NATASHA MENDONÇA MACHADO

**Impacto da derivação gástrica em Y de Roux no
perfil metabólico global de mulheres obesas
portadoras de diabetes tipo 2**

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

Programa de Ciências em Gastroenterologia

Orientador: Prof. Dr. Dan Linetzky Waitzberg

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

Machado, Natasha Mendonça

Impacto da derivação gástrica em Y de Roux no
perfil metabólico global de mulheres obesas
portadoras de diabetes tipo 2 / Natasha Mendonça
Machado. -- São Paulo, 2018.

Tese(doutorado)--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.Obesidade
5.Metabólica 6.Bioquímica

USP/FM/DBD-422/18

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

A meus pais, **Rui e Rafaela**, que sempre apoiaram incondicionalmente as minhas escolhas, entenderam minha ausência e, muitas vezes, fizeram renúncias em meu favor. Nesta longa jornada, eu nada seria sem vocês!

As minhas filhas de quatro patas, **Naná, Nala e Margô**.

A toda minha **família, amigos**, a tudo e todos que acreditaram nesta causa e contribuíram para sua realização.

AGRADECIMENTOS

Dedico aqui algumas palavras de agradecimento a todos aqueles que, de alguma forma, estiveram comigo neste percurso que levou à concretização de minha tese de doutorado.

Muito especialmente, a meu mentor, Professor Doutor **Dan Linetzky Waitzberg**, pesquisador incansável, exemplo inigualável de sabedoria e liderança, por todo apoio e pelos valiosos conselhos que impactaram profundamente meu desenvolvimento científico e pessoal ao longo destes anos. Expresso aqui minha profunda gratidão por ter acreditado e impulsionado todas as etapas deste projeto, pela grande contribuição para minha formação e pela oportunidade de ter feito parte deste seleto grupo de pesquisadores do Metanutri.

Ao Professor Dr. **Oliver Fiehn**, referência mundial em metabolômica, diretor do *NIH West Coast Metabolomics Center*, meu orientador durante os 16 meses em que estive na Universidade da Califórnia desenvolvendo as análises desta pesquisa, pela valiosa oportunidade de viver a experiência científica de modo único e inesquecível, serei eternamente grata pela chance de conhecê-lo e tê-lo como guia e exemplo.

À Professora Dra. **Marina Franco Maggi Tavares**, titular do Departamento de Química da USP, que com tanto carinho me abriu as portas de seu laboratório para o começo de meus experimentos. Obrigada por ter me mostrado o caminho quando tudo ainda era tão abstrato e por ter me apoiado e incentivado tanto durante esta jornada.

A **Priscila Sala**, por ter iniciado com muito empenho e dedicação o protocolo de pesquisa do qual este trabalho faz parte, por ser uma referência que sempre guiou meus passos ao longo destes anos. Trabalhar com você foi uma experiência única e deu-me a oportunidade de desenvolver o autoconhecimento e a independência científica.
Tenho muito a lhe agradecer, obrigada!

A **Raquel Susana Torrinhas**, bióloga chefe do Metanutri, grande pesquisadora que sempre me inspirou e auxiliou nos relatórios científicos, apresentações e artigos, muito obrigada pela grande ajuda de sempre, significou muito pra mim.

A **Danielle Cristina Fonseca**, pela paciência, amizade e grande ajuda no desenvolvimento de várias atividades desta pesquisa, obrigada por tudo!

A todas as pesquisadoras do projeto temático e do Metanutri, em especial, **Graziella Ravacci, Camila Cardinelli, Jéssica Reis, Rayene Peres e Beatriz Ferreira**, certamente, ao longo desta jornada conhecimentos e trocas de experiência foram compartilhados, obrigada pela grande ajuda e pela parceria!

