homeostasis. Obese women with T2DM (n = 20) were assessed before and after 3 months of RYGB. All patients were evaluated together and subsequently divided in two subgroups of patients, according the degree of postoperative T2DM remission (partial or complete), following ADA criteria. Biopsies of body and gastric fundus, duodenum, jejunum and ileum were collected by double-balloon enteroscopy for analysis of GCG (precursor of GLP-1), GIP (GIP precursor), PYY (precursor of PYY) and GHRL ghrelin precursor). Gene expression analysis was done by global and target approach, using microarray and RT-qPCR techniques, respectively. Plasmatic concentrations of hormones transcribed by the genes under study were also measured in fasted and after mixed meal test samples, as well as circulating levels of C peptide, glycated hemoglobin (fasting), glucose, insulin and glucagon (fasting and after mixed meal test). This approach allowed the correlation of tissue expression data and circulating levels of GI hormones with systemic markers of glycemic homeostasis. After RYGB, significant changes in GCG, GIP, PYY and GHRL expression were observed along the studied GI segments, in parallel with significant improvement in plasma markers of glycemic homeostasis. In particular, increased GCG expression and decreased GIP expression throughout the small intestine was followed by consistent systemic alterations of its related hormones. These transcriptomic changes are directly (GCG) and inversely (GIP) correlated with insulin and glucose levels and inversely with glycated hemoglobin levels (GCG and GIP). Only GLP-1 was inversely correlated with glycated hemoglobin levels. In addition, regarding the preoperative measurements, patients with complete T2DM remission presented increased GCG in jejunum and ileum, and significant increase in the area under curve of active GLP-1 after RYGB. In the excluded stomach, an increase in GHRL gene expression was recognized, but systemic levels of ghrelin did not changed significantly.

According to our data, RYGB altered the expression of genes that transcribe GI hormones related to glycemic homeostasis. These changes were followed by expected modifications of GLP-1 and GIP incretin systemic levels and were correlated with improved glycemic homeostasis markers. Taken together, our results suggest that RYGB can influence glycemic homeostasis by mechanisms that include transcriptomic modification of genes related to gastrointestinal hormones.

Descriptors: bariatric surgery; gastric bypass; type 2 diabetes mellitus; gastrointestinal tract; gene expression; incretin

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A epidemia mundial da obesidade e suas comorbidades potencialmente fatais constitui grave problema de saúde pública¹. A incidência de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) cresce em paralelo ao aumento da prevalência de obesidade. Pesquisa realizada pelo IBGE identificou que 56,9%² das pessoas com mais de 18 anos estão acima do peso no Brasil. Em paralelo, segundo a Federação Internacional de Diabetes (IDF), o Brasil ocupa o quarto lugar no *ranking* de países com maior número de casos de DM2 no mundo¹.

Resultados, no tratamento clínico da obesidade grave e/ou em suas complicações, ainda são discretos, principalmente pela dificuldade do paciente aderir às intervenções terapêuticas em longo prazo. Nesse cenário, a cirurgia bariátrica, à custa de técnicas restritivas e má absorptivas, permanece o tratamento mais eficaz para obesidade grave e suas comorbidades³, ao promover rápida e sustentável perda de peso e benefícios metabólicos⁴⁻⁶.

Notadamente, em pacientes obesos com DM2, o controle de hiperglicemia pode ser observado poucos dias após a prática da técnica mista cirúrgica representada pela derivação gástrica em Y de Roux (DGYR), antes mesmo de ocorrer significativa perda de peso^{7,8}. O entendimento dos mecanismos associados com a melhora cirúrgica de DM2 pode auxiliar no desenho de tratamentos menos invasivos da obesidade e suas comorbidades. Dentre as várias hipóteses sugeridas na área, são mais consistentes as que consideram adaptações gastrintestinais (GI) em resposta às mudanças anatômicas cirúrgicas como potenciais protagonistas desse fenômeno metabólico⁹.

Hipóteses que envolvem o trato GI incluem a modificação da produção local de hormônios envolvidos na homeostase glicêmica. Estas se amparam no fato de que, ao modificar a anatomia do trato gastrintestinal (com

exclusão do fundo gástrico e desvio imediato do duodeno e jejuno proximal do trânsito alimentar), a DGYR pode alterar a estimulação de células gástricas parietais e enteroendócrinas^{9,10}. Consequentemente, essa alteração poderia impactar a expressão de genes que transcrevem hormônios GI após a cirurgia.

Estudos sugerem que DGYR pode modificar a expressão de genes, em sangue¹¹, tecido adiposo¹², músculo¹³, e, mais recentemente, nos tecidos gástrico e intestinal^{14,15}. Entretanto, a hipótese de que a DGYR possa modificar a expressão gástrica e intestinal de genes que transcrevem hormônios envolvidos na homeostase glicêmica permanece pouco explorada em humanos. Dentre os genes candidatos, destacam-se aqueles que transcrevem as incretinas peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1) e peptídeo insulinotrópico dependente de glicose (GIP). Incretina diz respeito à capacidade que GLP-1 e GIP têm de estimular a síntese de insulina na dependência maior de níveis aumentados de glicose oral do que intravenosa¹⁶. Outros genes candidatos são os transcritores de hormônios peptídeo tirosina-tirosina (PYY) e grelina.

Os principais papéis fisiopatológicos de GLP-1 sobre o DM2 abrangem seus efeitos sobre as ilhotas pancreáticas (estimulação da secreção de insulina e supressão da liberação de glucagon), sobre o trato digestivo (inibição do esvaziamento gástrico e motilidade intestinal) e sobre a redução do apetite^{16,17}. Pacientes com DM2 podem apresentar concentrações pós-prandiais diminuídas de GLP-1. Essa diminuição parece contribuir para o quadro clínico da doença, ao reduzir o estímulo fisiológico da secreção de insulina e não suprimir o de glucagon^{18,19}.

De forma distinta ao GLP-1, os níveis de GIP em indivíduos portadores de DM2 tendem a ser semelhantes aos de pessoas saudáveis. Entretanto, a ação de GIP parece estar diminuída por uma possível resistência adquirida pelos receptores das células β do pâncreas a essa incretina, levando ao prejuízo de seu efeito insulinotrópico²⁰. Sendo assim, o indivíduo obeso com DM2 pode apresentar secreção diminuída de insulina em resposta à resistência ao GIP^{21,22}.

O PYY atua de diversas maneiras no organismo. Entre elas, existe sua ação periférica, por meio da redução da lipólise, e aumento da sensibilidade à insulina, decorrente da diminuição da concentração de ácidos graxos plasmáticos. Em modelos experimentais, a oferta de PYY (3-36) amplificou a ação da insulina na melhora do controle glicêmico, independentemente de hábitos alimentares e perda de peso^{23,24}.

Experimentalmente, a administração crônica de grelina causa hiperfagia e aumenta a adiposidade^{25,26}. Em adição, a grelina também pode atuar na homeostase glicêmica, ao estimular o hormônio contrarregulador da insulina glucagon, suprimir o hormônio sensibilizador de insulina adiponectina, bloquear a sinalização hepática de insulina e inibir a secreção de insulina. Em conjunto, essas ações podem elevar a concentração plasmática da glicose²⁷.

As ações fisiológicas de hormônios gastrintestinais são potencialmente importantes para o controle da homeostase glicêmica e seus níveis sistêmicos, frequentemente, se modificam após DGYR. No entanto, existem controvérsias quanto ao real envolvimento de hormônios GI no controle glicêmico induzido pela cirurgia bariátrica. Em sua maioria, os estudos disponíveis nessa área somente analisaram níveis plasmáticos de hormônios GI e nem todos eles verificaram a resposta desses hormônios perante o teste de refeição mista. Essa abordagem, além de ser pontualmente incompleta, não oferece subsídios que expliquem por que esses hormônios se alteram após a intervenção cirúrgica.

Nesse contexto, justifica-se avaliar a expressão de genes precursores de incretinas, grelina e PYY no tecido gástrico e intestinal de indivíduos obesos diabéticos (com perfil metabólico e características semelhantes) submetidos à DGYR. Adiciona-se que a correlação das alterações transcriptômicas com os níveis sistêmicos dos hormônios estudados, em jejum e perante teste de refeição mista, pode trazer importantes contribuições científicas. Esta investigação pode auxiliar a compreender os mecanismos associados com as modificações pós-operatórias dos hormônios GI e, também identificar um possível segmento GI com maior

participação na resposta transcriptômica (aumento ou redução) à DGYR. Respostas dessa natureza podem nortear, no futuro, o desenho de tratamentos menos invasivos para DM2 associado à obesidade.

O presente estudo explora a hipótese de que a DGYR promove alterações na expressão de genes GI que transcrevem hormônios envolvidos na homeostase glicêmica e, conseqüentemente, modula seus níveis sistêmicos, com impacto na melhora pós-operatória de DM2 em pacientes obesos.

Revisão da Literatura

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Diabetes mellitus tipo 2 e obesidade

DM2 é uma doença crônica não transmissível que tem aumentado sua incidência em consequência a mudanças culturais e sociais. Considerado um grave problema de saúde pública, suas complicações estão entre as principais causas de morte no Brasil e no mundo^{1,2}. Em 2017, o IDF estimou que cerca de 425 milhões de pessoas viviam com diabetes no mundo, e que, até o ano de 2045, 629 milhões de adultos serão portadores da doença¹.

No Brasil, os dados epidemiológicos também são preocupantes. No ano de 2015, cerca de 14 milhões de adultos tinham diabetes, e estima-se que essa doença possa atingir 23,3 milhões de indivíduos maiores de 20 anos até 2035. Esses dados colocam o Brasil como o quarto país com maior número de casos de DM no mundo².

Embora mecanismos genéticos sejam relevantes para o desenvolvimento de DM2, fatores ambientais e comportamentais também podem influenciar o surgimento da doença. Sabe-se que o número de portadores de DM2 está aumentando em virtude do envelhecimento populacional, maior urbanização, maior sobrevida dos pacientes e, principalmente, devido ao aumento progressivo da prevalência de obesidade^{28,29}. No ano de 2014, estavam acima do peso 1,9 bilhões de adultos; destes, 600 milhões eram obesos³⁰.

Maus hábitos alimentares e sedentarismo são fatores comportamentais que influenciam a prevalência atual da obesidade. Estudos apontam que cerca de 90% da população portadora de DM2 apresenta excesso de peso ou obesidade^{31,32}. Devido ao aumento da associação de obesidade e DM2 (diabetesidade)³³ na população mundial, a busca por intervenções que auxiliem no tratamento e/ou controle da obesidade e de suas comorbidades torna-se importante^{3,5}.

2.2 Derivação gástrica em Y de Roux no tratamento de DM2 relacionado à obesidade

Intervenções clínicas tradicionais para a obesidade, como reeducação alimentar, terapias medicamentosas e incentivo a mudanças de estilo de vida têm eficácia limitada sobre perda de peso e sua manutenção em longo prazo. No entanto, a cirurgia bariátrica apresenta benefícios em curto e longo prazo^{34,35}. Entre os diversos procedimentos bariátricos disponíveis, a DGYR é mundialmente realizada e considerada eficaz para o tratamento da obesidade e de suas comorbidades. Descrita pela primeira vez em 1967, a DGYR sofreu diversas modificações técnicas ao longo dos anos³⁶. Atualmente, envolve mecanismos restritivos do estômago e reconstituição do trânsito intestinal em Y de Roux, favorecendo perda de peso e promovendo benefícios metabólicos.

Dentre os benefícios metabólicos de DGYR, inclui-se a reversão ou atenuação do DM2, sem gerar deficiências nutricionais tão graves quanto as observadas em outras técnicas bariátricas (por exemplo: derivação biliopancreática)^{34,37,38}. Melhora do DM2 após DGYR é frequentemente observada antes de perda de peso significativa e, muitas vezes, pacientes submetidos ao procedimento tornam-se independentes de medicamentos hipoglicemiantes já na alta hospitalar^{39,40,41}. Apesar de padronizada na maioria dos centros, variações na técnica de DGYR podem influenciar seus resultados clínicos e metabólicos. Estudos apontam que variações no tamanho da alça biliopancreática podem influenciar a intensidade e duração da melhora glicêmica, além dos índices de recidiva de DM2⁴²⁻⁴⁴.

Recentes meta-análises mostraram que DGYR resulta em 83,3% a 90,6% de remissão e/ou melhora do DM2^{45,46}. Devido ao benefício metabólico da DGYR, ela vem sendo, frequentemente, indicada para controle do DM2 associada à obesidade⁴⁵. Entretanto, os mecanismos responsáveis ainda são muito discutidos e têm impulsionado esforços para esclarecer o que possa estar envolvido nesse processo^{10,47-50}.

2.3 Potencial papel de hormônios gastrintestinais na homeostase glicêmica observada após DGYR

O trato gastrintestinal (TGI) parece ter papel importante na melhora do DM2 após DGYR, provavelmente em resposta ao desvio intestinal do trânsito alimentar^{10,51}. Entre os mecanismos propostos pela literatura científica dessa área, aqueles que envolvem a modificação da produção de hormônios gastrintestinais (GI) são muito explorados. Ocorre que o TGI é considerado o maior órgão endócrino do organismo, e contém milhares de células enteroendócrinas responsáveis pela produção e secreção de mais de 100 peptídeos, que podem desempenhar ações no controle alimentar e na homeostase glicêmica^{16,52,54-56}. Dentre eles, destacam-se as incretinas GLP-1 e GIP, e os hormônios PYY e grelina.

Incretinas

A denominação “incretina” compreende dois hormônios intestinais com ação principalmente insulínica ao estimular secreção pós-prandial de insulina^{57,58}. O conceito de incretina foi criado a partir da observação de que existe maior resposta da insulina à oferta de glicose por via oral, em relação à carga semelhante de glicose intravenosa. Os peptídeos derivados do intestino, liberados após ingestão oral de nutrientes, são considerados potenciais secretagogos de insulina. Sendo assim, o complexo processo de regulação da glicemia passa a ser resultado da interação de hormônios pancreáticos (insulina e glucagon) e hormônios intestinais^{16,53,59,60}. Os dois hormônios intestinais caracterizados como incretinas são GLP-1 e GIP.

Peptídeo semelhante ao glucagon 1 - GLP-1

GLP-1 é um peptídeo de 30 aminoácidos, derivado do processamento pós-translacional do gene preproglucagon (GCG). É sintetizado por células enteroendócrinas do tipo “L” do intestino distal, principalmente no jejuno, íleo e cólon^{16,52}. Nas células L, o gene GCG é capaz de originar outros 3 hormônios além do GLP-1: GLP-2, oxintomodulina e glicentina (Figura 1). A liberação específica dos peptídeos semelhantes ao glucagon (GLP-1 e GLP-

2) no intestino é determinada pela ação da enzima pró-hormônio convertase (PC 1/3)⁶⁰.

Figura 1 - Processamento do peptídeo proglucagon em diferentes tecidos gastrintestinais, com base em estudos experimentais e clínicos^{59,60}
GRPP glicentina, GLP-1 Peptídeo semelhante ao glucagon 1

No pâncreas, também existe a presença do gene GCG, que transcreve glucagon em outros dois subprodutos, peptídeo pancreático relacionado à glicentina (GRPP) e fragmento principal do proglucagon⁶¹ - Figura 1. Em um processamento pós-traducional, são geradas múltiplas formas de GLP-1 circulantes: formas inativas, GLP-1 (1-37) e GLP-1 (1-36); e formas biologicamente ativas, GLP-1 (7-37) e GLP-1 (7-36). As duas formas ativas são potentes insulínótropos¹⁶. Em semelhança à incretina GIP, GLP-1 é altamente suscetível à degradação enzimática em animais e humanos. GLP-1 é degradado pela enzima DPPIV, o que leva à transformação do hormônio em sua forma inativa, gerando metabolitos não insulínótropos⁶¹.

Os principais papéis fisiopatológicos de GLP-1 sobre o DM2 abrangem seus efeitos sobre as ilhotas pancreáticas (estimulação da secreção de insulina e supressão da liberação de glucagon), sobre o trato digestivo

(inibição do esvaziamento gástrico e motilidade intestinal) e sobre a redução do apetite⁶⁰. Pacientes com DM2 podem apresentar concentrações pós-prandiais diminuídas de GLP-1. Essa alteração parece contribuir para o quadro clínico da doença, ao diminuir o estímulo fisiológico da secreção de insulina e não suprimir o de glucagon¹⁷⁻¹⁸.

Em indivíduos saudáveis, os níveis de GLP-1 em jejum encontram-se reduzidos e aumentam em até 15 minutos após ingestão de nutrientes, atingindo um pico de concentração entre 30-45 minutos e retornando aos seus níveis basais após 2-3h. Isso ocorre, principalmente, quando há o consumo de refeições ricas em lipídios e carboidratos¹⁸. Após DGYR, relata-se aumento da secreção pós-prandial do GLP-1, atribuído ao trânsito mais rápido de nutrientes para o intestino delgado^{19,63}.

Devido às alterações reportadas nos níveis sistêmicos de GLP-1 após DGYR, pesquisadores buscaram avaliar seu possível envolvimento na homeostase glicêmica induzida pela técnica bariátrica. Estudo avaliou concentrações plasmáticas de incretinas perante o teste de tolerância oral à glicose e infusão isoglicêmica intravenosa de glicose em pacientes obesos euglicêmicos (grupo-controle, n=7) e portadores de DM2 (n=8), antes e após 1 mês de DGYR²¹. Não se observou resposta de GLP-1 após infusão intravenosa de glicose nem diferenças significativas de suas concentrações plasmáticas em jejum antes e após DGYR, mas houve aumento significativo das concentrações plasmáticas de GLP-1 em resposta à ingestão oral de glicose após DGYR apenas nos pacientes portadores de DM2. Esses achados sugerem que, após DGYR, o efeito dessa incretina potencializa a ação insulínica²¹.

De forma similar, outro estudo realizado em pacientes obesos portadores de DM2 submetidos à DGYR também observou aumento pós-operatório de GLP-1 frente ao teste de refeição mista, com pico do hormônio após 30 minutos. O referido estudo encontrou ainda correlação positiva entre níveis de GLP-1 e insulina, aferidos aos 30 minutos após a refeição ($\rho = 0,6$; $p = 0,0001$). Esses achados sugerem forte ligação entre aumento da

secreção de GLP-1 e restauração da secreção de insulina em resposta à alimentação⁸.

Em estudo que buscou verificar a importância de GLP-1 sobre o metabolismo da glicose, secreção de hormônios e trânsito GI, Shah *et al.* utilizaram um antagonista competitivo dessa incretina em indivíduos portadores de DM2 (n = 12) após o DGYR e em controles pareados por peso, idade, sexo sem DM2 (n = 8). Os pesquisadores observaram que, ao inibir a ligação de GLP-1 ao seu receptor, nos pacientes submetidos à DGYR, houve aumento da glicemia, diminuição da secreção de insulina e redução significativa da resposta das células β no período pós-operatório. Este estudo apoia ação de GLP-1 no controle glicêmico pós-DGYR. Entretanto, os mecanismos a ela relacionados não estão completamente elucidados⁶⁴.

Em contraponto, um estudo recente sugere que a melhora glicêmica em curto prazo após DGYR não depende de resposta incretínica aumentada. Nesse estudo, teste de refeição mista foi realizado em 9 pacientes obesos submetidos à DGYR e 9 pacientes obesos não operados sob dieta com restrição calórica. Os autores observaram resposta aumentada de GLP-1 após DGYR, mas sem diferença significativa na concentração plasmática desse hormônio entre os dois grupos de pacientes. Ambos os grupos apresentaram benefícios similares quanto à melhora da tolerância à glicose pós-prandial e perda de peso (2-3% do peso inicial), após 4 dias da intervenção por DGYR e por restrição calórica. Esses achados sugerem que não há influência de perda de peso na melhora da glicemia e que o GLP-1 pode não desempenhar papel central sobre essa variável clínica após o DGYR^{65,66}.

Peptídeo insulínico dependente de glicose - GIP

O GIP foi, inicialmente, denominado peptídeo inibidor gástrico, por inibir secreção e motilidade gástricas; entretanto, com o desenvolvimento de tecnologias analíticas mais avançadas, descobriu-se que o GIP estimula a secreção de insulina. Por esse motivo, esse hormônio passou a ser

denominado peptídeo insulíntrópico dependente de glicose¹⁶. Transcrito pelo gene GIP, a incretina GIP é um peptídeo de 42 aminoácidos, originado do a partir do pró-hormônio préproGIP e ativado pela enzima PC1/3 (Figura 2).

Figura 2 - Processamento do peptídeo insulíntrópico dependente de glicose (GIP), por meio de seu gene precursor GIP no tecido gastrintestinal¹⁶

GIP, a primeira incretina descrita na literatura, é produzido pelas células K da mucosa do duodeno e jejuno, sob estímulo da presença de carboidratos e, principalmente, lipídeos no duodeno. Mais especificamente, é a taxa de absorção de nutrientes, e não somente a presença de nutrientes no lúmen intestinal, que estimula a liberação de GIP. Assim, a secreção de GIP pode ser reduzida em indivíduos com má absorção intestinal^{16,67}.

Distinto do que ocorre com GLP-1, os níveis sistêmicos de GIP em indivíduos obesos portadores de DM2 tendem a ser semelhantes aos de pessoas saudáveis⁵⁶. Entretanto, sua ação parece estar diminuída por possível resistência adquirida pelos receptores das células β do pâncreas a essa incretina, levando ao prejuízo de seu efeito insulíntrópico²⁰. Sendo assim, o indivíduo obeso portador de DM2 pode apresentar secreção diminuída de insulina em resposta à resistência ao GIP²¹.