Às queridas amigas, **Tong Shen e Arpana Vaniya**, pós-docs do *NIH West Coast Metabolomics Center* da Universidade da Califórnia, conhecê-las foi um dos maiores presentes que ganhei durante o doutorado. Pessoas que levarei eternamente em meu coração, obrigada por terem me ensinado tanto e pelos momentos únicos que dividimos, pelo apoio, troca de conhecimento e companhia nas longas noites de trabalho no laboratório. Isso tudo foi muito importante para o desenvolvimento desta pesquisa. *I have no words to say how grateful I am for all you did for me!*

Ao amigo **Dinesh Barupal**, coordenador de programas e pesquisador do *NIH West Coast Metabolomics Center* da Universidade da Califórnia, por toda atenção e ajuda com o desenvolvimento da análise de dados deste projeto, por ter contribuído intensamente para meu crescimento científico em metabolômica e por todos os bons momentos que compartilhamos.

Aos demais pesquisadores, alunos e colaboradores do *NIH West Coast Metabolomics Center* da Universidade da Califórnia, por toda ajuda, incentivo e por terem tornado a minha estadia tão bem sucedida durante todo o período que estive em seu laboratório, em especial, **Nathaniel Grimes, Osamede Enobakhare, Zach Kons, Shekufeh Zareian, Brian DeFelice, Kelly Paglia, Patrick Fitzgerald, Mona Elbadawi-Sidhu, Jian Ji, Marco Piparo, Ivana Blaženović, Zijuan Lai, Diego Pedrosa, Gert Wohlgemuth, Bryan Roberts, Benjamin Wancewicz, Sajjan Mehta, Sili Fan, Carol Stroble, Tobias Kind e Jeannette Martins**. Estar com todos vocês foi certamente uma das melhores experiências que vivi até hoje!

A todas as pacientes que fizeram parte desta pesquisa, agradeço imensamente pela disposição e paciência na realização de todos os procedimentos.

Aos cirurgiões do Departamento de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas, em especial, aos Doutores **Marco Aurélio Santo, Denis Pajek e Henrique Joaquim**, pela avaliação dos casos e pela participação na realização das cirurgias desta pesquisa.

A todos residentes do Departamento de Gastroenterologia, que durante esse período generosamente auxiliaram nas avaliações, apresentação e discussão de casos, bem como na realização das cirurgias das pacientes incluídas nesta pesquisa, em especial, ao **André Duarte, Renata Colaneri, Diego Soares, Danielle Cesconetto, Aline Alves, Amir Charruf, Vagner Jeismann, Daniel Wasberg e Rodrigo Oliveira**.

A todas as auxiliares da sala 20 do Centro Cirúrgico do Hospital das Clínicas, em especial, a circulante **Sandra**, por ter sido sempre tão prestativa e pela valiosa colaboração em todos os procedimentos da pesquisa realizados durante as cirurgias.

A toda equipe da divisão de endoscopia, em especial, aos médicos **Robson Ishida, Ismael Guarda, Eduardo Moura e Paulo Sakai**; aos residentes, em especial, **Murilo e Nádia**; aos técnicos de enfermagem, em especial **Marisa, Suzi**, à secretária **Fernanda**, aos auxiliares **Agnaldo e Severiano**.

Obrigada pela paciência e compreensão durante o desenvolvimento de enteroscopias para a coleta de biópsias, grande parte da realização deste projeto é fruto de todo esforço de vocês empenhado no decorrer destes exames, muito obrigada.

À equipe do ambulatório da Gastroenterologia do Hospital das Clínicas, pela ajuda no processo de seleção, triagem e exames das pacientes deste protocolo, em especial, as auxiliares de enfermagem **Janete, Francisca e Maria**; e à equipe da recepção, **Luís e Clayton**.

Às secretárias do Departamento de Gastroenterologia, em especial, **Vilma Libério e Fabiana Soares**, pela seriedade e compromisso no atendimento e apoio aos pós-graduandos.

À equipe do Laboratório de Química Fundamental do Instituto de Química da USP, especialmente, **Gisele Canuto e Carolina Raíssa**, pela amizade, pelos grandes ensinamentos e por compartilharem seu espaço comigo.