Em indivíduos saudáveis, os efeitos de GIP dependem dos níveis de glicose plasmática. Mediante níveis elevados de glicose, o GIP aumenta a liberação de insulina e tem pouco efeito na liberação de glucagon; mas, frente ao jejum ou durante a hipoglicemia induzida por insulina, esse

hormônio estimula a liberação de glucagon sem afetar a secreção de insulina. Assim, em estado de euglicemia, o GIP pode atuar na diminuição ou elevação dos níveis de glicose plasmática, isto é, atuar como estabilizador de glicose plasmática^{68,69}.

Entretanto, evidências sugerem que pacientes portadores de DM2 apresentam comprometimento no efeito insulínico do GIP⁷¹. Este comprometimento é considerado determinante do efeito da incretina diminuído e de respostas inadequadas de glucagon pós-prandial observados em pacientes com DM2. Em pacientes com DM2, o GIP neutraliza a hipoglicemia induzida por insulina, provavelmente por meio de efeito glucagonotrópico mais potente^{69,71}.

Estudos mostraram que níveis sistêmicos aumentados^{21,72,73} ou diminuídos^{74,75} de GIP não se modificam após DGYR. Entretanto, existem dados contraditórios. Em pacientes obesos portadores de DM2 e pacientes euglicêmicos, a expressão gênica do GIP no sangue total aumentou após a DGYR, mas não após realização de banda gástrica ajustável. Em adição, o aumento de GIP foi mais expressivo em pacientes que apresentaram controle glicêmico pós-operatório, em relação aos que não apresentaram esse benefício. Isso sugere um possível envolvimento da incretina GIP na melhora da resposta glicêmica após DGYR⁷⁶. Em conjunto, essas observações tornam o papel do GIP, no controle glicêmico precoce após DGYR, incerto até o momento.

Peptídeo tirosina tirosina – PYY

O PYY, hormônio GI composto por 36 aminoácidos, recebeu a nomenclatura PYY por conter, em sua estrutura, a tirosina (Y) como o primeiro e o último composto de sua sequência de aminoácidos⁴³. Sua secreção ocorre em células enteroendócrinas do tipo L, quando nutrientes atingem as porções mais distais do intestino: no íleo, cólon e reto. Após sua secreção, a enzima DPP-IV converte o PYY (1-36), de sua forma orexígena, para o PYY (3-36), em forma anorexígena (Figura 3)⁷⁷.

Figura 3 - Processamento do peptídeo tirosina tirosina, por meio da transcrição e tradução do gene PYY
(Adaptado de Purtell & Herzog, 2013)⁷⁸

O PYY apresenta diversas ações que inibem o apetite, entre elas: ação inibidora de secreções gástricas e do pâncreas exócrino, inibição da motilidade gastrointestinal e atuação em receptores do tipo Y2 (Y2R) no hipotálamo, intimamente envolvidos na regulação central de apetite^{72,79,80}. Em períodos de jejum, a concentração de PYY plasmático encontra-se baixa. Porém, ela aumenta rapidamente após uma refeição mista, com pico após uma ou duas horas, e permanece elevada durante várias horas⁸⁰. A secreção de PYY é proporcional à densidade calórica dos alimentos consumidos, e níveis mais elevados do hormônio são observados após o consumo de lipídeos e carboidratos⁷⁹.

Há evidências de que os níveis pós-prandiais de PYY são reduzidos em pacientes obesos, em comparação com voluntários eutróficos, e que a infusão de PYY (3-36) reduz a ingestão calórica⁸¹. Estudos aleatórios, que incluíram grupos-controle, mostraram que, frente ao teste de refeição mista, as concentrações plasmáticas pós-prandiais de PYY são mais elevadas em indivíduos após DGYR do que em indivíduos eutróficos, com sobrepeso ou obesos e/ou submetidos a outros tipos de procedimentos bariátricos^{80,82,83}. De fato, após cirurgia bariátrica, as concentrações plasmáticas de PYY

mostram-se aumentadas no período pós-prandial, em curto e longo prazo, independente da técnica cirúrgica empregada²³.

O PYY atua de diversas maneiras no organismo. Entre elas, existe sua ação periférica sobre redução da lipólise e aumento da sensibilidade à insulina, decorrente da diminuição da concentração de ácidos graxos plasmáticos. Experimentalmente, o PYY (3-36) mostrou amplificar a ação da insulina na melhora do controle glicêmico, independentemente de hábitos alimentares e perda de peso²⁴.

Corroborando com achados anteriores, estudo recente, em pacientes obesos portadores de DM2 submetidos à DGYR, verificou que o bloqueio de receptores de GLP-1 e PYY, ao inibir suas ações, se associou ao aumento da ingestão de alimentos. Esses achados sugerem que o aumento dos níveis de GLP-1 e PYY, observado após DGYR, pode contribuir para a diminuição da ingestão de alimentos no pós-operatório⁸⁴.

Grelina

A grelina é um peptídeo de 28 aminoácidos, sintetizado majoritariamente por células A/X do estômago (principalmente no fundo gástrico) e, também, em quantidades menores pelo intestino delgado, que decrescem conforme aumenta a distância a partir do piloro. Grelina é, atualmente, considerada o único hormônio GI com função orexígena⁸³. O gene responsável pela produção não acilada desse hormônio é o preprogrelina (GHRL). A acilação da grelina ocorre pela ação da enzima grelina-o-aciltransferase (GOAT) (Figura 4) é fundamental para sua conexão ao receptor secretagogo do hormônio do crescimento (GHSR), a fim de atravessar a barreira hematoencefálica e exercer sua ação orexígena no hipotálamo^{85,86}.

Figura 4 - Processamento e acilação da grelina por meio da transcrição e tradução do gene GHRL⁸⁶

Grelina, também conhecida como "hormônio da fome", atua no hipotálamo como neuropeptídeo, ao aumentar apetite, secreção de ácido gástrico e motilidade GI, para regulação da ingestão alimentar. Sua concentração plasmática mantém-se alta nos períodos de jejum e nos períodos que antecedem as refeições^{85,87}.

Experimentalmente, a administração crônica de grelina causa hiperfagia e aumenta a adiposidade^{52,88}. Em adição, grelina também pode atuar na homeostase glicêmica, ao estimular o hormônio contrarregulador da insulina (glucagon), suprimir o hormônio sensibilizador de insulina (adiponectina), bloquear a sinalização hepática de insulina e inibir sua secreção por células β pancreáticas. Em conjunto, essas ações podem elevar a concentração plasmática da glicose^{16,52}.

Estudos demonstraram que a inativação do gene GHRL em ratos magros reduz a glicemia em jejum e produção de glicose endógena, além de aumentar os níveis de insulina estimulada pela glicose. Estes dados sugerem que a grelina limita a gliconeogênese e a síntese de glicogênio mediada por insulina. Além disso, a supressão da grelina em ratos ob/ob

(modelo de ratos obesos) reduziu a glicemia e insulina de jejum, e melhorou a tolerância à glicose^{88,89}.

Em humanos, estudos mostram que a concentração plasmática de grelina está inversamente correlacionada com o grau de adiposidade e varia em função do índice de massa corporal (IMC) e da mudança de peso corpóreo. Indivíduos obesos têm menor concentração plasmática de grelina, que pode se elevar frente à perda de peso induzida por dieta^{90,91}.

Após DGYR, a secreção da grelina, geralmente, é reduzida em pacientes obesos, provavelmente em decorrência da exclusão da maior parte do estômago (em que o hormônio é majoritariamente secretado) do trânsito alimentar. Sua diminuição pós-operatória pode estar associada à perda de apetite observada após o procedimento. Entretanto, a secreção de grelina é normalizada em curto prazo (aproximadamente, 2 meses após DGYR) e, assim, permanece em longo prazo^{92,93}.

Portanto, a grelina pode não ter papel essencial sobre a perda de peso progressiva observada nos primeiros 2 anos pós-DGYR. Se esse papel existir, poderia ser relevante apenas nos primeiros meses pós-operatórios. Essa afirmação é reforçada pelo fato de que nem todas as técnicas bariátricas são acompanhadas por níveis pós-operatórios elevados de grelina, embora ocorra perda de peso. Além disso, os efeitos da DGYR sobre a concentração plasmática de grelina ainda são controversos, bem como sua real correlação com intensidade de perda de peso e/ou melhora glicêmica⁹⁴⁻⁹⁸.

Glucagon

Glucagon é um hormônio composto por 29 aminoácidos transcrito pelo gene GCG nas células alfa das ilhotas pancreáticas de Langerhans, localizadas na porção endócrina do pâncreas. Sua produção ocorre em condições de jejum, sob a ação da insulina liberada por células beta adjacentes. Glucagon favorece o aumento da glicose plasmática ao promover glicogenólise e a gliconeogênese.

Poucos estudos avaliaram concentrações plasmáticas de glucagon após cirurgia bariátrica⁹⁹. Korner *et al.* não encontraram diferença na concentração plasmática de glucagon após teste de refeição mista entre mulheres submetidas à banda gástrica (n=9), DGYR (n=9) e controles saudáveis pareados por IMC (n=11). A exceção ocorreu apenas 180 min após o início do teste, em que as pacientes submetidas à DGYR apresentaram níveis significativamente mais baixos de glucagon em comparação ao controle¹⁰⁰. Por outro lado, três meses após DGYR, em relação ao pré-operatório, Umeda *et al.* encontraram aumento e diminuição das concentrações de glucagon em jejum e em resposta à refeição líquida, respectivamente¹⁰¹. Ainda se tem dúvidas sobre o papel do glucagon sobre a homeostase glicêmica após DGYR (Quadro 1).

Quadro 1 - Resumo dos achados da literatura sobre hormônios GI e glucagon após DGYR

Hormônio	DGYR
GLP-1	↑
GIP	↔↓↑
PYY	↑
Grelina	↔↓↑
Glucagon	↔↓↑

Legenda: ↔ nenhuma mudança, ↓ diminuição, ↑ aumento, mais de uma seta significa que os dados são conflitantes.

Adaptado de Dimitriadis *et al.* (2017)⁹⁹

2.4 Hipóteses que relacionam hormônios GI com homeostase glicêmica após cirurgia bariátrica

Apesar de alguns dados controversos, existe uma forte vertente na literatura em relacionar a homeostase glicêmica precoce observada após cirurgias bariátricas com hormônios gastrintestinais, traduzidas em diferentes hipóteses:

Hipótese do intestino proximal

A hipótese do intestino proximal, levantada por Rubino *et al.*, considera que o desvio cirúrgico do duodeno e jejuno proximal do trânsito alimentar evita a liberação de um ou mais sinais “diabetogênicos”, chamados de fatores “anti-incretina”, induzida por nutrientes em indivíduos susceptíveis^{10,99,102}. Dessa forma, a resistência à insulina (RI) é diminuída e a tolerância à glicose, restaurada¹⁰³. O GIP tem sido proposto como candidato potencial responsável pelo sinal “diabetogênico” desta hipótese, uma vez que ele apresenta baixo efeito insulínico em pacientes com DM2, ao se comportar, principalmente, como hormônio glucagonotrópico. Ocorre que os níveis pós-prandiais de GIP se mostram diminuídos após técnicas cirúrgicas que envolvem desvio da parte proximal do intestino delgado (local de maior produção de GIP). Assim, o estímulo para a produção de glucagon sinalizado por GIP pode diminuir e contribuir para a restauração da tolerância pós-cirúrgica à glicose, observada após cirurgias disabsortivas em pacientes portadores de DM2^{50,51}.

Hipótese do intestino distal

Essa hipótese sugere que a disponibilidade rápida e direta de nutrientes para o intestino distal resulta em aumento da produção de sinais “antidiabetogênicos”, como os mediados por hormônios insulínicos, contribuindo para a reversão da hiperglicemia^{40,81}. Principais candidatos incluem o PYY e o hormônio incretina GLP-1, pois as concentrações plasmáticas desses hormônios aumentam após cirurgias que realizam o desvio do intestino proximal²⁶.

As hipóteses descritas acima são ilustradas na Figura 5, que representa esquematicamente anatomia do estômago, duodeno e jejuno antes e após DGYR.

Figura 5 - Representação das hipóteses que relacionam hormônios GI com homeostase glicêmica após DGYR

Legenda: a) hipótese do intestino proximal. B) hipótese do intestino distal. '+++' representa aumento da liberação de sinais diabéticos (a) e antidiabéticos (b) '-' representa menor liberação de sinais diabéticos (a) e antidiabéticos (b) (adaptado de Knop, 2009)¹⁰³

Estudos clínicos que exploram a participação de hormônios gastrintestinais na promoção da homeostase glicêmica após DGYR, em sua grande maioria, restringem-se a avaliações de mudanças em suas concentrações sistêmicas. Nesse contexto, o real envolvimento do tecido gastrintestinal na modulação dos níveis circulantes de hormônios e incretinas, e melhora da homeostase glicêmica após DGYR permanece pouco compreendido em humanos. O avanço do conhecimento nessa área, por meio de estudos que incluam uma abordagem tecidual e sistêmica, pode auxiliar no desenho de terapias menos invasivas para o tratamento de DM2 associado à obesidade.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo primário

No estômago e intestino de mulheres portadoras de obesidade grave e diabetes mellitus tipo 2 submetidas à derivação gástrica em Y de Roux, avaliar a resposta de curto prazo da expressão de genes que transcrevem GLP-1, GIP, PYY e grelina e dos níveis sistêmicos desses hormônios, bem como, sua correlação com a homeostase glicêmica pós-operatória.

3.2 Objetivos secundários

- a) Comparar a expressão de genes que transcrevem GLP-1, GIP, PYY e grelina antes e após três meses de DGYR;
- b) Comparar o perfil sistêmico, em jejum e após refeição mista, de GLP-1, GIP, PYY e grelina antes e após três meses de DGYR;
- c) Testar a correlação da expressão de genes que transcrevem GLP-1, GIP, PYY e grelina, e os níveis sistêmicos desses hormônios com níveis circulantes de marcadores da homeostase glicêmica em mulheres obesas após 3 meses de DGYR.

Métodos

4 MÉTODOS

4.1 Local de desenvolvimento do estudo

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

4.2 Aspectos éticos

A presente pesquisa constituiu subprojeto de estudo temático financiado pela FAPESP (2011/09612-3; Anexo A)¹⁰⁴ e seu protocolo específico (como desmembramento do referido estudo temático) obteve aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) no ano de 2015, sob o nº 1.377.841 (Anexo B). Todas as pacientes incluídas neste protocolo manifestaram interesse, condições e disponibilidade de participação em todos os procedimentos realizados, e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo C).

4.3 Desenho do protocolo de estudo

As atividades previstas no protocolo do presente estudo foram desenvolvidas ao longo de 6 consultas no período pré-operatório e 3 no período pós-operatório, conforme ilustrado na Figura 6.

● Triagem	Identificação do perfil das pacientes pela história clínica e pelos exames laboratoriais
● Avaliação da indicação cirúrgica	Avaliação clínica do cirurgião em consulta ambulatorial e discussão da indicação cirúrgica pela equipe da divisão de cirurgia bariátrica e metabólica do HC FMUSP
● Seleção	Seleção das pacientes dentro do perfil determinado pelos critérios de inclusão – Assinatura do TCLE
● Composição corporal (descrição das pacientes)	Aferição de: peso, estatura, circunferência da cintura e do braço
● Teste de refeição	Coleta de plasma em jejum de 12h, e a cada 30 minutos após ingestão de dieta padrão (até 120 minutos). Preparo de alíquotas e armazenamento em -80°C
● Coleta de biópsias	Coleta de biópsias por enteroscopia anterógrada de duplo balão, congelamento imediato em nitrogênio líquido e armazenamento em -80°C
● DGYR	Intervenção cirúrgica: Derivação Gástrica em Y de Roux. Procedimento acompanhado pela aluna executante do projeto

Figura 6 - Desenho do protocolo de estudo, com descrição dos procedimentos gerais de exames e coletas de amostras em suas respectivas consultas

4.4 Seleção de pacientes

Entre fevereiro de 2011 a dezembro de 2014, foram selecionadas 20 mulheres adultas (18-60 anos), candidatas à derivação gástrica em Y de Roux (sem anel) por laparoscopia na Unidade de Cirurgia Bariátrica e Metabólica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Critérios de inclusão foram: diagnóstico

comprovado de DM2 [glicemia em jejum (GJ) $\geq 126\text{mg/dL}$ e hemoglobina glicada (HbA1c) $\geq 6,5\%$) ou uso de antidiabético oral e índice de massa corpórea (IMC) entre 35 e 50 kg/m^2 . Critérios de exclusão foram: pacientes em uso de insulina para controle de DM2, diagnóstico de disfunção hepática grave, diagnóstico de doenças que afetam a função da glândula tireoide, presença de hérnia abdominal ou umbilical, infecção gástrica por *H. pilory* e participação em outros protocolos de pesquisa intervencionistas.

4.5 Composição corporal e dados para caracterização das pacientes

Para caracterização da amostra e sua resposta à DGYR, foram coletados dados de idade, etnia, tempo de obesidade e de DM2 (< 5 anos de DM2 e > 5 anos de DM2) e medidas antropométricas. As medidas antropométricas do presente estudo foram aferidas no pré-operatório (T1) e pós-operatório de 3 meses (T2) de cirurgia. O peso atual (kg) foi mensurado em balança eletrônica para obeso (carga máxima 500 kg e divisão 100 gramas; Lucastec®, Brasil), com a paciente vestindo apenas roupas leves. A altura foi medida com auxílio de estadiômetro (Sanny®, *American Medical do Brasil*), com a paciente em pé, com os pés descalços, calcanhares unidos, costas eretas e os braços estendidos ao lado do corpo. IMC foi calculado usando a fórmula: $\text{peso}/\text{altura}^2$. As medidas de circunferências foram realizadas com uma fita métrica inelástica com escalas em cm. Para a medida da circunferência da cintura, devido à dificuldade de achar o ponto médio entre a crista ilíaca e última costela, utilizamos o ponto médio entre o rebordo costal inferior e a crista ilíaca (próxima a região umbilical)⁴¹.

4.6 Obtenção dos tecidos gástrico e intestinal

Biopsias gastrintestinais foram obtidas por meio de exame de enteroscopia de duplo balão (EDB), realizado no Serviço de Endoscopia

Gastrointestinal (HC-FMUSP). Todas as pacientes compareceram para o referido exame em jejum de 12 horas e sem uso prévio de qualquer medicação oral (exceto para hipertensão arterial), por 3-5 dias ou por até 7 dias, na dependência do uso específico de anticoagulantes.

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

Após atingir-se o nível desejado de anestesia, o enteroscópio de duplo-balão (modelo EN-450T5, Fujifilm CorporationTM, Tokyo-Japão) foi inserido por via oral (anterógrada) e introduzido ao longo do TGI (incluindo o estômago excluso, no pós-operatório, Figura 8)¹⁰⁵. O uso de tubo flexível (overtube modelo TS-13140, *Fujifilm Corporation*TM, Tokyo-Japão) com dois balões acoplados, e, sequencialmente, insuflados e esvaziados, permitiu que o enteroscópio progredisse ao longo do intestino delgado. No período pré-operatório, foram coletadas biopsias de mucosa gastrointestinal (aproximadamente, 15-20 mg) do estômago corpo alto ou estômago remanescente (ER), estômago corpo médio ou estômago excluso (EE),

duodeno, jejuno e íleo. Todas as biopsias foram imediatamente armazenadas, inicialmente, em nitrogênio líquido e, posteriormente, em freezer -80°C (REVCO™, Thermo Scientific Inc., MA-EUA). Os locais de coleta das biopsias intestinais foram marcados por tinta nanquim SPOT™, o que permitiu a visualização pós-operatória desse marcador e, assim, coletar biopsias próximas aos mesmos locais dos exames pós-operatórios (Figura 7).

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

No pós-operatório da DGYR, o enteroscópio percorreu todo o TGI até a enteroanastomose (Figura 8). Nesse momento, o enteroscópio foi guiado para os segmentos excluídos, em que foram coletadas biopsias de duodeno médio, próximo à marcação da tinta nanquim realizada no pré-operatório e, em seguida, quando possível, do estômago excluído – EE. Durante o retorno do enteroscópio dos segmentos excluídos, o aparelho foi guiado para a alça comum, em que foram coletadas amostras de jejuno distal/íleo proximal (local correspondente à marcação da tinta nanquim no pré-operatório). Após essa coleta, o enteroscópio é removido gradativamente a partir da porção distal do TGI médio, sendo efetuadas as biopsias na região da alça alimentar (jejuno médio, próximo à região marcada no pré-operatório com tinta nanquim). Finalmente, ao chegar ao estômago remanescente (ER), foram coletadas amostras desse último segmento.

Para identificação dos segmentos intestinais, foram consideradas as características macroscópicas de cada região e a extensão percorrida com o

enteroscópio. Todos os exames foram conduzidos pelo mesmo endoscopista, o que garantiu o seguimento de um padrão de avaliação baseado na experiência do profissional.

Figura 8 - Trajeto percorrido pelo enteroscópio no pós-operatório da DGYR (Adaptada de Kuga, 2007)¹⁰⁵

Legenda. A) duodeno excluído, local de coleta de amostras de duodeno médio; B) local de coleta do estômago excluído; C) local de coleta do íleo, durante o retorno do enteroscópio; D) alça alimentar, local de coleta do jejuno médio; E) local de coleta do estômago remanescente ou estômago corpo alto.

A distinção entre o ER e o EE se deu a partir da linha Z (transição do esôfago e estômago), sendo amostras de ER coletadas na parte superior do estômago, próximas à linha Z (cárdia), e amostras de EE na curvatura maior do estômago, entre a cárdia e a incisura angular. O duodeno, primeira porção do intestino delgado após o canal pilórico, possui entre 25 a 38 cm de comprimento e representa a parte mais curta do intestino delgado. As biopsias de duodeno no pré-operatório foram realizadas no duodeno médio, entre a segunda e terceira porção. O jejuno possui um número abundante de pregas de *Kerckring* (estruturas anatômicas circulares que atuam aumentando a superfície de contato para absorção de nutrientes), possui uma vascularização abundante e mucosa avermelhada, parede mais espessa e alça mais fixa, tendo cerca de 2,5 metros de comprimento e um

calibre de 2 a 4 centímetros. As biopsias de jejuno foram realizadas no jejuno médio, no mínimo, 1,5 metro do ângulo de Treitz, correspondente a, aproximadamente, 50 cm da anastomose gastrojejunal no pós-operatório da DGYR. O íleo foi identificado por sua menor espessura e vascularização (que lhe confere uma mucosa mais clara e lisa) e sua riqueza em nódulos linfoides (placas de Peyer)¹⁰⁶. As biopsias foram realizadas na região entre o jejuno distal e íleo proximal, aproximadamente, 50 cm da enteroanastomose até o limite máximo alcançado pelo aparelho.

4.7 Obtenção de amostras de plasma e soro

Amostras de plasma e soro foram obtidas de sangue periférico para a mensuração de concentrações sistêmicas de hormônios gastrintestinais (GLP-1, GIP, PYY, grelina) e de marcadores de homeostase glicêmica (HbA1c, insulina, peptídeo C e glucagon) em amostras de plasma ou soro, colhidas algumas semanas antes da DGYR (pré-operatório) e após 3 meses de DGYR. Especificamente, para a análise de hormônios GI e glucagon, as amostras de sangue foram coletadas em tubos contendo inibidor de protease (*Complete™ Mini, EDTA-free, Roche LifeScience, EUA*). Todas as coletas de sangue foram realizadas após 12 horas de jejum. Com intuito de eliminar a interferência da ação medicamentosa, as pacientes foram orientadas a suspender o uso de antidiabéticos orais por 4 dias, período superior à meia-vida dos medicamentos. Um teste de refeição mista foi realizado em sequência e novas coletas de sangue foram feitas após 30, 60, 90 e 120 minutos da ingestão oral de 200 ml dieta normocalórica, normolipídica e normoproteica (*Ensure™, Abbott, EUA*). As amostras coletadas foram centrifugadas a 2.800 rpm a 4°C, aliquotadas em microtubos de 500µl e armazenadas a -80°C até as análises bioquímicas.

4.8 Derivação gástrica em Y de Roux

Todas as pacientes foram submetidas à técnica cirúrgica de derivação gástrica em Y de Roux (DGYR) sem anel de silício, por meio de laparotomia, realizada na Unidade de Cirurgia Bariátrica e Metabólica (HC-FMUSP). A técnica de DGYR reduz o estômago ao realizar uma bolsa gástrica proximal com, aproximadamente, 30 mL de capacidade total, e exclui o restante do estômago, duodeno e parte do jejuno proximal do fluxo de nutrientes (Figura 9).

Figura 9 - Mudanças anatômicas induzidas pela DGYR: anatomia gastrointestinal normal e alterada após DGYR

Legenda. AL, alça alimentar; ABP, Alça biliopancreática; AC, Alça comum

A reconstrução do trânsito alimentar ocorre pela prática de anastomose gastrojejunal término-lateral entre a bolsa gástrica e o jejuno. Pratica-se a secção do jejuno proximal ou médio, medido a partir de 50 a 100 cm do ângulo de Treitz. A porção distal do jejuno é levada ao novo reservatório gástrico (anastomose gastrojejunal), e o trânsito alimentar passa a ser restaurado pela alça alimentar. A outra porção proximal que se encontra excluída do trânsito alimentar (estômago, duodeno e jejuno proximal) é anastomosada na alça jejunal que originou a anastomose gastrojejunal em uma região, aproximadamente, a 120 cm abaixo desta e, com isso, restaura-

se o trânsito biliodigestivo formando-se a alça biliopancreática. Esta enteroanastomose (Y de Roux) marca o ponto de convergência entre as duas alças intestinais, em que o alimento que vem pela alça intestinal alimentar se encontra com as secreções biliodigestivas que vêm da alça biliopancreática. A partir dessa junção, denominada alça intestinal comum, há maior absorção de nutrientes no restante do intestino distal.

Para o presente estudo, os tamanhos das alças biliopancreática e de alimentação foram padronizados em 50-60 cm e 100-120 cm, respectivamente.

4.9 Avaliação das respostas transcriptômica e sistêmica de hormônios gastrintestinais à DGYR

A avaliação das respostas transcriptômica e sistêmica de hormônios gastrintestinais à DGYR foi feita na população geral e separadamente, entre pacientes com remissão pós-operatória parcial ou completa de DM2. Na ausência de um consenso ou critério para classificar melhora da homeostase glicêmica em curto prazo após cirurgias bariátricas (menos que 1 ano), o presente estudo valeu-se do critério ADA 2009 para classificar suas 20 pacientes de acordo com sua resposta glicêmica à DGYR. O referido critério foi desenhado para identificar graus de remissão de DM2 após, no mínimo, 1 ano de cirurgia bariátrica livre de uso de medicamentos orais ou outros procedimentos antidiabéticos, a saber: Remissão Parcial (grupo RP) = HbA1c < 6,5% e glicemia de jejum (GJ) 100-125 mg/dL; Remissão completa (grupo RC) = HbA1c < 6% e GJ < 100 mg/dL¹⁰⁷. Adicionalmente, a correlação de genes teciduais e hormônios circulantes gastrintestinais com marcadores da homeostase glicêmica foi testada. Essa análise foi feita apenas na população geral, já que o tamanho amostral do presente estudo não é adequado para teste de correlações, ao dividirmos o número de pacientes entre grupos de grau de remissão de DM2.

4.10 Avaliação da expressão gênica gástrica e intestinal

Aproximadamente, 15-20 mg de tecido gastrointestinal, coletados de cada segmento intestinal e estômago, foram utilizados para extração e purificação do RNA total, com o Kit *RNeasy Plus Mini Kit* (QiagenTM, USA), seguindo as instruções do fabricante. A quantidade de material necessário foi determinada por meio de teste-piloto prévio. A quantificação, ou seja, a concentração de RNA total foi obtida pela leitura da absorbância nos comprimentos de onda de 260 e 280 nM, em espectrofotômetro NanoDrop (ND-1000TM *Spectrophotometer*, NanoDrop Technologies, USA), sendo a pureza avaliada pela razão 260/280. Foram consideradas amostras de pureza aceitável quando os valores dessa razão se situavam entre 1,8 e 2,1.

A análise de integridade do RNA foi averiguada por meio de aparelho de eletroforese, Bionalyzer (Model 2100; *Agilent Technologies*, CA, USA), que detecta biomoléculas pela fluorescência induzida pelo laser. A imagem de um eletroferograma foi gerada e a qualidade das amostras foi identificada pelo valor de RIN (*RNA Integrity Number*), o qual varia de 0 a 10 em ordem crescente de integridade. Para análise de expressão gênica pela técnica de microarray, foi considerado um RIN >7, conforme recomendado pelo fabricante (GeneChip 1.0 ST ArrayTM – Affymetrix, USA).

Análise transcriptômica global – microarray

Foi usado para análise de microarray o Genechip 1.0 ST Array (GeneChip 1.0 ST ArrayTM – Affymetrix, USA). Esse chip tem sequência de oligonucleotídeos representativos de, aproximadamente, 28.869 transcritos humanos⁸², incluindo genes precursores dos hormônios gastrintestinais GLP-1, GIP, PYY e grelina.

Análise transcriptômica alvo – RT-qPCR

A partir de 1 micrograma das amostras de RNA, obtiveram-se síntese e purificação de cDNA (DNA complementar), utilizando o kit comercial *High Capacity cDNA Reverse Transcription*TM Kits com inibidor de RNase (*Applied*

Biosystems, USA). Os genes gastrintestinais, GLP-1, GIP, PYY e grelina também foram avaliados pela técnica de reação de transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia de polimerase quantitativa (RT-qPCR). A RT-qPCR foi feita em duplicata biológica, usando o sistema de ensaio Taqman® (*Applied Biosystems*, USA), e sua leitura foi realizada no equipamento 7500 *Fast™ Real-Time PCR* (*Life Technologies*, USA). Beta-actina (ACTB) foi utilizada como controle endógeno da reação, selecionada em estudo-piloto prévio que também testou 18S, Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), beta 2 mioglobulina (B2M) para esse fim. A análise-alvo por RT-qPCR foi feita nas amostras das 20 pacientes do estudo e outras novas 5 pacientes, selecionadas pelos mesmos critérios de inclusão e submetidas ao mesmo procedimento cirúrgico, para confirmação dos resultados previamente obtidos por microarray em uma população externa.

4.11 Análises bioquímicas sistêmicas

As concentrações sistêmicas de HbA1c, insulina e peptídeo C foram mensuradas por método enzimático (glicose), cromatografia líquida (HbA1c) e eletroquimioluminescência (insulina e peptídeo-C), na Divisão de Laboratório Central do HC-FMUSP. Concentrações de glucagon, GLP-1, GIP, PYY e grelina foram mensuradas por técnica multiplex (LUMINEX – xMAP®), técnica com princípio similar ao ELISA sanduíche, que se baseia em três principais elementos da tecnologia xMAP:

- a) sondas com código de cor ou endereço espectral distintos, que permitem discriminação individual na suspensão multiplex. Essa propriedade do método viabiliza a detecção simultânea de inúmeras moléculas distintas em um único poço;
- b) o equipamento de leitura (Luminex 200) utiliza o princípio da citometria de fluxo com 2 lasers associados para medir diferentes moléculas ligadas à superfície das sondas:

- LED ou laser vermelho – 635nm – classifica as sondas em cores distintas, identificando os diferentes biomarcadores;
- LED ou laser verde – 532nm – ao excitar a ficoeritrina, gera um sinal proporcional à concentração do biomarcador na amostra;
- processador de sinal digital que administra os dados da fluorescência.

No presente estudo, a metodologia aplicada para o desenvolvimento da técnica multiplex (LUMINEX – xMAP®) consistiu no uso de microesferas coloridas fluorescentes (sondas) que se ligaram de forma covalente a anticorpos de captura. Os anticorpos de captura foram colocados diretamente contra o biomarcador desejado e, após uma série de lavagens para remover as proteínas não ligadas, anticorpos de detecção foram adicionados para criar o complexo sanduíche. A detecção final do complexo foi formada pela adição do conjugado de streptavidina-ficoeritrina, em que a ficoeritrina serviu como indicador fluorescente. Para esse ensaio, foram utilizadas placas de 96 poços, com controle negativo e um painel customizado com os analitos glucagon, GIP, GLP-1 ativo, PYY e Grelina ativa (MILLIPLEX® *Multiplex Assays Using Luminex®*)⁸³, analisados pelo *software Bio-plex Manager Software* (versão 6.0). Padronizou-se curva padrão para cada hormônio estudado (Figura 10):

Figura 10 - Curva padrão dos hormônios gastrintestinais estudados e de glucagon para sua dosagem plasmática

4.12 Análises estatísticas

Cálculo amostral

Uma amostra de 20 pacientes foi estimada por teste pareado não paramétrico de Mann-Whitney (Wilcoxon signed-rank test), considerando um poder de 90%, nível de significância de 5% e tamanho de efeito aproximado de duas vezes maior no pós-operatório (vs. pré-operatório). O tamanho do efeito foi estimado com base nos achados de Korner *et al.*, 2006, 2007; Holdstock *et al.* 2008¹⁰⁸⁻¹¹⁰, que mostraram uma variação pós-prandial dos hormônios GI duas vezes maior no período pós-operatório, em comparação com o período pré-operatório. O *software* utilizado para cálculo amostral foi o Gpower 3.1.9.2.

Análise dos dados

Variáveis contínuas foram expressas em mediana e intervalo interquartilico. As variáveis qualitativas foram expressas por meio das frequências absolutas e relativas (%). Gráficos de perfis medianos com

intervalos interquartílicos foram construídos para as variáveis de interesse entre os grupos, ao longo dos períodos estudados. O *software* R (*R Core Team*, 2016) foi utilizado para a realização de todas as análises, considerando-se nível de significância de 5%.

Para a comparação de grupos, foi utilizado o teste *t-Student*, para variáveis normais (teste de Anderson-Darling) e teste não paramétrico de *Mann-Whitney*, quando a hipótese de normalidade não foi verificada. Para cálculo da área sob a curva das variáveis hormonais, que reflete seu comportamento pré e pós-prandiais, foi utilizado método trapezoidal. O referido método foi aplicado calculando-se a área integrada sobre a linha de base [área incremental sob a curva (iAUC)] pela regra trapezoidal, com a média dos quatro valores basais subtraídos, usando o *software* Origin (versão 8.5; OriginLab Corp., Northhampton, MA). Para correlação de dados clínicos (glicose, insulina, peptídeo C e glucagon) com níveis teciduais de genes e plasmáticos de hormônios, foi utilizada correlação de Spearman, considerando o grau de correlação muito forte, forte e moderada como biologicamente relevantes, de acordo com o Quadro 2. Para correlação entre hormônios com mais de uma medida de tempo (teste de refeição mista), foi utilizada correlação para medidas repetidas¹¹¹. Essas análises permitiram averiguar se possíveis alterações dos níveis sistêmicos de hormônios gastrintestinais podem influenciar marcadores da homeostase glicêmica.

Quadro 2 - Grau de correlação segundo correlação de Spearman

0.9 a 1	Correlação positiva muito forte
0.7 a 0.9	Correlação positiva forte
0.5 a 0.7	Correlação positiva moderada
-0.7 a -0.5	Correlação negativa moderada
-0.9 a -0.7	Correlação negativa forte
-0,9 a -1	Correlação negativa muito forte.

Resultados

5 RESULTADOS

O presente estudo testou a hipótese (H1) de que, em mulheres obesas portadoras de DM2, DGYR altera a expressão gástrica e intestinal de genes que transcrevem GLP-1, GIP, PYY e grelina, e, consequentemente, modifica os níveis circulantes desses hormônios, que poderiam contribuir para a melhora da homeostase glicêmica. Portanto, os resultados obtidos no total da amostra e entre os subgrupos de pacientes com e sem remissão pós-operatória total de DM2 serão apresentados na seguinte ordem: 1. Transcrição gênica gastrointestinal, 2. Níveis sistêmicos de hormônios, e 3. Correlação de genes e hormônios com marcadores da homeostase glicêmica.

5.1 Características descritivas e de resposta clínica da amostra

Os dados descritivos das pacientes participantes do estudo, no total da amostra e nos subgrupos RP e RC, estão apresentados na Tabela 1. Nossa amostra foi composta exclusivamente por mulheres, predominantemente brancas e com distribuição similar quanto ao tempo e grau de obesidade e tempo de diabetes ($<$ ou $\geq$ 5 anos). Clinicamente, após três meses de DGYR, as pacientes apresentaram melhora do grau de obesidade, refletida pela diminuição significativa de peso, IMC e circunferência da cintura e do braço (Tabela 2). Também se observou melhora do perfil lipídico e de marcadores da homeostase glicêmica em nível sistêmico, que incluíram menores valores de glicose, HbA1c e peptídeo C (Tabela 3). Todas as variáveis observadas mostraram-se diferentes significativamente ao se comparar as medidas no período pré-operatório com o pós-operatório. No entanto, não se observaram diferenças ao se comparar em cada período (pré e pós-operatório) as variáveis medidas nos subgrupos RP e RC.

Tabela 1 -Dados descritivos de 20 pacientes obesas e diabéticas avaliadas antes e 3 meses após derivação gástrica em Y de Roux

Variável	Amostra Total(n=20)	Remissão Parcial(n=8)	Remissão Completa(n=12)
Idade (anos)	46,9 ± 6,2	49 ± 5,3	43,5 ± 5,4
Etnia Branca (%)	60,0	75,0	50,0
Etnia Parda (%)	25,0	0,0	42,0
Etnia Negra (%)	15,0	25,0	8,0
Mediana de Tempo de diabetes (anos)	4,5 (1,7-8,0)	4,0 (2-6)	6,0 (2-10)
Mediana de Tempo de obesidade (anos)	23 (3,0-51,0)	23,0 (22-24)	24,0 (13-32)
Tempo de diabetes < 5 anos (%)	50,0	50,0	50,0
Tempo de diabetes ≥ 5 anos (%)	50,0	50,0	50,0
Obesidade grau 2 T0 (%)	15,0	25,0	8,3
Obesidade grau 3 T0 (%)	85,0	75,0	91,7
Obesidade grau 1 T1 (%)	20,0	37,5	8,4
Obesidade grau 2 T1 (%)	40,0	12,5	58,3
Obesidade grau 3 T1 (%)	40,0	50,0	33,3

Legenda. T0, pré-operatório; T1, pós-operatório de 3 meses.

Tabela 2 -Dados de antropometria de 20 pacientes obesas e diabéticas avaliadas antes e 3 meses após derivação gástrica em Y de Roux

Variável	Amostra Total	Remissão Parcial	Remissão Completa	Valor p1	Valor p2
Peso Corporal (kg) T0	119,4 (103,6-122,6)	119,5 (108,3-128,7)	113,2 (102,3-121,1)	< 0,001*	0,230
Peso Corporal (kg) T1	95,6 (85,4-105,2)	99,8 (85,9-105,9)	90,4 (85,2-100,2)		0,218
IMC (kg/m ²) T0	46,4 (44,0-48,6)	46,2 (42,1-48,6)	46,4 (45,2-49,5)	< 0,050*	0,210
IMC (kg/m ²) T1	38,5 (36,3-40,6)	38,2 (34,0-40,6)	38,5 (36,6-40,8)		0,201
Circunferência da cintura (cm) T0	129,0 (119,3-139,3)	132 (121,3-140,5)	127 (119,3-134,5)	< 0,001*	0,386
Circunferência da cintura (cm) T1	115,0 (105,5-119,3)	117,5 (109,3-125,5)	113 (105,5-117,0)		0,255
Circunferência do braço (cm) T0	43,5 (40,8-46,3)	44,0 (41,0-46,3)	43,0 (40,0-46,3)	< 0,001*	0,466
Circunferência do braço (cm) T1	36,5 (34,8-40)	38,0 (35,0-39,3)	36,0 (34,0-40,3)		0,456

Legenda. Valores expressos em Mediana (Q25-Q75). T0, pré-operatório; T1, pós-operatório de 3 meses. p1 = T0 vs. T1; p2 = Remissão Parcial vs. Remissão Completa de diabetes mellitus tipo 2 no mesmo período

Tabela 3 - Dados clínicos de homeostase glicêmica de 20 pacientes obesas e diabéticas avaliadas antes e 3 meses após derivação gástrica em Y de Roux

Variável	n	Amostra Total	n	Remissão Parcial	n	Remissão Completa	Valor p1	Valor p2
Glicose T0 (mg/dL)	20	208,0 (170,5-271,8)	8	216,0 (194,0-307,5)	12	200,0 (170,5-248,8)	< 0,001 [#]	0,139 [#]
Glicose T1 (mg/dL)	20	100,0* (87,8-115,8)	8	111,5 (102,8-132,0)	12	91,5 (86,3-99,8)		0,015[#]
Insulina T0 (μU/mL)	20	15,7 (13,3-21,5)	8	12,9 (9,9-14,4)	12	18,3 (15,3-25,6)	< 0,001 [#]	0,008[#]
Insulina T1 (μU/mL)	20	7,9* (6,7-12,8)	8	8,2 (7,4-10,2)	12	7,7 (6,7-13,2)		0,423 [#]
Glucagon T0 (pg/mL)	17	133,5 (83,7-168,2)	6	132,4 (95,6-159,5)	11	147,3 (99,1-164-9)	< 0,001 [#]	0,46 [#]
Glucagon T1 (pg/mL)	17	37,5* (32,2-51,2)	6	36,3 (31,6-41,9)	11	44,6 (32,6-54,3)		0,381 [#]
Hemoglobina glicada T0 (%)	20	9,1 (8,1-10,5-12,8)	8	9,7 (8,4-10,6)	12	8,6 (7,9-10,3)	< 0,001 [*]	0,251 [*]
Hemoglobina glicada T1 (%)	20	6,2* (5,91-6,4)	8	6,1 (5,9-6,6)	12	6,2 (5,8-6,4)		0,131 [*]
Peptídeo C T0 (ng/mL)	20	4,2 (1,8-7,3)	8	3,5 (2,3-4,8)	12	4,4 (3,7-5,23)	0,001[*]	0,071 [*]
Peptídeo C T1 (ng/mL)	20	2,5* (1,5-3,9)	8	3,1 (2,4-3,9)	12	2,6 (2,3-3,3)		0,242 [*]
Colesterol total T0 (mg/dL)	20	191,5 (171,5-198,8)	8	192,0 (183,5-198-8)	12	182,0 (164,0-199,8)	0,009[#]	0,132 [*]
Colesterol total T1 (mg/dL)	20	144,5 (135,8- 165,0)	8	154,5 (143,0-165,0)	12	137,5 (130,3-160,8)		0,140 [*]
HDL T0 (mg/dL)	20	45,5 (39,8-51,0)	8	42,5 (39,8-48,8)	12	47,0 (37,8-52,0)	0,254 [*]	0,449 [*]
HDL T1 (mg/dL)	20	42,5 (36,5-51,0)	8	39,5 (35,5-48,0)	12	46,0 (37,3-51,0)		0,411 [*]
LDL T0 (mg/dL)	20	114,5 (101,5-123,5)	8	115,5 (108,8-129,0)	12	110,5 (93,5-120,8)	0,018[#]	0,103 [*]
LDL T1 (mg/dL)	20	85,0 (70,5-101,5)	8	86,5 (82,8-100,8)	12	72,0 (68,3-103,3)		0,131 [*]
VLDL T0 (mg/dL)	20	27,5 (21,5-32,3)	8	27,0 (21,5-37)	12	27,5 (21,3-31,3)	0,011[#]	0,304 [*]
VLDL T1 (mg/dL)	20	21,0 (18,5-22,0)	8	20,5 (18,5-22,8)	12	21,0 (18,3-22,0))		0,500 [*]
Triglicerídeos T0 (mg/dL)	20	136,0 (105,5-160,0)	8	135,5 (105,5-183,8)	12	136,0 (105,5-157,3)	0,012[#]	0,314 [*]
Triglicerídeos T1 (mg/dL)	20	103,0 (91,8-111,3)	8	102,5 (91,8-115,5)	12	104,5 (90,3-110,3)		0,485 [*]

Legenda. Valores expressos em Mediana (Q25-Q75). HDL, lipoproteína de densidade alta; LDL, lipoproteína de densidade baixa; VLDL, lipoproteína de densidade muito baixa T0, pré-operatório; T1, pós-operatório de 3 meses; p1 = T0 vs. T1; p2 = Remissão Parcial vs. Remissão Completa de diabetes mellitus tipo 2 no mesmo período; * teste t # Mann-Whitney.