Ao Professor Dr. **Oscar Vega Bustillos** do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, que auxiliou meus estudos sobre espectrometria de massas.

As minhas grandes amigas **Manuella Souza, Kelly Oliveira, Ana Paula Sidônio, Maria Viana, Ayrlana Fonseca, Ana Luiza Gallo, Déborah Kimie, Kamilla Titan, Jennifer Santos e Andrezza Camargo**, que sempre me apoiaram e por tantas vezes se fizeram presentes nos momentos mais difíceis do desenvolvimento desta pesquisa.

À família que eu dividi um lar na Califórnia, que me acolheu como filha, estendeu-me a mão nas horas em que precisei, e mostrou-me que, além de inglês, eu também podia falar espanhol, **Edith, Alfredo e Alfredo José Rivas**, *muchas gracias por todo lo que hicieron por mí!*

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelo apoio financeiro ao projeto temático do qual este projeto faz parte (2011/09612-3), e pelas bolsas que me foram concedidas DR (2013/23355-9) e BEPE (2016/01259-6).

À **Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**, pela oportunidade de estar aqui, por ter sido minha segunda casa e pelo apoio concedido ao desenvolvimento desta pesquisa.

“A melhor parte da ciência é a sua revolução permanente. A jornada para a sua compreensão é eterna. Para mim, frente ao pouco que conhecemos do universo, este é o modo pelo qual devemos de encará-la; a nossa compreensão nunca será absoluta. Apesar disso, estas pequenas aproximações sucessivas da realidade que a ciência nos proporciona são profundamente preciosas, dando-nos um vislumbre diante de tudo que é possível”

Ann Druyan

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

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

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

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

SUMÁRIO

Lista de Siglas, Abreviaturas e Símbolos

Lista de Figuras

Lista de Gráficos

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 Diabetes mellitus tipo 2	4
2.1.1 A bioquímica do diabetes mellitus tipo 2	5
2.2 Papel metabólico do trato gastrointestinal e sua relação com o diabetes mellitus tipo 2	7
2.3 Derivação gástrica a Y de Roux na homeostase glicêmica	10
2.4 Metabólitos, metaboloma e metabolômica	14
2.5 Espectrometria de massas	18
3 HIPÓTESE E JUSTIFICATIVA DE ESTUDO	22
4 OBJETIVOS	25
5 MÉTODOS	27
5.1 Ética	28
5.2 Desenho do estudo	28
5.3 Casuística e critérios de seleção de pacientes	30
5.4 Local de execução do trabalho	33
5.5 Derivação gástrica em Y de Roux	33
5.6 Acompanhamento da evolução clínica	35
5.7 Composição corporal	36
5.8 Classificação dos pacientes de acordo com a melhora do DM2	36
5.9 Obtenção das amostras	36
5.9.1 Plasma	36
5.9.2 Urina	37

5.9.3	Biópsias gastrintestinais	37
5.10	Análises metabolômicas	37
5.11	Preparo de amostras	40
5.12	Análise alvo de AB	41
5.13	Volume de amostras de acordo com a plataforma e tipo de amostra	41
5.14	Análises por espectrometria de massas	42
5.15	Espectrometria de massas	42
5.15.1	Instrumento 1 – Cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (LC-MS)	43
5.15.2	Instrumento 2 – Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (GC-MS)	44
5.15.3	Instrumento 3 – Cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas híbrido (LC-MS) para análise de AB	45
6	PROCESSAMENTO DE DADOS	48
7	IDENTIFICAÇÃO E ANOTAÇÃO DE METABÓLITOS	50
8	NORMALIZAÇÃO	52
8.1	Plasma	53
8.2	Urina	53
8.3	Biópsias gastrintestinais	54
9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	55
9.1	Conjunto de dados das análises metabolômicas	56
9.2	Ácidos Biliares	57
9.3	Análise de enriquecimento	57
9.4	Mapeamento de <i>Network</i>	58
9.5	Enriquecimento estatístico de similaridade química	58
9.6	Variáveis Clínicas	59
10	RESULTADOS	60
10.1	Evolução de parâmetros clínicos	62
10.2	Resposta metabolômica global à DGYR	64
10.2.1	A análise de enriquecimento por similaridade química	71
10.2.2	Mapeamento de network metabólico	73
10.2.3	Enriquecimento de vias metabólicas	81