No período pré-operatório, as curvas glicêmica e insulínica da amostra total foram características de pacientes diabéticos, com concentrações plasmáticas elevadas, e constantes de glicemia e sem distinção entre a primeira e segunda fase da secreção de insulina, respectivamente (Gráfico 1). Ainda para a amostra total de pacientes, a curva de glicose pós-operatória modificou-se, apresentando pico de hiperglicemia apenas após 30 minutos da ingestão de dieta mista e com valores significativamente menores do que os encontrados no período pré-operatório ($p \leq 0,050$). Essa observação ocorreu para ambos os grupos RP e RC quando comparados com o pré-operatório; entretanto, pacientes RC apresentaram glicemia significativamente menor que RP em todos os períodos avaliados em jejum e após teste de refeição (Anexo I). No pós-operatório, também ocorreu restauração da primeira fase da secreção de insulina na amostra total de pacientes, com aumento significativo de seus níveis após 30 minutos do teste de refeição mista e diminuição significativa ao seu término, em comparação com o pré-operatório. Entretanto, os valores pré-operatórios de insulina no subgrupo de pacientes RC foram significativamente maiores em jejum (0 min; $p = 0,002$), e menores nos tempos de 90 e 120 minutos do teste de refeição mista ($p < 0,05$; Anexo I) do que no subgrupo de pacientes RP.

Os níveis de glucagon em jejum também foram significativamente menores no período pós-operatório, em relação ao pré-operatório ($44,8 \pm 20,9$ vs. $135,2 \pm 55,8$ pg/mL, respectivamente; $p < 0,001$). A concentração de glucagon aumentou em ambos os períodos aos 30 minutos do teste de refeição mista, enquanto, aos 60 min, ela diminuiu significativamente entre o pré e pós-operatório (Anexo J). A média da AUC do glucagon no pós-operatório foi significativamente menor do que no pré-operatório ($10118,8 \pm 3516,9$ vs. $18650,9 \pm 9057,8$ pg/mL, respectivamente; $p = 0,001$). Não houve diferenças na curva de glucagon entre pacientes RP e RC.

Gráfico 1 - Curvas de glicose (A) e (B) e insulina (C) e (D) obtidas na amostra geral de pacientes e nos subgrupos de grau de remissão de diabetes mellitus tipo 2 durante teste de refeição mista, antes e após 3 meses de derivação gástrica em Y de Roux

Legenda. Pré-Op.: período pré-operatório; Pós-Op.: período pós-operatório de 3 meses.
 * diferença significativa ($p \leq 0,050$), quando comparado com o mesmo momento no período pré-operatório de acordo com o teste pareado de Mann-Whitney.

5.2 Expressão de genes gastrintestinais

A coleta de biopsias pareadas (nos períodos pré e pós-operatórios) de cada segmento gastrintestinal teve sucesso em 100% ($n = 20$) no ER, 100% ($n = 20$) no jejuno, 90% ($n = 18$) no íleo, 85% ($n = 17$) no duodeno e 35% ($n = 7$) no EE. Das biopsias pareadas obtidas do ER, apenas 6 apresentaram qualidade ($RIN > 7$) e quantidade ($> 100 \text{ ng}/\mu\text{L}$) de RNA necessárias para realização de microarray. Foi possível extrair RNA de boa qualidade em 4 amostras pareadas das 7 obtidas no EE. Nos demais segmentos intestinais, tivemos obtenção de RNA de qualidade em 16 amostras pareadas do jejuno, 14 do duodeno e 12 do íleo. Excluiu-se uma amostra do segmento EE por ocasião da interpretação de dados de microarray, por não compatibilidade metodológica.

Portanto, as análises transcriptômicas globais foram feitas em amostras pareadas de ER ($n = 6$), EE ($n = 3$), duodeno ($n = 14$), jejuno ($n =$

16) e íleo (n = 12). Do total de amostras pareadas usadas nas análises transcriptômicas globais, pertenceram ao grupo RC: (n = 5) ER, (n = 8) duodeno, (n = 11) jejuno e (n = 7) íleo. Quanto à análise-alvo por RT-qPCR, cujos critérios de adequação do RNA são menos rígidos, foi possível obter bons resultados na análise de expressão do GLP-1 no ER (n = 15), duodeno (n = 17), jejuno (n = 23) e íleo (n = 22); do GIP no ER (n = 15), duodeno (n = 18), jejuno (n = 17) e íleo (n = 17), do PYY no duodeno (n = 17), jejuno (n = 22) e íleo (n = 18); e grelina no ER (n = 19), EE (n = 8). Do total de amostras pareadas usadas nas análises transcriptômicas alvo, pertenceram ao grupo RC: (n = 10) ER, (n = 9) duodeno, (n = 12) jejuno e (n = 8) íleo.

Na amostra total de pacientes, a expressão de genes que transcrevem hormônios GI foi modificada após DGYR em todos os segmentos gastrintestinais estudados (Tabela 4). Após três meses da cirurgia, a análise global por microarray identificou aumento da expressão do gene GCG ($p < 0,001$), precursor do hormônio GLP-1, em todos os segmentos mantidos no trânsito intestinal, principalmente no jejuno. Essas alterações foram confirmadas pela análise-alvo por RT-qPCR, porém sem significância estatística. A análise global também identificou aumento da expressão do gene GIP ($p < 0,001$), precursor do hormônio GIP, no estômago remanescente. A análise-alvo confirmou os achados de microarray no estômago remanescente ($p = 0,0161$) e encontrou diminuição significativa da expressão de GIP também no duodeno ($p = 0,4786$) e jejuno ($p = 0,0334$). Ambas as abordagens, global e alvo do gene PYY, encontraram sua expressão aumentada no estômago remanescente e íleo, e diminuída no estômago excluído, duodeno e jejuno; porém sem significância estatística. Estas também identificaram aumento da expressão de GHRL ($p < 0,001$), gene precursor da grelina, no estômago excluído. Adicionalmente, a expressão de GHRL no duodeno foi identificada como diminuída pela técnica de microarray ($p < 0,001$) e diminuída no estômago remanescente, segundo ambas as técnicas, porém sem significância estatística.

Em relação à expressão gênica entre pacientes dos subgrupos RP e RC (Tabela 4), a análise transcriptômica global encontrou aumento pós-

operatório de GCG no ER, jejuno e íleo de pacientes RC, enquanto, em pacientes RP, esse aumento foi observado apenas no duodeno, em relação ao pré-operatório. Além disso, a análise transcriptômica alvo encontrou aumento pós-operatório de GIP no ER de pacientes RC e diminuição desse gene no jejuno de pacientes RP, em relação ao pré-operatório.

Tabela 4 - Alteração da expressão global (Microarray) e alvo (RT-qPCR) de genes que transcrevem hormônios envolvidos na homeostase glicêmica em diferentes segmentos gastrintestinais de mulheres obesas após 3 meses de derivação gástrica em Y de Roux

Gene	População	Estômago						Intestino					
		Remanescente		Excluso		Duodeno		Jejuno		Íleo			
		Global	Alvo	Global	Alvo	Global	Alvo	Global	Alvo	Global	Alvo		
GCG	Total	+0,818	+0,374	-0,064	-	+0,329	+0,494	+0,832	+0,027	+0,619	+0,674		
	RP	+0,302	-0,561	-	-	+1,547	+1,041	+0,533	+0,207	+0,503	+1,496		
	RC	+1,057	+0,999	-	-	-0,110	-0,411	+0,898	+0,457	+0,819	+0,422		
GIP	Total	+1,157	+2,706	+0,389	-	-0,250	-0,637	-0,232	-1,389	-0,221	-0,547		
	RP	+0,350	+0,103	-	-	-0,592	-0,645	-0,268	-1,641	-0,100	-0,652		
	RC	+1,359	+4,190	-	-	-0,113	-0,692	-0,227	-1,470	-0,248	-0,829		
PYY	Total	+0,203	-	-0,075	-	-0,044	-0,121	-0,067	-1,279	+0,163	+0,332		
	RP	-0,117	-	-	-	-0,004	+0,269	-0,131	-0,664	-0,019	-0,252		
	RC	+0,305	-	-	-	-0,005	+0,193	-0,037	-1,535	+0,223	+0,441		
GHL	Total	-0,065	-0,071	+1,309	+0,949	-0,198	-	-0,011	-	-0,038	-		
	RP	-0,591	+0,474	-	-	-0,375	-	-0,023	-	-0,010	-		
	RC	+0,033	-0,340	-	-	-0,138	-	+0,015	-	-0,090	-		

Legenda: Valores expressos em *fold change*. Em negrito estão destacadas alterações significativas da expressão tecidual de genes, comparando-se os períodos pré-operatório e pós-operatório de 3 meses ($p \leq 0,05$); GCG, gene precursor de GLP-1; GIP, gene precursor de GIP; PYY, gene precursor de PYY; GHL, gene precursor de grelina; RP, pacientes com remissão parcial de diabetes mellitus tipo 2; RC, pacientes com remissão completa de diabetes mellitus tipo 2

5.3 Concentrações sistêmicas de hormônios gastrintestinais em jejum e perante teste de refeição mista

Para avaliação da concentração plasmática dos hormônios GI, o teste de refeição mista foi realizado apenas em 17 pacientes, porque 3 delas apresentaram condições venosas inadequadas.

A comparação da curva de resposta dos níveis plasmáticos de GLP-1, GIP, PYY e grelina ao teste de refeição mista entre os períodos pré-operatório e pós-operatório encontra-se ilustrada no Gráfico 2. Em relação ao período pré-operatório, os níveis pós-operatórios do hormônio GLP-1 foram significativamente menores em jejum (4,66 vs. 2,64 pg/mL, respectivamente) e significativamente maiores aos 30 minutos do teste de refeição mista (7,57 vs. 28,46 pg/mL, respectivamente). No pós-operatório, houve diminuição significativa de GLP-1 aos 60 minutos do teste (7,90 pg/mL), em relação aos 30 minutos do teste, mas, ainda assim, seus níveis circulantes permaneceram acima dos níveis medianos encontrados no período pré-operatório (5,14 pg/mL). A concentração plasmática de GIP também se modificou após DGYR, com níveis significativamente menores em praticamente todos os momentos do teste de refeição mista ($p < 0,05$), em comparação aos valores encontrados no pré-operatório. A exceção ocorreu para o tempo de 30 minutos do teste, em que os níveis de GIP não apresentaram diferença significativa em relação ao mesmo momento do pré-operatório. Nenhuma alteração significativa foi observada na curva de resposta dos níveis plasmáticos de PYY e grelina ao teste de refeição mista após DGYR, em comparação com o pré-operatório.

Gráfico 2 - Concentração plasmática mediana de hormônios gastrintestinais em resposta ao teste de refeição mista, antes e após 3 meses de derivação gástrica em Y de Roux

Legenda: Dados expressos como mediana da concentração de GLP-1 (A), GIP (B), PYY (C) e grelina (D), com intervalo de 95% de confiança. Pré-Op., período pré-operatório; Pós-Op., período pós-operatório de 3 meses. * diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado com o mesmo momento no período pré-operatório de acordo com o teste pareado de Mann-Whitney.

Adicionalmente, a análise da área sob a curva (AUC) mostrou diferenças significativas entre os períodos pré e pós-operatórios para GLP-1 e GIP, insulina e glucagon (Tabela 5). As alterações sistêmicas de concentrações de hormônios gastrintestinais não foram diferentes entre pacientes RC e RP, ao se comparar os períodos pré e pós-operatórios. Além disso, após DGYR, os valores da AUC da glicose foram significativamente menores em pacientes RC do que nos do subgrupo RP.

Tabela 5 - Medidas descritivas da comparação da área sob a curva (AUC) dos níveis sistêmicos de hormônios gastrintestinais, glucagon e insulina antes e após 3 meses de derivação gástrica em Y de Roux

AUC	n	Amostra Total	n	Remissão Parcial	n	Remissão Completa	Valor p1	Valor p2
GLP1 T0	16	710,6 (591,2-1068,6)	6	650,7 (611,1-737,2)	10	769,4 (566,5-1109,1)	0,025#	0,437
GLP1 T1	16	1649,5 (1017,1-2137,1)	6	1528,1 (1178,5-2048,9)	10	1649,5 (911,1-2085,6)		0,479
GIP T0	16	112510,7 (94340,1-130166,7)	6	117471,2 (102369,4-135604,1)	10	111351,5 (83021,3-124870,3)	0,004*	0,281
GIP T1	16	83133,6 (63988,2-100878,5)	6	79285,3 (55885,1-110198,8)	10	84126,7 (71265,3-97928,0)		0,521
PYY T0	16	48755,0 (32234,4-75349,1)	6	35114,1 (23999,7-61984,2)	10	59940,1 (37319,8-86243,3)	0,594*	0,132
PYY T1	16	53618,7 (38486,1-66372,4)	6	46230,6 (37083,3-54620,6)	10	55446,5 (47791,3-66933,5)		0,246
Grelina T0	16	3745,1 (2941,8-6337,7)	6	4008,4 (3029,9-5948,5)	10	3745,4 (2973,4-5748,6)	0,597#	0,437
Grelina T1	16	3850,6 (2545,0-6454,9)	6	5512,2 (3686,2-9752,7)	10	3125,7 (2353,2-5714,9)		0,246
Glicose T0	16	30405,0 (28331,3-43815,0)	6	37297,5 (29756,3-45356,3)	10	29985,0 (27513,8-35692,5)	0,001#	0,849
Glicose T1	16	16537,5 (15157,5-21251,3)	6	20422,5 (17130,0-22623,8)	10	15772,5 (14122,5-16443,8)		0,011
Glucagon T0	16	17957,7 (13087,0-2120,3)	6	17193,5 (14297,2-19792,1)	10	18023,9 (12874,5-22530,4)	0,001 *	0,437
Glucagon T1	16	10782,4 (7839,8 - 11932,7)	6	9889,2 (8059,6-12845,9)	10	10782,4 (8034,0-11902,5)		0,521
Insulina T0	16	3744,8 (2703,4-4794,0)	6	2864,3 (2188,1-4189,5)	10	4302,0 (2973,8-5536,9)	0,028*	0,074
Insulina T1	16	4894,5 (3856,5-6908,6)	6	5238 (3836,6-6987,0)	10	4894,5 (4079,6-6342,0)		0,521

Legenda. Medidas expressas em picogramas/mililitro (pg/mL). T0, pré-operatório; T1, pós-operatório de 3 meses; n, número de pacientes; DP, desvio padrão; p1 = T0 vs. T1; p2 = Remissão Parcial vs. Remissão Completa de diabetes mellitus tipo 2 no mesmo período; * teste t # Mann-Whitney.

5.4 Correlação da expressão de genes que transcrevem hormônios gastrintestinais com marcadores bioquímicos da homeostase glicêmica

Não foram identificadas correlações significativas entre marcadores bioquímicos da homeostase glicêmica e expressão gênica no ER (Anexo D). No duodeno, observou-se correlação negativa moderada de GIP com glicose e HbA1c (%), e positiva moderada de GLP-1 com glicose (Tabela 6). No jejuno, observou-se correlação negativa moderada de GIP e grelina com insulina, e correlação positiva moderada de GLP-1 com insulina (Tabela 7). No íleo, observou-se correlação negativa moderada de GIP com insulina (Tabela 8). Não foi possível realizar análise de correlação de marcadores bioquímicos da homeostase glicêmica com expressão gênica entre pacientes RP e RC, devido ao pequeno número amostral obtido após divisão da amostra por subgrupos. Também não foi possível realizar essa análise no estômago excluso, devido ao pequeno número amostral obtido nesse segmento, mesmo ao considerar a população total de pacientes.

Tabela 6 - Análise de correlação de marcadores da homeostase glicêmica com a expressão dos genes gastrintestinais no duodeno de pacientes obesas com diabetes mellitus tipo 2 submetidas à derivação gástrica em Y de Roux

Marcador	Medida	GCG	GIP	PYY	GHRL
Glicose (mg/dL)	Coeficiente	+0,542	-0,580	+0,060	-0,421
	Valor de p	0,045	0,030	0,838	0,134
	n	14	14	14	14
HbA1c (%)	Coeficiente	+0,336	-0,694	+0,112	-0,382
	Valor de p	0,262	0,008	0,716	0,198
	n	13	13	13	13
Insulina (μU/mL)	Coeficiente	-0,123	+0,187	+0,107	+0,212
	Valor de p	0,704	0,561	0,741	0,507
	n	12	12	12	12
Peptídeo-C (ng/mL)	Coeficiente	-0,504	-0,033	+0,118	+0,498
	Valor de p	0,095	0,920	0,716	0,100
	n	12	12	12	12
Glucagon (pg/mL)	Coeficiente	-0,278	+0,242	-0,308	+0,283
	Valor de p	0,358	0,426	0,306	0,348
	n	13	13	13	13

Legenda. Dados avaliados por correlação de Pearson após 3 meses de derivação gástrica em Y de Roux. Valor positivo em negrito indica relação significativa direta, enquanto valores negativos em negrito indicam relação significativa inversa. GCG, gene precursor de GLP-1; GIP, gene precursor de GIP; PYY, gene precursor de PYY; GHRL, gene precursor de grelina; HbA1c, hemoglobina glicada; n, número amostral.

Tabela 7 -Análise de correlação de marcadores da homeostase glicêmica com a expressão dos genes gastrintestinais no jejuno de pacientes obesas com diabetes mellitus tipo 2 submetidas à derivação gástrica em Y de Roux

Marcador	Medida	GCG	GIP	PYY	GHRL
Glicose (mg/dL)	Coeficiente	-0,063	-0,312	-0,283	-0,186
	Valor de p	0,816	0,239	0,289	0,490
	n	16	16	16	16
HbA1c (%)	Coeficiente	-0,458	+0,182	-0,281	+0,376
	Valor de p	0,086	0,515	0,310	0,167
	n	15	15	15	15
Insulina (μU/mL)	Coeficiente	+0,613	-0,524	+0,298	-0,589
	Valor de p	0,020	0,045	0,281	0,021
	n	14	15	15	15
Peptídeo-C (ng/mL)	Coeficiente	+0,157	+0,044	+0,009	+0,177
	Valor de p	0,593	0,877	0,975	0,528
	n	14	15	15	15
Glucagon (pg/mL)	Coeficiente	+0,198	-0,053	+0,026	-0,048
	Valor de p	0,497	0,858	0,929	0,869
	n	14	14	14	14

Legenda. Dados avaliados por correlação de Pearson após 3 meses de derivação gástrica em Y de Roux. Valor positivo em negrito indica relação significativa direta, enquanto valores negativos em negrito indicam relação significativa inversa. GCG, gene precursor de GLP-1; GIP, gene precursor de GIP; PYY, gene precursor de PYY; GHRL, gene precursor de grelina; HbA1c, hemoglobina glicada; n, número amostral.

Tabela 8 -Análise de correlação de marcadores da homeostase glicêmica com a expressão dos genes gastrintestinais no íleo de pacientes obesas com diabetes mellitus tipo 2 submetidas à derivação gástrica em Y de Roux

Marcador	Medida	GCG	GIP	PYY	GHRL
Glicose (mg/dL)	Coeficiente	+0,158	-0,206	-0,210	-0,165
	Valor de p	0,624	0,521	0,513	0,608
	n	12	12	12	12
HbA1c (%)	Coeficiente	-0,291	+0,544	-0,346	+0,459
	Valor de p	0,385	0,084	0,297	0,155
	n	11	11	11	11
Insulina (μU/mL)	Coeficiente	+0,146	-0,600	+0,279	-0,274
	Valor de p	0,650	0,039	0,380	0,388
	n	12	12	12	12
Peptídeo-C (ng/mL)	Coeficiente	+0,052	-0,278	+0,490	+0,153
	Valor de p	0,872	0,381	0,106	0,634
	n	12	12	12	12
Glucagon (pg/mL)	Coeficiente	+0,241	-0,492	+0,118	-0,219
	Valor de p	0,474	0,124	0,729	0,518
	n	11	11	11	11

Legenda: Dados avaliados por correlação de Pearson após 3 meses de derivação gástrica em Y de Roux. Valor negativo em negrito indica relação significativa inversa. GCG: gene precursor de GLP-1; GIP: gene precursor de GIP; PYY: gene precursor de PYY; GHRL: gene precursor de grelina; HbA1c: hemoglobina glicada; n: número amostral.

5.5 Análises de correlação entre hormônios gastrintestinais sistêmicos e marcadores bioquímicos da homeostase glicêmica

Procurou-se correlacionar todos os hormônios gastrintestinais avaliados, bem como, as suas áreas sob a curva (AUC), com os marcadores bioquímicos da homeostase glicêmica: glicose, insulina, HbA1c%, peptídeo C e glucagon. No período pré-operatório, não foram identificadas correlações significativas. Já no período pós-operatório de três meses, encontrou-se correlação negativa moderada entre GLP-1 e HbA1C% ($\rho = -0,530$; $p = 0,029$); ou seja, quanto maior concentração de GLP-1 nesse período, menores os índices de HbA1C% (Tabela 9).

Tabela 9 -Correlação de marcadores bioquímicos de homeostase glicêmica com níveis plasmáticos de hormônios gastrintestinais em pacientes obesas com diabetes mellitus tipo 2 submetidas à derivação gástrica em Y de Roux

Marcador	Medida	GLP-1	GIP	PYY	Grelina
Glicose (mg/dL)	Coeficiente	0,069	-0,222	0,136	0,163
	Valor p	0,799	0,408	0,615	0,545
	n	16	16	16	16
HbA1c (%)	Coeficiente	-0,581	0,268	-0,247	0,018
	Valor p	0,018	0,315	0,357	0,948
	n	16	16	16	16
Insulina ($\mu\text{U/mL}$)	Coeficiente	-0,071	-0,069	0,199	-0,140
	Valor p	0,808	0,814	0,496	0,634
	n	14	14	14	14
Peptídeo-C (ng/mL)	Coeficiente	0,050	0,339	0,490	0,166
	Valor p	0,859	0,216	0,064	0,554
	n	15	15	15	15
Glucagon (pg/mL)	Coeficiente	0,253	-0,017	0,282	0,240
	Valor p	0,328	0,948	0,272	0,354
	n	17	17	17	17

Legenda: Valores obtidos em condições de jejum no pós-operatório de 3 meses. Em negrito, valor significativo.

5.6 Resumo dos principais achados

Após DGYR, ocorreram alterações significativas na expressão de *GCG*, *GIP*, *PYY* e *GHRL* ao longo dos segmentos GI estudados, em paralelo

à melhora significativa de marcadores bioquímicos plasmáticos da homeostase glicêmica. Resultados de destaque no estômago incluíram aumento da expressão de *GHRL* no segmento excluído após DGYR, mas os níveis sistêmicos de grelina não sofreram alterações significativas no pós-operatório. Por outro lado, modificações transcriptômicas ao longo do intestino foram parcialmente acompanhadas por alterações sistêmicas concordantes de hormônios GI e correlações com marcadores bioquímicos da homeostase glicêmica, conforme resumido no Quadro 3.

Quadro 3 - Resumo das modificações transcriptômicas ao longo do intestino e de níveis de hormônios gastrintestinais e sua correlação com marcadores da homeostase glicêmica

Variável	Gene	Hormônio	Correlação gene	Correlação hormônio
GLP-1	↑	↑	+Glicose +Insulina -HbA1c	HbA1c -
GIP	↓	↓	-Glicose -Insulina -HbA1c	↔
PYY	↔	↓	↔	↔
Grelina	↓	↔	-Insulina	↔

Legenda. ↑, aumento significativo; ↓, diminuição significativa; ↔, sem alteração significativa. Valores de correlação positivos (+) ilustram correlações significativas diretas; Valores de correlação negativos (-) ilustram correlações significativas inversas. Todas as correlações encontradas foram moderadas (*Sperman*).

As alterações teciduais de *GCG* e *GIP* ocorreram em paralelo com modificações sistêmicas concordantes desses hormônios. Nesse contexto, a correlação entre níveis de GLP-1 e GIP, bem como, desses hormônios com glicose e insulina foi testada. Níveis de GIP se correlacionaram moderadamente com glicose e insulina no pré-operatório ($\rho = +0,631$ e $\rho = +0,600$, respectivamente; $p < 0,001$) e no pós-operatório ($\rho = +0,759$ e $\rho = +0,723$, respectivamente; $p < 0,001$); enquanto correlações biologicamente significativas de GLP-1 com GIP ($\rho = +0,814$; $p < 0,001$), com insulina ($\rho = +0,699$; $p < 0,001$) e com glicose ($\rho = +0,625$; $p < 0,001$) ocorreram apenas no pós-operatório.

Discussão

6 DISCUSSÃO

6.1 Da contribuição científica

Hormônios gastrintestinais desempenham diversas atividades biológicas que podem influenciar a homeostase glicêmica e são cogitados como potenciais protagonistas da melhora/remissão de DM2 observada após cirurgias bariátricas, como DGYR. Entretanto, a maioria dos estudos sobre mecanismos envolvendo hormônios GI após DGYR restringe-se a observações de suas concentrações sistêmicas e acumulam alguns resultados controversos^{100,103,105}. Por exemplo, a concentração plasmática do GIP já foi reportada como aumentada, diminuída ou inalterada, após DGYR^{20,56}. À luz das evidências científicas atuais, não é possível estabelecer, portanto, a relação de hormônios gastrintestinais com homeostase glicêmica pós-operatória ou os mecanismos envolvidos nessa possível relação.

Nesse sentido, o presente estudo contribuiu para o melhor entendimento da influência que concentrações individuais de hormônios gastrintestinais podem ter sobre a glicemia após DGYR, ao correlacioná-las com marcadores da homeostase glicêmica. Além disso, avaliou, pela primeira vez, a resposta da expressão tecidual de genes que transcrevem hormônios gastrintestinais à DGYR em mulheres obesas, ao longo de todo o TGI. Essa abordagem permitiu verificar se alterações sistêmicas desses hormônios podem ser influenciadas por DGYR por meio da modificação da atividade transcricional dos genes que os codificam.

Alterações significativas na expressão de *GCG*, *GIP*, *PYY* e *GHRL* ocorreram ao longo dos segmentos GI estudados após DGYR, em paralelo à melhora significativa de marcadores plasmáticos da homeostase glicêmica. Essas alterações foram parcialmente acompanhadas por modificações sistêmicas dos hormônios por eles transcritos. Notadamente, aumento da

expressão de GCG ao longo do intestino foi acompanhado por aumento sistêmico de GLP-1 e essas alterações foram inversamente correlacionadas com níveis de HbA1c. Nossas observações sugerem um papel potencial da alteração da expressão de genes que transcrevem hormônios gastrintestinais induzida por DGYR sobre a homeostase glicêmica pós-operatória, principalmente ao impactar nos níveis de GLP-1.

6.2 Dos pontos fortes e limitações

O ineditismo do presente estudo consistiu na avaliação tecidual da expressão de genes que transcrevem hormônios gastrintestinais potencialmente associados com homeostase glicêmica, em todos os segmentos gástricos e do intestino delgado antes e após DGYR. A literatura científica mundial tem interesse por esse novo conhecimento, já que estudos em humanos disponíveis nessa área pouco exploram a biologia molecular de tecidos-alvo de DM2. Essa carência de dados se justifica pelo caráter invasivo envolvido na coleta de biopsias gastrintestinais, que consistiu no principal desafio técnico-científico a ser ultrapassado na presente pesquisa.

Para ultrapassar esse desafio, optou-se pelo emprego do método de EDB para a coleta de biopsias, já que a Unidade de Endoscopia Digestiva de nossa instituição é um centro de referência mundial no desenvolvimento da técnica. No nosso centro, nenhuma complicação foi relatada após 364 procedimentos de EDB, dos quais 112 incluíram coleta de biopsias¹¹².

Mudanças nos níveis sistêmicos de hormônios gastrintestinais e melhora da homeostase glicêmica são relatadas em curto prazo após DGYR, antes da perda significativa de peso. Portanto, o presente estudo buscou avaliar alterações na expressão de genes que transcrevem hormônios gastrintestinais e seus respectivos níveis sistêmicos o mais precocemente possível após a cirurgia, sem comprometer a segurança do paciente. De acordo com nosso grupo de especialistas em endoscopia, o período de três meses pós-operatórios seria o momento mais seguro e

precoce para realizar o exame de EDB para a coleta de biopsias gastrointestinais. Cabe destacar que o presente estudo logrou padronizar o tamanho das alças biliopancreática e alimentar resultantes do ato cirúrgico, já que variações nos seus tamanhos podem influenciar o grau de resposta metabólica à DGYR⁴²⁻⁴⁴.

As amostras de sangue foram coletadas no mesmo período que a coleta de biopsias para realizar o cruzamento de dados. Após três meses, pacientes submetidos à DGYR, em geral, começam a ingerir alimentos mais consistentes e maior volume de bebidas. Essa condição é importante para reduzir o risco de desenvolver síndrome de Dumping após ingestão da dieta líquida industrializada oferecida no teste da refeição. A alta densidade calórica da dieta por nós utilizada reflete seu elevado conteúdo proteico. A dieta possui quantidade adequada de carboidratos e tem sido utilizada em estudos após cirurgia bariátrica^{55,113}. A aplicação do teste de refeição mista se deu porque níveis de hormônios gastrintestinais após DGYR podem ser similares em jejum, mas sua resposta pós-prandial é frequentemente alterada.

A transcriptômica GI pós-operatória teve como controle os resultados mensurados, para cada paciente em particular, no período pré-operatório. Foi de interesse que as biopsias de material GI no pós-operatório fossem feitas em regiões próximas às biopsiadas no pré-operatório. Para isso, utilizou-se marcação com tinta nanquim nas regiões intestinais em que foi praticada a biopsia pré-operatória.

A adoção de técnica de pareamento teve como consequência a redução do número de biopsias intestinais aptas a serem avaliadas pela técnica de microarray. Adiciona-se que alterações anatômicas pós-operatórias limitam e/ou impedem o acesso aos segmentos gastrintestinais pela EDB, especialmente estômago excluído e duodeno. O acúmulo de líquido gástrico e de refluxo biliar duodenogástrico pode modificar a posição do estômago excluído, e dificultar o acesso ao órgão, ao lado de eventuais estenose e aderências de alças intestinais que podem restringir a passagem

do enteroscópio. Obesidade e excesso de gordura na região abdominal também podem dificultar o procedimento endoscópico.

No presente estudo, a qualidade e quantidade de RNAm obtidos nem sempre satisfaz os rigorosos critérios adotados para o desenvolvimento da técnica de microarray. Essa limitação foi observada, principalmente, no tecido gástrico, que é rico em enzimas capazes de degradar RNA. Mesmo em face dessas limitações, optou-se por manter todos os critérios de seleção de amostras ora descritos, para garantir a geração de dados de alta confiabilidade pelo método de microarray e para a realização adequada de comparações estatísticas.

No final, o total de amostras pareadas avaliadas foram 6 de ER, 3 de EE, 14 de duodeno, 16 de jejuno e 12 de íleo. Dada a elevada sensibilidade do método de microarray, de acordo com teste de Wilcoxon, uma amostra mínima de 7 pacientes tem poder de 80%, com nível de significância de 5%, um erro α - (erro tipo I) de 0,05 e erro β (erro tipo II) de 0,2, para detectar diferença de 0,756 para o *fold change* de expressão gênica, considerando desvio padrão de 0,556. Como obteve-se um número de amostras muito inferior a 7 no EE (correspondente ao estômago excluído no pós-operatório), não foi possível realizar análise de correlação entre marcadores da homeostase glicêmica e expressão gênica nesse segmento. Além disso, foi possível analisar apenas 6 amostras pareadas de ER, o que pode ter influenciado a ausência de correlações significativas entre marcadores da homeostase glicêmica e expressão gênica nesse segmento.

A técnica de microarray possibilitou verificar quão expressiva foi a alteração tecidual de genes que transcrevem hormônios gastrintestinais após DGYR, dentre todos os genes humanos conhecidos. Entretanto, a presença ou ausência de significância da alteração de determinado gene pela técnica não significa necessariamente que ele foi influenciado pela cirurgia. Quem responde essa questão é a técnica de RT-qPCR, que analisa a expressão gênica numa abordagem-alvo.

Distinta da técnica de microarray, a de RT-qPCR, fornece resultados confiáveis mesmo em amostras com menor quantidade e qualidade de

RNA_m. No presente estudo, a técnica de RT-qPCR foi aplicada em amostras pareadas obtidas de nossas pacientes e de 5 pacientes adicionais similares (que atenderam aos mesmos critérios de inclusão e exclusão), para a validação de alterações transcriptômicas em uma população externa. Portanto, o total de amostras pareadas avaliadas para alteração específica dos genes estudados foi: GLP-1 = 15 de ER, 17 de duodeno, 23 de jejuno e 22 de íleo; GIP = 15 ER, 18 de duodeno, 17 de jejuno e 17 de íleo; PYY = 17 de duodeno, 22 de jejuno e 18 de íleo; e grelina = 19 de ER e 18 de EE.

O uso combinado de microarray e RT-qPCR tem sido extensamente adotado pela literatura científica em estudos de expressão gênica. Nessas técnicas, em especial a técnica de *microarray*, obtêm-se melhores resultados quanto mais homogêneas forem as amostras entre os grupos comparados¹¹⁴. No objetivo de obter amostras mais homogêneas possíveis, além do pareamento de amostras, optamos por avaliar apenas mulheres. Cerca de 80% dos pacientes submetidos à cirurgia bariátrica na Unidade de Cirurgia Bariátrica do Hospital das Clínicas são do sexo feminino. Isso significa que nossas análises foram desenvolvidas em uma amostra clinicamente representativa.

Outra característica singular do presente estudo consistiu na análise da expressão tecidual de genes que transcrevem hormônios gastrintestinais e de níveis sistêmicos desses hormônios entre pacientes com remissão parcial e completa de DM2, bem como, sua correlação com HbA1c, insulina, peptídeo C e glucagon, como os principais marcadores da homeostase glicêmica. Para esse último propósito, optou-se pelo emprego do teste de correlação de *Sperman*, uma medida não paramétrica de correlação que testa a dependência estatística entre os *rankings* de duas variáveis.

6.3 Dos resultados

No presente estudo, mulheres obesas portadoras de DM2 apresentaram diminuição significativa de peso, IMC e circunferência da

cintura após 3 meses de DGYR (vs. pré-operatório). Também exibiram melhora significativa nos níveis de glicose, insulina, peptídeo C, HbA1c e glucagon, confirmando a efetividade da cirurgia em promover perda de peso e melhora glicêmica²⁶. De acordo com a análise transcriptômica gastrointestinal por microarray, esses benefícios alcançados cirurgicamente foram acompanhados por alterações significativas da expressão gastrointestinal dos genes *GCG* (no ER, jejuno e íleo), *GIP* (no ER) e *GHRL* (no EE e duodeno). Nossa análise transcriptômica-alvo por RT-qPCR confirmou apenas aumento significativo de *GIP* no ER e destacou diminuição significativa de *GIP* também no duodeno e jejuno, em relação ao pré-operatório. Entretanto, valores de RT-qPCR exibiram uma mudança semelhante em grau (valores aproximados de *fold changes*) e direção (aumento/diminuição) que valores significativos fornecidos por microarray.

Desacordos entre observações levantadas por microarray e RT-qPCR são comuns, e alguns autores definem "validação" de resultados de microarrays usando seu acordo quantitativo (grau semelhante de mudança) e qualitativo (direção) com RT-qPCR¹¹⁴⁻¹¹⁶. Na presente pesquisa, valores significativos de microarray foram, portanto, considerados biologicamente relevantes quando quantitativa ou qualitativamente similares aos valores de RT-qPCR, mesmo na ausência de significância estatística.

De acordo com nossos dados, correlações significativas entre marcadores da homeostase glicêmica e alterações de expressão gênica nos segmentos gástricos (EE e ER) não foram identificadas. Além disso, após DGYR, mudanças em níveis de expressão gênica gástrica nem sempre foram acompanhadas por mudanças concordantes dos níveis sistêmicos de seus hormônios transcritos. O pequeno número de amostras viáveis nesses segmentos pode ter contribuído para esses resultados; mas, aparentemente, alterações na expressão de genes no estômago não desempenharam um papel biológico direto na melhora glicêmica pós-operatória em nossas pacientes.

Por outro lado, alterações transcricionais de *GCG* e *GIP* no intestino, foram acompanhadas por alterações sistêmicas concordantes de GLP-1 e

GIP e níveis de GLP-1 se correlacionaram inversamente com níveis de HbA1c. Nossos dados de GLP-1 são coerentes com estudo prévio de DGYR, que encontrou aumento pós-operatório das concentrações plasmáticas desse hormônio em resposta à ingestão oral de glicose em pacientes portadores de DM2²¹. Distinto do observado no estômago, nossos dados sugerem que o intestino parece influenciar, ao menos parcialmente, níveis sistêmicos de hormônios com potencial impacto na homeostase glicêmica após DGYR. Chamou a atenção que a expressão intestinal de *GCG* e *GIP* se correlacionou com níveis de glicose e insulina. Essa correlação, entretanto, foi direta para *GCG* e inversa para *GIP*, o que pode refletir um possível efeito sinérgico entre os hormônios por eles transcritos na regulação da homeostase glicêmica.

Enquanto GLP-1 possui efeito insulínico, GIP pode desempenhar um papel insulínico ou glucagonotrópico. Comparados a indivíduos saudáveis, portadores de DM2 possuem níveis diminuídos do hormônio GLP-1, mas níveis comparáveis de GIP^{16,20-22,56}. Entretanto, a ação insulínica de GIP parece ser menor nesses pacientes, possivelmente por resistência adquirida de células β do pâncreas a essa incretina²⁰. Após DGYR, relata-se aumento de GLP-1, enquanto mudanças nos níveis de GIP são controversas¹⁰².

Se considerarmos um possível efeito sinérgico entre GLP-1 e GIP na regulação glicêmica, podemos admitir que, ao aumentar níveis depletados de GLP-1, DGYR poderia promover a produção de insulina e direcionar GIP predominantemente para sua ação glucagonotrópica. A existência decorrelação significativa de níveis de GLP-1 com GIP, glicose e insulina no período pós-operatório fortalece essa hipótese. Poderíamos lembrar, por similaridade, o controle da homeostase da pressão arterial por mecanismos sinérgicos para suprir adequadamente os tecidos de oxigênio, com a existência de controle fino da glicemia para suprir adequadamente os tecidos de energia. Nessa perspectiva, é factível propor que níveis diminuídos de GLP-1 em pacientes obesos diabéticos podem limitar a ação de GIP por

prejudicar a ação sinérgica de ambos os hormônios no controle da homeostase glicêmica.

De importância, para concluir o desenho da resposta transcriptômica e sistêmica de hormônios gastrintestinais à DGYR e sua correlação com homeostase glicêmica, sugerido por nossos dados, seria compreender a origem do aumento da expressão intestinal de *GCG* e dos níveis sistêmicos do hormônio por ele transcrito. Evidências atuais sugerem que níveis de grelina podem estimular a produção de GLP-1^{115,117,118}.

Coerentemente, um achado inédito do presente estudo foi aumento significativo da expressão do gene *GHRL* no EE após DGYR¹¹⁹. Essa alteração gênica apresentou correlação positiva muito forte com pico de GLP-1 aos 30 minutos do teste de refeição mista ($\rho = 1$; $p = 0,02$), conforme análise estatística adicional por correlação de *Spearman*. Aparentemente, a ausência prolongada do contato de alimentos com a mucosa gástrica exclusiva pode estimular a expressão pós-operatória de *GHRL*, e, conseqüentemente, a síntese de GLP-1. Vale lembrar que a grelina é um hormônio orexígeno e pode, em longo prazo, dificultar o controle de peso. Os níveis de grelina sérica tiveram aumento não significativo.

Chama a atenção que as mudanças nos níveis de GLP-1 presentemente observadas não foram diferentes entre pacientes dos subgrupos RP e RC. Por outro lado, somente pacientes RC apresentaram aumento significativo de *GCG* e *GIP* no ER, sugerindo possível aumento local dos hormônios por eles transcritos (GLP-1 e GIP). No estômago, níveis aumentados de GLP-1 e GIP em pacientes RC após DGYR poderiam, portanto, atuar como sinalizadores do esvaziamento gástrico e saciedade, contribuindo para a normalização glicêmica. Ocorre que existe relação estreita entre esvaziamento gástrico e glicemia que pode ser influenciada por GLP-1 e GIP¹²⁰.

De acordo com nossos dados, níveis circulantes aumentados de glicose e insulina parecem sinalizar a expressão diferenciada de *GCG* e *GIP* em diferentes segmentos do intestino. Entretanto, as alterações

transcriptômicas observadas após DGYR, provavelmente, advém das modificações anatômicas gastrintestinais resultantes da cirurgia que, possivelmente, modificam a resposta gênica a sinalizadores sistêmicos. Particularmente, a diminuição de *GIP* pode ocorrer em resposta aos procedimentos disabsortivos da DGYR, uma vez que a secreção desse hormônio se mostra reduzida em indivíduos com má absorção intestinal¹⁶. Outros fatores anatômicos podem ter influenciado a expressão dos demais hormônios, mas nossos dados não são suficientes para os identificar.

Outro achado de interesse, no presente estudo, que também pode estar associado ao papel de GLP-1 e GIP no controle da homeostase glicêmica em pacientes RC, é o local da expressão dos genes que os transcrevem ao longo do intestino e sua correlação com glicose ou insulina. Na amostra total, observou-se correlação de níveis sistêmicos de insulina e glicose com GLP-1 e GIP, de forma direta ou inversa. No entanto, a análise entre pacientes dos subgrupos RP e RC mostrou que os primeiros apresentaram apenas mudança em *GCG* e que esta ocorreu no duodeno, local excluído do trânsito alimentar e cuja expressão gênica se correlacionou diretamente com níveis de glicose. Por sua vez, pacientes RC apresentaram aumento significativo de *GCG* no jejuno e de GIP no íleo, locais mantidos no trânsito alimentar e cuja expressão gênica se correlacionou com níveis de insulina.

É possível que mulheres obesas possam apresentar perfis diferentes quanto à origem intestinal e sinalização de hormônios gastrintestinais, em que pacientes RP apresentariam influência duodenal de GLP-1 mediada por glicose e pacientes RC, influência dos segmentos jejuno e íleo mediada por insulina, tanto para GLP-1 quanto para GIP. A fonte dessas diferenças poderia incluir alterações epigenéticas que dificultariam a correta resposta transcriptômica de GLP-1 e GIP no intestino de pacientes RP, por exemplo.

As modificações presentemente encontradas nos níveis sistêmicos de GLP-1 e GIP após DGYR estão de acordo com dados descritos previamente pela literatura^{8,11,16,102}. Notadamente, alterações de GLP-1 foram as biologicamente mais importantes e similares às reportadas por outros

autores, principalmente no que tange seu aumento aos 30 minutos do teste refeição mista padrão. Ao utilizar antagonista competitivo de GLP-1 em indivíduos portadores de DM2, Shah *et al.* observaram aumento da glicemia, diminuição da secreção de insulina e redução significativa da resposta das células β após DGYR⁴⁰. Portanto, estudos apoiam que o GLP-1 atua no controle glicêmico pós-cirurgia, entretanto, os mecanismos não estão completamente elucidados. Em relação ao GIP, este apresentou redução significativa em todos os períodos do teste de refeição mista e, devido a dados controversos na literatura, necessita ser mais profundamente explorado. Novas vertentes apontam possível papel do GIP no metabolismo lipídico e perfil inflamatório que, de maneira indireta, poderia interferir na resposta glicêmica de pacientes após DGYR¹²⁰⁻¹²².

Quanto aos demais hormônios, as concentrações plasmáticas de PYY em jejum reduziram significativamente após DGYR, comparado ao pré-operatório, mas não após o teste de refeição mista. Além disso, este hormônio não apresentou correlações significativas com marcadores da homeostase sistêmica, indicando pouca participação ou nenhuma desse peptídeo nos efeitos glicêmicos alcançados pela cirurgia em mulheres obesas. Nossos achados se contrapõem a estudos prévios, que reportam aumento de concentrações plasmáticas pós-prandiais de PYY após DGYR, em relação a indivíduos eutróficos, sobrepeso ou obesos e/ou submetidos a outros tipos de procedimentos bariátricos^{82,83}. Grelina apresentou aumento não significativo no plasma e, também, não se correlacionou com melhora glicêmica; entretanto, novas pesquisas instigam-nos a procurar com mais afinco relações entre este hormônio e GLP-1, uma vez que se especula sua possível influência sobre a regulação da transcrição de GLP-1¹¹⁷.

As alterações da expressão intestinal de *GCG* e *GIP* em paralelo com alterações concordantes dos níveis de hormônios circulantes por eles transcritos nos permitem sugerir que a DGYR modula níveis sistêmicos de incretinas por alterar a expressão gênica intestinal. Muito embora essas alterações foram correlacionadas com melhora de marcadores da homeostase glicêmica, não houve diferença significativa dos níveis

plasmáticos destes hormônios entre pacientes RC e RP. Portanto, não é possível atribuir definitivamente um papel central de GLP-1 e GIP na remissão pós-operatória de DM2. Em artigo de posicionamento científico, Vidal sugere que aumento de GLP-1 e redução de GIP podem participar de maneira coadjuvante na melhora glicêmica, porém não são necessariamente os principais responsáveis pela homeostase glicêmica após DGYR¹²³. Entretanto, a aparente sinergia entre GLP-1 e GIP revelada por nossos resultados parece ser relevante no controle da homeostase glicêmica e trata-se de um novo olhar científico sobre esses hormônios gastrintestinais.

O presente estudo venceu importante desafio técnico-científico, na obtenção de tecido de diferentes seguimentos do TGI para análises de expressão gênica. Essa abordagem o destaca dos demais estudos disponíveis e foi relevante para suscitar os potenciais mecanismos envolvidos como alterações plasmáticas de GLP-1 após DGYR. Suas limitações incluem a pequena extensão das mudanças de *fold-change* observadas na expressão dos genes estudados, algumas sem significância estatística durante sua validação. A limitação do número de biópsias disponíveis para realização de análises de correlações entre grupos, dificultou a elaboração de hipóteses mais contundentes, no que se refere a origem intestinal da resposta à homeostase glicêmica.

Apesar dessas limitações, nossos dados nos permitiram concluir que DGYR modifica a expressão gastrintestinal de genes que transcrevem hormônios envolvidos na homeostase glicêmica. Particularmente, essas alterações no intestino foram acompanhadas por modificações concordantes de níveis sistêmicos das incretinas e se correlacionaram com marcadores de melhora da homeostase glicêmica. Em conjunto, nossos dados sugerem que DGYR pode influenciar a homeostase glicêmica por mecanismos que incluem modificação transcriptômica do TGI.

Conclusão

7 CONCLUSÃO

Nas condições da presente pesquisa, podemos concluir que, após três meses de DGYR, mulheres obesas portadoras de DM2 apresentaram mudanças da expressão gástrica e intestinal dos genes GCG, GIP, PYY e GHRL. Alterações da expressão de GCG e GIP no intestino ocorreram em paralelo com alterações concordantes dos níveis sistêmicos de seus hormônios transcritos e se correlacionaram com marcadores da homeostase glicêmica. Essas alterações não foram diferentes entre pacientes com ou sem remissão total pós-operatória de DM2, o que impede associar definitivamente níveis desses hormônios com homeostase glicêmica.

Anexos

8 ANEXOS

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

APROVAÇÃO

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

Carta datada de 21/01/11:

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

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

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

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

CAPPesq, 24 de Fevereiro de 2011

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

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo – SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br

8.2 Anexo B - Desmembramento do projeto temático pela CAPPesq

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

PROJETO DE PESQUISA

Título: ALTERAÇÕES NA EXPRESSÃO GÊNICA DO TECIDO GÁSTRICO, INTESTINAL E ADIPOSEO VISCERAL DE PACIENTES DIABÉTICOS TIPO 2 SUBMETIDOS À GASTROPLASTIA REDUTORA A Y-ROUX
Pesquisador Responsável: Dan Linetzky Waitzberg
Pesquisador Executante: Priscila Campos Sala
Finalidade Acadêmica: Mestrado
Instituição: HCFMUSP
Departamento: GASTROENTEROLOGIA

Versão: 5
CAAE: 19339913.0.0000.0068

NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Outros

Detalhe: Desmembramento

Justificativa: Prezado Prof. Alfredo José Mansur, Solicitamos a V.Sa., autorização para que o projeto supra-citado, já APROVADO pela CAPPesq, seja desmembrado em subprojeto de nova pesquisa, para fins de TESE de MESTRADO, tendo como Orientador Responsável: Prof. Dan Linetzky Waitzberg e a pesquisadora executante: Danielle Cristina Fonseca. A nova pesquisa será intitulada: EFEITO DA DERIVAÇÃO GÁSTRICA EM Y-ROUX NO PERFIL LIPÍDICO, GLICÍDICO E ALTERAÇÕES DOS HORMÔNIOS GASTROINTESTINAIS. O Termo de Consentimento será mantido como originalmente.

Data do Envio: 09/12/2015

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 4241

Número do Parecer: 1.377.841

Data da Relatoria: 16/12/15

Apresentação da Notificação: É submetido à apreciação deste CEP o subprojeto "Efeito da derivação gástrica em Y-Roux no perfil lipídico, glicídico e alterações dos hormônios gastrointestinais" da pesquisadora Danielle Cristina Fonseca, no projeto "Alterações na expressão de genes gástricos e intestinais em pacientes diabéticos tipo II após gastroplastia redutora a Y-Roux".

Objetivo da Notificação: É submetido à apreciação deste CEP o subprojeto "Efeito da derivação gástrica em Y-Roux no perfil lipídico, glicídico e alterações dos hormônios gastrointestinais" da pesquisadora Danielle Cristina Fonseca, no projeto "Alterações na expressão de genes gástricos e intestinais em pacientes diabéticos tipo II após gastroplastia redutora a Y-Roux".

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar
CEP 05403-010 - São Paulo - SP.
55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

Hospital das Clínicas da FMUSP**Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq****Avaliação dos Riscos e Benefícios:** O subprojeto não modifica a relação risco-benefício.**Comentários e Considerações sobre a Notificação:** Sem comentários adicionais.**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:** O termo de consentimento é o termo de consentimento original.**Recomendações:** Sem recomendações adicionais.**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:** Cientes, pela aprovação.**Situação do Parecer:** Aprovado.**Necessita Apreciação da CONEP:** Não.

São Paulo, 28 de Dezembro de 2015

Prof. Dr. Alfredo José Mansur
Coordenador
Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

8.3 Anexo C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

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

II - DADOS SOBRE A PESQUISA

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

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

1 – justificativa e os objetivos da pesquisa

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

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

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

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

3 – Desconfortos e riscos esperados

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

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

4 – Benefícios que poderão ser obtidos

Não há benefício direto para o participante.

5 – Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo

Não há procedimentos alternativos.

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

1 – Garantia de acesso

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

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

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

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

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

3 – Direito de confidencialidade

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

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

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

5 – Despesas e compensações

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

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

Todo material coletado será utilizado exclusivamente para esse estudo.

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

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

VI - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

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

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

_____ Data ____/____/____

Assinatura do paciente/representante legal

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

_____ Data ____/____/____

Assinatura do pesquisador

8.4 Anexo D - Análise de correlação de marcadores da homeostase glicêmica com a expressão dos genes gastrintestinais no ER

Análise de correlação de marcadores da homeostase glicêmica com a expressão dos genes gastrintestinais no estômago remanescente de pacientes obesas com diabetes mellitus tipo 2 submetidas à derivação gástrica em Y de Roux

Marcador	Medida	GCG	GIP	PYY	GHRL
Glicose (mg/dL)	Coeficiente	+0,036	+0,338	-0,472	+0,373
	Valor de p	0,945	0,512	0,344	0,467
	n	6	6	6	6
HbA1c (%)	Coeficiente	-0,487	-0,234	-0,154	-0,366
	Valor de p	0,405	0,705	0,805	0,544
	n	5	5	5	5
Insulina (μU/mL)	Coeficiente	+0,341	+0,567	-0,557	+0,903
	Valor de p	0,659	0,433	0,443	0,097
	n	4	4	4	4
Peptídeo-C (ng/mL)	Coeficiente	+0,115	+0,763	-0,069	+0,878
	Valor de p	0,885	0,237	0,931	0,122
	n	4	4	4	4
Glucagon (pg/mL)	Coeficiente	-0,300	-0,300	-0,100	+0,700
	Valor de p	0,624	0,624	0,873	0,188
	n	5	5	5	5

Legenda. Dados avaliados por correlação de Pearson após 3 meses de derivação gástrica em Y de Roux. Não houve correlações significativas. GCG, gene precursor de GLP-1; GIP, gene precursor de GIP; PYY, gene precursor de PYY; GHRL, gene precursor de grelina; HbA1c, hemoglobina glicada; n, número amostral.

8.5 Anexo E - Medidas descritivas e valor p da comparação dos momentos em cada instante do teste de refeição mista para hormônio GLP-1 entre pré e pós-operatório

Instante	Momento	N	Média	Mediana	DP	Mínimo	Máximo	Valor p*
0 min	T0	17	4,96	4,66	2,04	2,14	8,55	0,035
	T1	17	3,75	2,64	3,10	0,98	12,52	
30 min	T0	17	10,28	7,57	9,06	4,33	43,51	0,005
	T1	16	28,00	28,46	15,61	4,08	51,58	
60 min	T0	17	6,78	5,14	4,16	2,64	19,98	0,034
	T1	16	10,63	7,90	7,04	2,32	27,39	
90 min	T0	17	6,69	5,89	3,10	3,27	14,39	0,756
	T1	16	8,08	5,85	6,65	1,77	25,15	
120 min	T0	17	7,04	5,14	4,446	2,54	17,96	0,379
	T1	16	6,40	4,78	4,56	1,70	15,00	

*Teste não paramétrico de Wilcoxon

Legenda: T0: período pré-operatório; T1: período pós-operatório de 3 meses

8.6 Anexo F - Medidas descritivas e valor p da comparação dos momentos em cada instante do teste de refeição mista para hormônio GIP entre pré e pós-operatório

Instante	Momento	N	Média	Mediana	DP	Mínimo	Máximo	Valor p*
0 min	T0	17	319,54	244,77	245,84	64,76	935,29	0,009
	T1	17	144,15	154,05	80,65	22,55	265,64	
30 min	T0	17	1401,71	1519,00	497,90	234,46	2074,00	0,569
	T1	16	1276,70	1288,62	604,36	290,86	2508,50	
60 min	T0	17	1104,41	1164,00	470,82	278,45	1982,50	0,007
	T1	16	664,137	686,610	271,19	200,28	1076,00	
90 min	T0	17	875,53	743,56	415,05	276,14	1604,50	0,006
	T1	16	568,01	505,57	296,42	183,03	1105,00	
120 min	T0	17	642,07	560,76	331,85	129,85	1283,50	0,003
	T1	16	338,10	351,08	149,61	109,29	754,26	

*Teste não paramétrico de Wilcoxon

Legenda: T0: período pré-operatório; T1: período pós-operatório de 3 meses

8.7 Anexo G - Medidas descritivas e valor p da comparação dos momentos em cada instante do teste de refeição mista para hormônio PYY entre pré e pós-operatório

Instante	Momento	N	Média	Mediana	DP	Mínimo	Máximo	Valor p*
0 min	T0	17	409,07	283,13	282.92	91,42	949,03	0,001
	T1	17	118,09	119,23	91.022	7,02	349,31	
30 min	T0	17	588,17	424,89	348.932	214,338	1230,00	0,756
	T1	16	571,03	554,44	272.225	110,890	1082,00	
60 min	T0	17	504,48	389,94	341.892	159,93	1399,00	0,501
	T1	16	518,74	509,62	195.773	91,42	833,47	
90 min	T0	17	514,17	408,98	307.01	193,02	1158,50	0,535
	T1	16	405,22	408,35	169.90	110,89	697,44	
120 min	T0	17	490,91	457,25	313.659	158,495	1310,00	0,121
	T1	16	299,85	250,90	175.57	61,68	576,29	

*Teste não paramétrico de Wilcoxon

Legenda: T0: período pré-operatório; T1: período pós-operatório de 3 meses

8.8 Anexo H - Medidas descritivas e valor p da comparação dos momentos em cada instante do teste de refeição mista para hormônio Grelina entre pré e pós-operatório

Instante	Momento	N	Média	Mediana	DP	Mínimo	Máximo	Valor p*
0 min	T0	17	36,87	26,95	18,08,	19,57	72,71	0,831
	T1	17	44,54	32,83	43,09	16,70	187,85	
30 min	T0	17	41,09	31,02	25,80	17,12	125,26	0,918
	T1	16	46,82	33,65	46,58	14,81	189,20	
60 min	T0	17	40,29	35,46	18,55	17,96	81,83	0,717
	T1	16	53,86	29,88	64,81	12,93	260,21	
90 min	T0	17	35,76	28,25	14,70	19,18	64,05	0,408
	T1	16	53,34	28,55	52,36	18,60	204,85	
120 min	T0	17	37,22	31,19	15,17	18,60	66,55	0,438
	T1	16	40,92	25,66	44,20	8,01	188,90	

*Teste não paramétrico de Wilcoxon

Legenda: T0: período pré-operatório; T1: período pós-operatório de 3 meses

8.9 Anexo I - Medidas descritivas e valor p da comparação dos momentos em cada instante do teste de refeição mista para glicose e insulina, na amostra total de pacientes e nos subgrupos RP e RC

Variável	n	Amostra Total	n	Remissão Parcial	n	Remissão Completa	Valor p1	Valor p2
Glicose 0 min T0 (mg/dL)	17	217 (171,0 - 298,0)	6	262,5 (181,8 - 324,5)	11	210,0 (175,0-254,0)	<0,001	0,231
Glicose 0 min T1 (mg/dL)	17	94 (87,0-105,0)	6	110,0 (102,25 -125,3)	11	91,0 (84-96)		0,03
Glicose 30 min T0 (mg/dL)	17	279 (227,0 -363,0)	6	321,0 (240,0 - 368,3)	11	248,0 (226,0-294,5)	<0,001	0,325
Glicose 30 min T1 (mg/dL)	17	191 (167,0-215,0)	6	214,0 (205,5-227,75)	11	188,0 (158,5-193,0)		0,04
Glicose 60 min T0 (mg/dL)	17	286 (249,0-386,0)	6	336,0 (265,0-410,8)	11	265,0 (248,0-343,5)	<0,001	0,175
Glicose 60 min T1 (mg/dL)	17	156 (115,0-191,0)	6	179,5 (161,3-221,8)	11	115,0 (109,5-158,0)		0,01
Glicose 90 min T0 (mg/dL)	17	277 (240,0-376,0)	6	324,0 (246,5- 394,8)	11	277,0 (248,0- 331,5)	<0,001	0,273
Glicose 90 min T1 (mg/dL)	17	113 (98,0-156,0)	6	143,5 (130,3- 168)	11	106,0 (87,5-119,5)		0,04
Glicose 120 min T0 (mg/dL)	17	254 (237,0-337,0)	6	302,0 (231,3-376,5)	11	254,0 (243,0-295,0)	<0,001	0,344
Glicose 120 min T1 (mg/dL)	17	107 (89,0-123,0)	6	123,0 (111,0-149,3)	11	92,0 (82,5-109,0)	<0,001	0,03
Insulina 0 min T0 (µU/mL)	17	14,1 (13,1-18,4)	6	11,9 (8,4-13,9)	11	16,5 (13,6-22,2)	<0,001	0,02
Insulina 0 min T1 (µU/mL)	17	7,5 (4,2-8,6)	6	7,05 (5,6-7,9)	11	7,5 (4,2-10,4)		0,64
Insulina 30 min T0 (µU/mL)	17	33,8 (24,2-53,6)	6	26,75 (18,9-41,3)	11	38,5 (28,7-55,6)	<0,001	0,11
Insulina 30 min T1 (µU/mL)	17	78,5 (65,8-114,5)	6	71,65 (69,1-104,0)	11	78,7 (61,3-115,7)		0,60
Insulina 60 min T0 (µU/mL)	17	34,9 (27,6-55,5)	6	27,2 (23,0-37,2)	11	38,1 (32,9-61,1)	0,471	0,06
Insulina 60 min T1 (µU/mL)	17	50,8 (32,0-63,2)	6	52,35 (50,9-74,5)	11	40,8 (31,9-62,0)		0,13
Insulina 90 min T0 (µU/mL)	17	31 (23,6-47,3)	6	28,7 (19,1-32,1)	11	35,1 (27,3-58,6)	0,031	0,10
Insulina 90 min T1 (µU/mL)	17	15,4 (11,9-27,1)	6	23,15 (15,7-36,5)	11	13,9 (10,8-17,8)		0,05
Insulina 120 min T0 (µU/mL)	17	22,9 (19,1-35,7)	6	21,3 (14,6-27,8)	11	29,3 (19,2-43,3)	0,003	0,18
Insulina 120 min T1 (µU/mL)	17	10,3 (9,2-14,6)	6	13,1 (10,6-20,1)	11	9,6 (7,8-11,5)		0,05

Legenda. Valores expressos em Mediana (Q25-Q75). T0, pré-operatório; T1, pós-operatório de 3 meses; p1 = T0 vs. T1; p2 = Remissão Parcial vs. Remissão Completa de diabetes mellitus tipo 2 no mesmo período; Teste de Mann-Whitney.

8.9 Anexo J - Curva de glucagon frente teste de refeição mista, antes e após 3 meses de derivação gástrica em Y de Roux

Legenda: Pré-Op: período pré-operatório; Pós-Op: período pós-operatório de 3 meses. * diferença significativa quando comparado com o mesmo momento no período pré-operatório de acordo com o teste pareado de Mann-Whitney

Referências

9 REFERÊNCIAS

1. IDF 2017. The IDF Diabetes Atlas Eighth Edition 2017 provides the latest national, regional and global data on diabetes.
2. Pesquisa nacional de saúde: 2013: ciclos de vida: Brasil e grandes regiões / IBGE, Coordenação de Trabalho e Rendimento. Rio de Janeiro: IBGE; 2015. 92 p.
3. Gloy VL, Briel M, Bhatt DL, Kashyap SR, Schauer PR, Mingrone G, *et al.* Bariatric surgery versus non-surgical treatment for obesity: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ* 2013;347:f5934.
4. Schauer PR, Bhatt DL, Kirwan JP, Wolski K, Brethauer SA, Navaneethan SD, *et al.* Bariatric surgery versus intensive medical therapy for diabetes--3-year outcomes. *N Engl J Med.* 2014 May 22;370(21):2002-13.
5. Courcoulas AP, Goodpaster BH, Eagleton JK, Belle SH, Kalarchian MA, Lang W, *et al.* A Randomized Trial to Compare Surgical and Medical Treatments for Type 2 Diabetes: The Triabetes Study. *JAMA surgery.* 2014;149(7):707-15.
6. Wu G, Cai B, Yu F, Frang Z, Fu XL, Zhou HS, *et al.* Meta-analysis of bariatric surgery versus non-surgical treatment for type 2 diabetes mellitus. *Oncotarget.* 2016;7(52):87511-22.
7. Lingvay I, Guth E, Islam A, Livingston E. Rapid improvement in diabetes after gastric bypass surgery: is it the diet or surgery? *Diabetes Care.* 2013;36(9):2741-7.
8. Umeda LM, Silva EA, Carneiro G, Arasaki CH, Geloneze B, Zanella MT, *et al.* Early improvement in glycemic control after bariatric surgery and its relationships with insulin, GLP-1, and glucagon secretion in type 2 diabetic patients. *Obes Surg.* 2011 Jul;21(7):896-901.
9. Batterham RL, Cummings DE. Mechanisms of diabetes improvement following bariatric/metabolic surgery. *Diabetes Care.* 2016 Jun;39(6):893-901.
10. Thomas S, Schauer P. Bariatric surgery and the gut hormone response. *Nutr Clin Pract.* 2010;25:175-82.

11. Moran-Atkin E, Brody F, Fu SW, Rojkind M. Changes in GIP gene expression following bariatric surgery. *Surg Endosc.* 2013 Jul;27(7):2492-7.
12. Kong LC, Tap J, Aron-Wisnewsky J, Pelloux V, Basdevant A, Bouillot J, *et al.* Gut microbiota after gastric bypass in human obesity: increased richness and associations of bacterial genera with adipose tissue genes. *Am J Clin Nutr.* 2013;98:16-24.
13. Tamboli RA, Hajri T, Jiang A, Marks-Shulman PA, Williams DB, Clements RH, *et al.* Reduction in inflammatory gene expression in skeletal muscle from Roux-en-Y gastric bypass patients randomized to omentectomy. *PLoS One.* 2011;6(12):e28577.
14. Sala P, Torrinhas RS, Fonseca DC, Heymsfield S, Giannella-Neto D, Waitzberg DL. Type 2 diabetes remission after Roux-en-Y gastric bypass: evidence for increased expression of jejunal genes encoding regenerating pancreatic islet-derived proteins as a potential mechanism. *Obes Surg.* 2017 Apr;27(4):1123-7.
15. Sala P, Belarmino G, Torrinhas RS, Machado NM, Fonseca DC, Ravacci GR, *et al.* Gastrointestinal transcriptomic response of metabolic vitamin B12 pathways in roux-en-Y gastric bypass. *Clin Transl Gastroenterol.* 2017 Jan 5;8(1):e212.
16. Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology.* 2007 May;132(6):2131-57.
17. Sala PC, Torrinhas RS, Giannella-Neto D, Waitzberg DL. Relationship between gut hormones and glucose homeostasis after bariatric surgery. *Diabetol Metab Syndr.* 2014 Aug 16;6(1):87.
18. Fehmann HC, Göke R, Göke B. Cell and molecular biology of the incretin hormones glucagon-like peptide-I and glucose-dependent insulin releasing polypeptide. *Endocr Rev.* 1995 Jun;16(3):390-410.
19. Nguyen NQ, Debreceni TL, Bambrick JE, Bellon M, Wishart J, Standfield S, *et al.* Rapid gastric and intestinal transit is a major determinant of changes in blood glucose, intestinal hormones, glucose absorption and postprandial symptoms after gastric bypass. *Obesity (Silver Spring).* 2014 Sep;22(9):2003-9.
20. Gautier JF, Fetita S, Sobngwi E, Salaün-Martin C. Biological actions of the incretins GIP and GLP-1 and therapeutic perspectives in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Metab.* 2005 Jun;31(3 Pt 1):233-42.

21. LaFerrère B, Heshka S, Wang K, Khan Y, McGinty J, Teixeira J, et al. Incretin levels and effect are markedly enhanced 1 month after Roux-en-Y gastric bypass surgery in obese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2007 Jul;30(7):1709-16.
22. Meier JJ, Gallwitz B, Siepmann N, Holst JJ, Deacon CF, Schmidt WE, et al. Gastric inhibitory polypeptide (GIP) dose-dependently stimulates glucagon secretion in healthy human subjects at euglycaemia. *Diabetologia*. 2003;46:798-801.
23. Svane MS, Jørgensen NB, Bojsen-Møller KN, Dirksen C, Nielsen S, Kristiansen VB, et al. Peptide YY and glucagon-like peptide-1 contribute to decreased food intake after Roux-en-Y gastric bypass surgery. *Int J Obes (Lond)*. 2016 Nov;40(11):1699-1706.
24. Suzuki K, Simpson KA, Minnion JS, Shillito JC, Bloom SR. The role of gut hormones and the hypothalamus in appetite regulation. *Endocr J*. 2010;57:359-72.
25. Wren AM, Small CJ, Abbott CR, Dhillo WS, Seal LJ, Cohen MA, Batterham RL, Taheri S, Stanley SA, Ghatei MA, Bloom SR. Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats. *Diabetes*. 2001 Nov;50(11):2540-7.
26. Karra E, Yousseif A, Batterham RL. Mechanisms facilitating weight loss and resolution of type 2 diabetes following bariatric surgery. *Trends Endocrinol Metab*. 2010;21:337-44.
27. Zhang W, Zhu DQ, Qiu M. Hypothesis for resolution of diabetes after sleeve gastrectomy. *Med Hypotheses*. 2012;79:278-84.
28. World Health Organization. *Global report on diabetes*. Available from: <http://www.who.int/diabetes/global-report/en/>. Geneva: World Health Organization; 2016 p. 88.
29. SBD, 2016. *Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2015-2016*/Sociedade Brasileira de Diabetes. São Paulo: AC Farmacêutica; 2015.
30. World Health Organization. *Obesity and overweight-fact sheet*. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>, 2016.
31. Buchwald H, Estok R, Fahrbach K, Banel D, Jensen MD, Pories WJ, et al. Weight and type 2 diabetes after bariatric surgery: systematic review and meta-analysis. *Am J Med*. 2009 Mar;122(3):248-56.e5.
32. Powell MS, Fernandez AZ Jr. Surgical treatment for morbid obesity: the laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass. *Surg Clin North Am*. 2011 Dec;91(6):1203-24, viii.

33. Farag YM, Gaballa MR. Diabetes: an overview of a rising epidemic. *Nephrol Dial Transplant*. 2011 Jan;26(1):28-35.
34. Sjöström L, Lindroos AK, Peltonen M, Torgerson J, Bouchard C, Carlsson B, *et al*. Lifestyle, diabetes, and cardiovascular risk factors 10 years after bariatric surgery. *N Engl J Med*. 2004;351(26):2683-93.
35. Lindekilde N, Gladstone BP, Lübeck M, Nielsen J, Clausen L, Vach W, Jones A. The impact of bariatric surgery on quality of life: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev*. 2015 Aug;16(8):639-51.
36. Mason EE, Ito C. Gastric bypass in obesity. 1967. *Obes Res*. 1996 May;4(3):316-9.
37. Frühbeck G. Bariatric and metabolic surgery: a shift in eligibility and success criteria. *Nat Rev Endocrinol*. 2015 Aug;11(8):465-77.
38. Wilson JB, Pories WJ: Durable remission of diabetes after bariatric surgery:What is the underlying pathway? *Insulin*. 2010;(5):46-55.
39. Schauer PR, Burguera B, Ikramuddin S, Cottam D, Gourash W, Hamad G, *et al*. Effect of laparoscopic Roux-en Y gastric bypass on type 2 diabetes mellitus. *Ann Surg*. 2003 Oct;238(4):467-84. discussion 84-5.
40. Cummings DE. Endocrine mechanisms mediating remission of diabetes after gastric bypass surgery. *Int J Obes*. (Lond). 2009 Apr;33 Suppl 1:S33-40.
41. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. Diretrizes Brasileiras de Obesidade 2016/ABESO. 4. ed. São Paulo, SP.
42. Mahawar KK, Kumar P, Parmar C, Graham Y, Carr WR, *et al*. Small bowel limb lengths and roux-en-y gastric bypass: a systematic review. *Obes Surg*. 2016 Mar;26(3):660-71.
43. Valezi AC, Marson AC, Merguizo RA, Costa FL. Roux-en-Y gastric bypass: limb length and weight loss. *Arq Bras Cir Dig*. 2014;27 Suppl 1:56-8.
44. Nergaard BJ, Leifsson BG, Hedenbro J, Gislason H. Gastric bypass with long alimentary limb or long pancreato-biliary limb--long-term results on weight loss, resolution of co-morbidities and metabolic parameters. *Obes Surg*. 2014 Oct;24(10):1595-602
45. Cho JM, Kim HJ, Menzo EL, Park S, Szomstein S, Rosenthal RJ. Effect of sleeve gastrectomy on type 2 diabetes as an alternative treatment modality to Roux-en-Y gastric bypass: systemic review and meta-analysis. *Surg Obes Relat Dis*. 2015 Nov-Dec;11(6):1273-80.

46. Buchwald H, Avidor Y, Braunwald E, Jensen MD, Pories W, Fahrbach K, *et al.* Bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 2004;292(14):1724-37.
47. Yu H, Zheng X, Zhang Z. Mechanism of Roux-en-Y gastric bypass treatment for type 2 diabetes in rats. *J Gastrointest Surg*. 2013 Jun;17(6):1073-83.
48. Samat A, Malin SK, Huang H, Schauer PR, Kirwan JP, Kashyap SR. Ghrelin suppression is associated with weight loss and insulin action following gastric bypass surgery at 12 months in obese adults with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab*. 2013 Oct;15(10):963-6.
49. Lin E, Davis SS, Srinivasan J, Sweeney JF, Ziegler TR, Phillips L, Gletsu-Miller N. Dual mechanism for type-2 diabetes resolution after roux-en-Y gastric bypass. *Am Surg*. 2009 Jun;75(6):498-503.
50. Bhasker AG, Remedios C, Batra P, Sood A, Shaikh S, Lakdawala M. Predictors of remission of T2DM and metabolic effects after laparoscopic roux-en-y gastric bypass in obese indian diabetics-a 5-year study. *Obes Surg*. 2015 Jul;25(7):1191-7.
51. Ballantyne GH. Peptide YY (1-36) and peptide YY (3-36): Part II. changes after gastrointestinal surgery and bariatric surgery: part i: distribution, release and action appeared in the last issue. *Obesity Surgery*. 2006;16:795-803.
52. Drucker DJ. The role of gut hormones in glucose homeostasis. *J Clin Invest*. 2007 Jan;117(1):24-32.
53. Sinclair EM, Drucker DJ. Proglucagon-derived peptides: mechanisms of action and therapeutic potential. *Physiology (Bethesda)*. 2005 Oct;20:357-65.
54. Lee WJ, Chen CY, Chong K, Lee YC, Chen SC, Lee SD. Changes in postprandial gut hormones after metabolic surgery: a comparison of gastric bypass and sleeve gastrectomy. *Surg Obes Relat Dis*. 2011;7:683-90.
55. Wynne K, Bloom SR. The role of oxyntomodulin and peptide tyrosine-tyrosine (PYY) in appetite control. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2006 Nov;2(11):612-20.
56. Rubino F, Schauer PR, Kaplan LM, Cummings DE. Metabolic surgery to treat type 2 diabetes: clinical outcomes and mechanisms of action. *Annu Rev Med*. 2010;61:393-411.
57. Yabe D, Seino Y, Seino Y. Incretin concept revised: The origin of the insulinotropic function of glucagon-like peptide-1 - the gut, the islets or both? *J Diabetes Investig*. 2018 Jan;9(1):21-24.

58. Bloomgarden ZT. Incretin concepts. *Diabetes Care*. 2010 Feb;33(2):e20-e25.
59. Irwin DM. Molecular evolution of proglucagon. *Regul Pept*. 2001 Apr 2;98(1-2):1-12.
60. Bose M, Oliván B, Teixeira J, Pi-Sunyer FX, Laferrère B. Do incretins play a role in the remission of type 2 diabetes after gastric bypass surgery: What are the evidence? *Obes Surg*. 2009 Feb;19(2):217-29.
61. Holst JJ. Enteroglucagon. *Annu Rev Physiol*. 1997;59:257-71.
62. Nguyen NQ, Debrececi TL, Bambrick JE, Bellon M, Wishart J, Standfield S, et al. Rapid gastric and intestinal transit is a major determinant of changes in blood glucose, intestinal hormones, glucose absorption and postprandial symptoms after gastric bypass. *Obesity (Silver Spring)*. 2014 Sep;22(9):2003-9.
63. Rodieux F, Giusti V, D'Alessio DA, Suter M, Tappy L. Effects of gastric bypass and gastric banding on glucose kinetics and gut hormone release. *Obesity (Silver Spring)*. 2008 Feb;16(2):298-305.
64. Shah M, Law JH, Micheletto F, Sathananthan M, Dalla Man C, Cobelli C, et al. The contribution of endogenous glucagon-like peptide-1 to glucose metabolism after roux-en-Y gastric bypass. *Diabetes*. 2014 Feb;63(2):483-93.
65. Vetter ML, Wadden TA, Teff KL, Khan ZF, Carvajal R, Ritter S, et al. GLP-1 plays a limited role in improved glycemia shortly after Roux-en-Y gastric bypass: a comparison with intensive lifestyle modification. *Diabetes*. 2015 Feb;64(2):434-46.
66. Isbell JM, Tamboli RA, Hansen EN, Saliba J, Dunn JP, Phillips SE, et al. The Importance of caloric restriction in the early improvements in insulin sensitivity after roux-en-Y gastric bypass surgery. *Diabetes Care*. 2010 Jul;33(7):1438-42.
67. Campbell JE, Drucker DJ. Pharmacology, physiology, and mechanisms of incretin hormone action. *Cell Metab*. 2013 Jun 4;17(6):819-37.
68. Vilsbøll T, Krarup T, Madsbad S, Holst JJ. Both GLP-1 and GIP are insulinotropic at basal and postprandial glucose levels and contribute nearly equally to the incretin effect of a meal in healthy subjects. *Regul Pept*. 2003;114:115-21.
69. Christensen M, Vedtofte L, Holst JJ, 68. Vilsbøll T, Knop FK. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide: a bifunctional glucose-dependent regulator of glucagon and insulin secretion in humans. *Diabetes*. 2011;60:3103-9.

70. Meier JJ, Hücking K, Holst JJ, Deacon CF, Schmiegeler WH, Nauck MA. Reduced insulinotropic effect of gastric inhibitory polypeptide in first-degree relatives of patients with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2001;50:2497-504.
71. Chia CW, Carlson OD, Kim W, Shin Y-K, Charles CP, Kim HS, *et al*. Exogenous glucose-dependent insulinotropic polypeptide worsens post prandial hyperglycemia in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2009; 58:1342-9.
72. Jacobsen SH, Olesen SC, Dirksen C, Jørgensen NB, Bojsen-Møller KN, Kielgast U, *et al*. Changes in gastrointestinal hormone responses, insulin sensitivity, and beta-cell function within 2 weeks after gastric bypass in non-diabetic subjects. *Obes Surg*. 2012;22:1084-96.
73. Kashyap SR, Daud S, Kelly KR, Gastaldelli A, Win H, Brethauer S, *et al*. Acute effects of gastric bypass versus gastric restrictive surgery on beta-cell function and insulinotropic hormones in severely obese patients with type 2 diabetes. *Int J Obes (Lond)*. 2010;34:462-71.
74. Rodrigues MRS, Santo MA, Favero GM, Vieira EC, Artoni RF, Nogaroto V, *et al*. Metabolic surgery and intestinal gene expression: Digestive tract and diabetes evolution considerations. *World J Gastroenterol*. 2015 Jun 14;21(22):6990-8.
75. Korner J, Bessler M, Inabnet W, Taveras C, Holst JJ. Exaggerated glucagon-like peptide-1 and blunted glucose-dependent insulinotropic peptide secretion are associated with Roux-en-Y gastric bypass but not adjustable gastric banding. *Surg Obes Relat Dis*. 2008;3:597-601.
76. Moran-Atkin E, Brody F, Fu SW, Rojkind M. Changes in GIP gene expression following bariatric surgery. *Surg Endosc*. 2013;27:2492-7.
77. Ballantyne GH. Peptide YY (1-36) and peptide YY (3-36): Part I. Distribution, release and actions. *Obes Surg*. 2006 May;16(5):651-8.
78. Purcell L, Herzog H. Handbook of biologically active peptides (Second Edition); 2013. p. 1307-13.
79. Meek CL, Lewis HB, Reimann F, Gribble FM, Park AJ. The effect of bariatric surgery on gastrointestinal and pancreatic peptide hormones. *Peptides*. 2016 Mar;77:28-37.
80. Le Roux CW, Welbourn R, Werling M, Osborne A, Kokkinos A, Laurenus A, *et al*. Gut hormones as mediators of appetite and weight loss after roux-en-Y gastric bypass. *Ann Surg*. 2007;246:780-5.
81. Le Roux CW, Aylwin SJ, Batterham RL, Borg CM, Coyle F, *et al*. Gut hormone profiles following bariatric surgery favor an anorectic state, facilitate weight loss, and improve metabolic parameters. *Ann Surg*. 2006;243:108-14.

82. Morinigo R, Moize V, Musri M, Lacy AM, Navarro S, Marin JL, et al. Glucagon-like peptide-1, peptide YY, hunger, and satiety after gastric bypass surgery in morbidly obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91:1735-40.
83. Reinehr T, Roth CL, Schernthaner GH, Kopp HP, Kriwanek S, Schernthaner G. Peptide YY and glucagon-like peptide-1 in morbidly obese patients before and after surgically induced weight loss. *Obes Surg.* 2007;17:1571-7.
84. Steinert RE, Feinle-Bisset C, Asarian L, Horowitz M, Beglinger C, Geary N, et al. GLP-1, and PYY (3-36): Secretory controls and physiological roles in eating and glycemia in health, obesity, and after RYGB. *Physiol Rev.* 2017 Jan;97(1):411-63.
85. Müller TD, Müller TD, Nogueiras R, Andermann ML, Andrews ZB, Anker SD, Argente J. Ghrelin. *Mol Metab.* 2015 Mar 21;4(6):437-60.
86. Au CC, Furness JB, Brown KA. Ghrelin and breast cancer: emerging roles in obesity, estrogen regulation, and cancer. *Front Oncol.* 2017 Jan 9;6:265.
87. Murphy KG, Bloom SR. Gut hormones and the regulation of energy homeostasis. *Nature.* 2006;444:854-9.
88. Fedonidis C, Alexakis N, Koliou X, Asimaki O, Tsirimonaki E, Mangoura D. Long-term changes in the ghrelin-CB1R axis associated with the maintenance of lower body weight after sleeve gastrectomy. *Nutr Diabetes.* 2014;4:1-9.
89. Sun Y, Asnicar M, Saha PK, Chan L, Smith RG. Ablation of ghrelin improves the diabetic but not obese phenotype of ob/ob mice. *Cell Metabolism.* 2006;3:379-86.
90. Tschöp M, Weyer C, Tataranni PA, Devanarayan V, Ravussin E, Heiman ML. Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes.* 2001 Apr;50(4):707-9.
91. Erdmann J, Lippl F, Wagenpfeil S, Schusdziarra V. Differential association of basal and postprandial plasma ghrelin with leptin, insulin, and type 2 diabetes. *Diabetes.* 2005 May;54(5):1371-8.
92. Cummings DE, Weigle DS, Frayo RS, Breen PA, Ma MK, Dellinger EP, et al. Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *New Engl J Med.* 2002;346:1623e-30.
93. Uchida A, Zechner JF, Mani BK, Park WM, Aguirre V, Zigman JM. Altered ghrelin secretion in mice in response to diet-induced obesity and Roux-en-Y gastric bypass. *Mol Metab.* 2014;3:717e-30.

94. 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 Apr;110(4):571-84.
95. Santo MA, Riccioppo D, Pajecki D, Kawamoto F, de Cleve R, Antonangelo L, et al. Weight regain after gastric bypass: influence of gut hormones. *Obes Surg.* 2016 May;26(5):919-25
96. Frühbeck G, Rotellar F, Hernández-Lizoain JL, Gil MJ, Gómez-Ambrosi J, Salvador J, et al. Fasting plasma ghrelin concentrations 6 months after gastric bypass are not determined by weight loss or changes in insulinemia. *Obes Surg.* 2004 Oct;14(9):1208-15.
97. Pellitero S, Pérez-Romero N, Martínez E, Granada ML, Moreno P, Balibrea JM, et al. Baseline circulating ghrelin does not predict weight regain neither maintenance of weight loss after gastric bypass at long term. *Am J Surg.* 2015 Aug;210(2):340-4.
98. Abu Dayyeh BK, Jirapinyo P, Thompson CC. Plasma ghrelin levels and weight regain after Roux-en-Y gastric bypass surgery. *Obes Surg.* 2017;27:1031.
99. Dimitriadis GK, Randeva MS, Miras AD. Potential hormone mechanisms of bariatric surgery. *Curr Obes Rep.* 2017 Sep;6(3):253-65.
100. Korner J, Inabnet W, Conwell IM, Taveras C, Daud A, Olivero Rivera L, et al. Differential effects of gastric bypass and banding on circulating gut hormone and leptin levels. *Obesity (Silver Spring).* 2006;14(9):1553–61.
101. Umeda LM, Silva EA, Carneiro G, Arasaki CH, Geloneze B, Zanella MT. Early improvement in glycemic control after bariatric surgery and its relationships with insulin, GLP-1, and glucagon secretion in type 2 diabetic patients. *Obes Surg.* 2011;21(7):896-901.
102. Knop FK. Resolution of type 2 diabetes following gastric bypass surgery: involvement of gut-derived glucagon and glucagonotropic signalling? *Diabetologia.* 2009 Nov;52(11):2270-2276.
103. Rubino F, Forgione A, Cummings DE, Vix M, Gnuli D, Mingrone G, et al. The mechanism of diabetes control after gastrointestinal bypass surgery reveals a role of the proximal small intestine in the pathophysiology of type 2 diabetes. *Ann Surg.* 2006;244:741-9.
104. Sala P, Belarmino G, Machado NM, Cardinelli CS, Al Assal K, Silva MM, et al. The SURMetaGIT study: design and rationale for a prospective pan-omics examination of the gastrointestinal response to Roux-en-Y gastric bypass surgery. *J Int Med Res.* 2016 Dec;44(6):1359-75.

105. Kuga R. *Avaliação endoscópica e histopatológica do estômago excluído após cirurgia bariátrica* [Dissertação]. São Paulo, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2007.
106. Sobbotta J. *Atlas de anatomia humana*. 22. ed. São Paulo: Guanabara Koogan; 2006.
107. Buse JB, Caprio S, Cefalu WT, Ceriello A, Del Prato S, Inzucchi SE, *et al.* How do we define cure of diabetes? *Diabetes Care*. 2009;32:2133-5.
108. Korner J, Bessler M, Inabnet W, Taveras C, Holst JJ. Exaggerated glucagon-like peptide-1 and blunted glucose-dependent insulinotropic peptide secretion are associated with Roux-en-Y gastric bypass but not adjustable gastric banding. *Surg Obes Relat Dis*. 2007;3:597-601.
109. Holdstock C, Zethelius B, Sundbom M, Karlsson FA, Edén Engström B. Postprandial changes in gut regulatory peptides in gastric bypass patients. *Int J Obes (Lond)*. 2008;32:1640-6.
110. Korner J, Inabnet W, Conwell IM, Taveras C, Daud A, Olivero-Rivera L, *et al.* Differential effects of gastric bypass and banding on circulating gut hormone and leptin levels. *Obesity (Silver Spring)*. 2006;14:1553-61.
111. Bland JM, Altman DG. Calculating correlation coefficients with repeated observations: Part 1 - correlation within subjects. *BMJ*. 1994;310:446.
112. Kuga R, Safatle-Ribeiro AV, Ishida RK, Retes F, Uemura RS, Retes F, *et al.* Small bowel endoscopy using the double-balloon technique: four-year results in a tertiary referral hospital in Brazil. *Dig Dis*. 2008;26:318-23.
113. Goldfine AB, Mun EC, Devine E, Bernier R, Baz-Hecht M, Jones DB, *et al.* Patients with neuroglycopenia after gastric bypass surgery have exaggerated incretin and insulin secretory responses to a mixed meal. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Dec;92(12):4678-85.
114. Ness SA. Basic microarray analysis. strategies for successful experiments. In: *Methods in molecular biology*, vol. 316: Bioinformatics and Drug Discovery Edited by: RS. Larson Humana Press Inc., Totowa, NJ.
115. Johnstone DM, Riveros C, Heidari M. Evaluation of Different Normalization and Analysis Procedures for Illumina Gene Expression Microarray Data Involving Small Changes. *Microarrays*. 2013;2:131-52.
116. Morey JS, Ryan JC, Van Dolah FM. Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. *Biol Proced Online*. 2006;8:175-93.

117. Lindqvist A, Shcherbina L, Fischer AT, Wierup N. Ghrelin is a regulator of glucagon-like peptide 1 secretion and transcription in mice. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017 19 June;8:135.
118. Gagnon J, Baggio LL, Drucker DJ, Brubaker PL. Ghrelin is a novel regulator of glp-1 secretion. *Diabetes*. 2015 maio;64(5):1513-21.
119. Fonseca DC, Sala P, Singer J, Singer P, Torrinhas RS, Waitzberg DL. Upregulation of Ghrelin gene expression in the excluded stomach of obese women with type 2 diabetes after Roux-en-Y gastric bypass in the SURMetaGIT Study. *Obes Surg*. 2018 Jan 6.
120. Chang J, Rayner CK, Jones KL, Horowitz M. Diabetic gastroparesis and its impact on glycemia. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2010 Dec;39(4):745-62.
121. Góralska J, Rażny U, Polus A, Stancel-Możwiłło J, Shojnack M, Gruca A, *et al*. Pro-inflammatory gene expression profile in obese adults with high plasma GIP levels. *Int J Obes (Lond)*. 2017 Dec 13.
122. Griffo E, Cotugno M, Noso G, Saldalamacchia G, Mangione A, Angrisani L, *et al*. Effects of sleeve gastrectomy and gastric bypass on postprandial lipid profile in obese type 2 diabetic patients: a 2-year follow-up. *Obes Surg*. 2016;26:1247.
123. Vidal J, de Hollanda A, Jiménez A. GLP-1 is not the key mediator of the health benefits of metabolic surgery. *Surg Obes Relat Dis*. 2016 Jul;12(6):1225-9.

Apêndices

APÊNDICES

Apêndice A - Publicação sobre as alterações do gene da grelina em pacientes com DM2 submetidos à DGYR

Obesity Surgery
https://doi.org/10.1007/s11695-017-3098-3

BRIEF COMMUNICATION

Upregulation of Ghrelin Gene Expression in the Excluded Stomach of Obese Women with Type 2 Diabetes After Roux-en-Y Gastric Bypass in the SURMetaGIT Study

Danielle Cristina Fonseca¹ · Priscila Sala¹ · Joelle Singer^{2,3} · Pierre Singer^{2,3} · Raquel Susana Torrinhas¹ · Dan Linetzky Waitzberg¹

© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

Abstract

Background Mechanisms of type 2 diabetes remission (T2Dr) after Roux-en-Y gastric bypass (RYGB) in obese patients appear to involve gastrointestinal hormones.

Objective The objective of this study is to explore changes in ghrelin plasma levels and ghrelin gastrointestinal gene expression (GHRL) after RYGB, and their relationships to T2Dr.

Setting In 20 obese women with T2D, before and 3 months after RYGB, we assessed GHRL expression by microarray and quantitative RT-PCR in gastrointestinal biopsy samples and plasma levels of ghrelin.

Results After RYGB, GHRL expression increased in the excluded stomach ($p < 0.05$) with no change in other gastrointestinal sites. There were no significant changes in ghrelin plasma levels and no correlations with T2Dr.

Conclusions After RYGB, over-expression of GHRL gene occurs only in the excluded stomach with no correlation to T2Dr.

Keywords Roux-en-Y gastric bypass · Ghrelin · GHRL gene · Gene expression · Gastrointestinal tract

✉ Danielle Cristina Fonseca
daniellec_f_25@hotmail.com

Priscila Sala
sala.priscila@gmail.com

Joelle Singer
jsinger@clalit.org.il

Pierre Singer
psinger@clalit.org.il

Raquel Susana Torrinhas
torrinhas@uol.com.br

Dan Linetzky Waitzberg
dan@ganep.com.br

¹ Departamento de Gastroenterologia, Laboratório Metanutri (LIM 35), Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

² Sackler School of Medicine, Tel Aviv University, Tel Aviv, Israel

³ Endocrine Institute, Rabin Medical Center, Belinson Hospital, Jabotinsky Street, Petach Tikva, Israel

Abbreviations

GIT	Gastrointestinal tract
GLP-1	Glucagon-like peptide-1
GHRL	Ghrelin gene
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
RYGB	Roux-en-Y gastric bypass
T2D	Type 2 diabetes
T2Dr	Type 2 diabetes remission
BMI	Body mass index

Introduction

Roux-en-Y gastric bypass (RYGB) is an efficient surgical modality to control type 2 diabetes (T2D) [1]. Partial stomach exclusion and anatomical rearrangement of the intestines by the surgical procedure changes the secretion of gastrointestinal hormones and the postoperative response of hunger, increasing satiety, and improving glycemic control [2]. Type 2 diabetes remission (T2Dr)

occurs early after RYGB, even before significant weight loss [3].

Among the gastrointestinal hormones involved in T2Dr, glucagon-like peptide-1 (GLP-1) seems to play an important role [2]. Ghrelin has a regulator function on GLP-1 secretory response to nutrients [4], but its role in T2Dr is still controversial [2] and there are conflicting reports about the changes in ghrelin levels following RYGB [5]. One study reported that there were significantly lower levels of GHRL mRNA in the gastrointestinal tract (GIT) after RYGB [6].

The SURMetaGIT study was designed to prospectively determine transcriptional changes in the GIT in relation to T2Dr after RYGB [7]. We previously reported that only patients with total T2Dr after RYGB developed increased expression of jejunal genes encoding regenerating pancreatic islet-derived proteins 3 gamma [8]. The present study explores changes in the GIT expression of genes encoding ghrelin (GHRL) and plasma concentrations of ghrelin after RYGB and their relation to T2Dr.

Materials and Methods

The detailed methodology is provided in the SURMetaGIT study [7].

Subjects and Procedures

Twenty obese women (age 18 to 60 years) with T2D, who were admitted for elective RYGB at the Gastrointestinal Surgery Division of the HC-FMUSP, participated in the study. Inclusion criteria and exclusion criteria were described previously [7]. Patients underwent standardized RYGB with biliary-pancreatic loops (50 to 60 cm) and feed handles (100 to 120 cm). The size of the pouch was approximately 30 ml. All tissue and systemic analyses were performed before and 3 months after the surgical procedure to ensure patient safety for biopsy collection within an early postoperative period.

Biopsy Sample Collection

Serial biopsies (10 to 15 mg) of the mucosa of the remnant stomach (RS), excluded stomach (ES), duodenum, jejunum, and ileum were performed during double-balloon enteroscopy via oral access under deep sedation before and 3 months after RYGB. Preoperative intestinal biopsy sites were marked with Spot™ carbon black ink (GI Supply, Inc., Camp Hill, PA, USA), allowing postoperative sample collection from the same sites.

Transcriptomic Analyses

RNA was extracted from intestinal biopsy samples using the RNeasy plus kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). Matching pre- and postoperative samples with ≥ 100 ng/ μ l RNA and RNA integrity numbers ≥ 7 were analyzed using a microarray technique. RNA concentration and quality were assessed with an ND-1000™ spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) and an Agilent 2100 Bioanalyzer™ system (Agilent Biotechnologies, Santa Clara, CA, USA), respectively. Expression of the GHRL gene was assessed with the Genechip Human Gene 1.0 ST Array (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA, USA), according to the manufacturer's recommendations. Array quality was checked by boxplot, correlation, and principal component analysis using the *r/bioconductor* program (www.Bioconductor.org). The Rank products (RP) [9] method was used to select differentially expressed genes with $p < 0.05$, after correction for false discovery rate (FDR). Altered gene expression levels were validated by quantitative RT-PCR using Taqman gene expression assays (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's recommendations. B-actin was used as the reference gene, based on the results of pilot studies testing different approaches to identify the most suitable reference for our tissue samples.

Measurement of Plasma Ghrelin

Ghrelin concentration was measured in plasma samples before the RYGB and 3 months, postoperatively. A meal test was performed and the ghrelin samples were collected in fasting period and following oral intake of 200 ml of a standard meal (Ensure™, Abbott, Lake Forest, IL, USA) after 30, 60, 90, and 120 min. The acyl ghrelin dosage was performed by the Multiplex™ technique (Merck Millipore, USA) in biological duplicate. Plasma was collected and treated with protease inhibitor (Complete™ mini, EDTA free, Lifescience, Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, USA).

T2D Remission (T2Dr) Assessment

One year after RYGB, we applied the American Diabetes Association (ADA 2009) [10] criteria to identify patients with (*R*, responders) and without (*NR*, non-responders) complete T2Dr (HbA1C $< 6\%$ (< 42 mmol/mol) and fasting glucose (FG) < 100 mg/dL (5.6 mmol/L) in the absence of oral antidiabetic medication use or other antidiabetic procedure for at least 1 year).

Table 1 Changes in ghrelin gene (GHRL) expression in gastrointestinal segments of obese women with type 2 diabetes 3 months after Roux-en-Y gastric bypass

	Remnant stomach (RS)	Excluded stomach (ES)	Duodenum	Jejunum	Ileum
GHRL microarray	-0.0654 (<i>n</i> = 6)	+1.3089 (<i>n</i> = 3)	-0.1977 (<i>n</i> = 14)	-0.0107 (<i>n</i> = 16)	-0.0380 (<i>n</i> = 12)
GHRL RT-qPCR	-0.0714 (<i>n</i> = 19)	+0.9488 (<i>n</i> = 8)	NP	NP	NP

Negative and positive values indicate decreased and increased expression, respectively. Bold values indicate significant changes ($p \leq 0.05$)

NP validation by RT-qPCR not performed

Sample Size and Statistical Analysis

Sample size of 20 patients was estimated using parametric (one-way analysis of variance) and the nonparametric Wilcoxon signed-rank test based on this aim, assuming 80% power and a significance level of 5%. Size effect was calculated considering approximately twice the level of postprandial gastrointestinal hormone variation in the early postoperative period, compared with the preoperative period, based on data from previous studies. The Mann-Whitney test was applied for data comparisons among studied periods. Pearson correlation was applied to assess the correlation between ghrelin plasma levels, gene expression, and weight loss [11–13]. Descriptive data were reported as the median (minimum–maximum), using the R software (version 3.1.3, 2015; r core team, Vienna, Austria).

Results

All patients lost weight after 3 months and the average BMI decreased from 46.4 (37.1–57.5) preoperatively to 38.5 (30.3–45.5) kg/m² with no significant difference between the R (*n* = 12) and NR (*n* = 8) groups. The data about weight, glucose, insulin, C-peptide, and HbA1c levels were previously published by our group [8].

At 3 months after RYGB, GHRL gene expression increased significantly only in the ES with no significant change in the RS, duodenum, jejunum, or ileum (Table 1). Success of the collection of paired biopsies (in the pre- and postoperative periods) of each gastrointestinal segment was 100% (*n* = 20) in the RS and jejunum, 90% (*n* = 18) in the ileum, 85% (*n* = 17) in the duodenum, and 35% (*n* = 7) in the ES. Of the paired biopsies obtained only 6, 3, 14, 16, and 12 provided the quality and quantity of RNA required to perform microarrays for the RS, ES, duodenum, jejunum, and ileum, respectively. We performed gene expression validation by qRT-PCR in 19 paired samples of RS and 8 paired samples of ES.

Basal and postprandial acyl ghrelin plasma levels were analyzed in only 17 patients at baseline and 3 months after

RYGB, because of difficult venous access for blood collection in three patients. One post-meal ghrelin value is missing due to difficult venous access as well. No significant changes in acyl ghrelin plasma levels were observed before or after the test meal (Fig. 1). Furthermore, no correlation was found between ghrelin plasma levels, gene expression, and weight loss ($p > 0.05$).

Discussion

We have studied the global GHRL gene expression in the GIT of obese women with T2D before and 3 months after RYGB. To our knowledge, this analysis was not previously performed at ES and RS in humans. Our data showed a significant increase in GHRL gene expression at the ES and non-significant decreases in the gene expression at the RS, duodenum, jejunum, and ileum after 3 months of the surgical procedure. Increase of GHRL expression levels at the ES was confirmed in a target approach by RT-qPCR, displaying similar changes and directions in response to RYGB [14]. Nutrient contact with the mucosa could not explain this finding because both the ES and the duodenum have no contact with nutrients after the surgery.

Fig. 1 Fasting and post-meal levels of ghrelin in obese women with type 2 diabetes at preoperative and 3-month postoperative periods of Roux-en-Y gastric bypass

Our results are consistent with the data of Rhee et al. [6] showing reduced expression of GHRL gene after RYGB in the small intestine, but in our study, this change was not statistically significant. We placed a preoperative mark with non-toxic ink on the intestinal biopsy sites allowing postoperative sample collection from the same loci, which was not done in the study of Rhee et al. [6]. We also collected biopsies in the stomach, which is the main organ responsible for ghrelin production. As shown in animal models, ghrelin is a priming factor for GLP-1 secretion after a meal [4].

The increase GHRL gene expression might be relevant in the process of T2Dr, priming the postprandial GLP-1 elevations that are observed after RYGB, but it is probably not the only factor. We did not find any change in fasting or post-meal ghrelin levels 3 months after RYGB. Our results are consistent with the absence of rebound ghrelin levels after RYGB when compared to those in medically induced weight loss. Conflicting data regarding changes of postprandial ghrelin levels after bariatric surgery are described and may result from different gastric volume signals, pouch sizes, assays, type of meals, or sleep-wake patterns [5].

In conclusion, we describe for the first time an increased GHRL expression in the excluded stomach after RYGB and did not find a correlation of this finding with weight loss and T2Dr.

Acknowledgements We thank Daniele Yumi for the statistical discussion of the data and the late Prof Daniel Giannella Neto who had an important role and participated in this study.

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

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

Conflicts of Interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Cummings DE, Arterburn DE, Westbrook EO, et al. Gastric bypass surgery vs intensive lifestyle and medical intervention for type 2 diabetes: the CROSSROADS randomized controlled trial. *Diabetologia*. 2016;59(5):945–53. <https://doi.org/10.1007/s00125-016-3903-x>.
- Sala PC, Torrinhas RS, Giannella-Neto D, et al. Relationship between gut hormones and glucose homeostasis after bariatric surgery. *Diabetol Metab Syndr*. 2014;6(1):87. <https://doi.org/10.1186/1758-5996-6-87>.
- Cohen RV, Rubino F, Schiavon C, et al. Diabetes remission without weight loss after duodenal bypass surgery. *Surg Obes Relat Dis*. 2012;8(5):e66–8. <https://doi.org/10.1016/j.soard.2011.07.007>.
- Gagnon J, Baggio LL, Drucker DJ, et al. Ghrelin is a novel regulator of GLP-1 secretion. *Diabetes*. 2015;64(5):1513–21. <https://doi.org/10.2337/db14-1176>.
- Steinert RE, Feinle-Bisset C, Asarian L, et al. Ghrelin, CCK, GLP-1, and PYY(3-36): Secretory controls and physiological roles in eating and glycemia in health, obesity, and after RYGB. *Physiol Rev*. 2017;97(1):411–63. <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2014>.
- Rhee NA, Wahlgren CD, Pedersen J, et al. Effect of Roux-en-Y gastric bypass on the distribution and hormone expression of small-intestinal enteroendocrine cells in obese patients with type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2015;58(10):2254–8. <https://doi.org/10.1007/s00125-015-3696-3>.
- Sala P, Belarmino G, Machado NM, et al. The SURMetaGIT study: design and rationale for a prospective pan-omics examination of the gastrointestinal response to Roux-en-Y gastric bypass surgery. *J Int Med Res*. 2016;44(6):1359–75. <https://doi.org/10.1177/0300060516667862>.
- Sala P, Torrinhas RS, Fonseca DC, et al. Type 2 diabetes remission after Roux-en-Y gastric bypass: Evidence for increased expression of jejunal genes encoding regenerating pancreatic islet-derived proteins as a potential mechanism. *Obes Surg*. 2017;27(4):1123–7. <https://doi.org/10.1007/s11695-017-2602-0>.
- Breitling R, Armengaud P, Amtmann A, et al. Rank products: a simple, yet powerful, new method to detect differentially regulated genes in replicated microarray experiments. *FEBS Lett*. 2004;573(1–3):83–92. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.07.055>.
- John B, Buse, Sonia Caprio, William T, Cefalu, Antonio Ceriello, Stefano Del Prato, Silvio E. Inzucchi, et al. How do we define cure of diabetes? *Diabetes Care* 2009;32:2133–2135;
- Korner J, Bessler M, Inabnet W, et al. Exaggerated glucagon-like peptide-1 and blunted glucose-dependent insulinotropic peptide secretion are associated with Roux-en-Y gastric bypass but not adjustable gastric banding. *Surg Obes Relat Dis*. 2007;3(6):597–601. <https://doi.org/10.1016/j.soard.2007.08.004>.
- Holdstock C, Zethelius B, Sundbom M, et al. Postprandial changes in gut regulatory peptides in gastric bypass patients. *Int J Obes*. 2008;32(11):1640–6. <https://doi.org/10.1038/ijo.2008.157>.
- Korner J, Inabnet W, Comwell IM, et al. Differential effects of gastric bypass and banding on circulating gut hormone and leptin levels. *Obesity (Silver Spring)*. 2006;14(9):1553–61. <https://doi.org/10.1038/oby.2006.179>.
- Morey JS, Ryan JC, Van Dolah FM. Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. *Biol Proced Online*. n8:175–93.