10.2.4	Variáveis de importância na projeção – VIP	85
10.2.5	Regulação metabólica pela perspectiva do <i>fold change</i>	89
10.2.6	Análise de AB	94
10.3	Resposta metabolômica na melhora do diabetes mellitus tipo 2	95
10.3.1	Evolução de variáveis clínicas de acordo com a melhora do DM2	95
10.3.2	Resposta metabolômica à DGYR de acordo com a melhora do DM2	96
10.3.4	A análise de enriquecimento por similaridade química de acordo com a melhora do DM2	100
10.3.5	Enriquecimento de vias metabólicas de acordo com a melhora do DM2	102
10.3.6	Variáveis de importância na projeção – VIP	104
10.3.7	Alterações metabolômicas de pacientes respondedores.....	107
10.3.7.1	Plasma.....	107
10.3.7.2	Urina	108
10.3.8	Alterações metabolômicas de pacientes não respondedores.....	108
10.3.8.1	Plasma.....	108
10.3.8.2	Urina	108
11	DISCUSSÃO	109
11.1	Contribuição científica	110
11.2	Modelo de análises metabolômicas	111
11.3	Resultados	111
11.3.1	Análises metabolômicas	112
11.3.1.1	A DGYR promove remodelação do perfil metabolômico de lipídios sistêmicos e gastrintestinais.....	113
11.3.1.2	A DGYR modifica a microbiota intestinal	118

11.3.1.3 Alterações nos níveis de AB plasmáticos após a DGYR podem ativar o receptor FXR e contribuir para melhora do DM2	119
11.3.1.4 Melhora do DM2 após DGRY pode se associar ao aumento da flexibilidade metabólica induzida pela oxidação.....	123
11.3.1.5 Pacientes que não apresentam remissão do DM2 após DGYR podem apresentar disfunção renal subclínica	127
11.3.1.6 A não remissão do DM2 após DGYR pode associar-se a alterações na função do citocromo P450.....	135
11.3.1.7 A DGYR pode modificar o metabolismo de ácidos graxos pelo aumento da expressão de PPAR nas pacientes que apresentam melhora do DM2	136
11.3.2 Descrição do mecanismo que integra as hipóteses	139
11.4 Comparação com estudos anteriores.....	145
11.5 Limitações	158
12 CONCLUSÃO	162
13 ANEXOS	165
14 REFERÊNCIAS.....	195

LISTAS

SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

α	alfa
β	beta
γ	gama
ω	ômega
°C	graus Célsius
$\mu\text{IU/ml}$	microunidades por mililitro
μl	microlitros
μm	micrômetros
AB	ácidos biliares
ADA	<i>American Diabetes Association</i>
ADC	ácidos dicarboxílicos
ALT	alanina aminotransferase
ANOVA	análise de variância
APCI	ionização química por pressão atmosférica
APPI	fotoionização a pressão atmosférica
AST	aspartato aminotransferase
ATC	ácido tricarboxílico
ATP	adenosina trifosfato
BCAA	aminoácidos de cadeia ramificada
CAPPesq	Comissão de Ética para Análises de Projetos de Pesquisas do Hospital das Clínicas
CE	eletroforese capilar
Cer	ceramidas
CI	ionização química
cm	Centímetros
CO ₂	Dióxido de carbono
CSH	coluna cromatográfica de fase reversa, superfície híbrida carregada

CXP	potencial de saída da célula
Da	Daltons
DGYR	derivação gástrica em Y de Roux
DM2	diabetes mellitus tipo 2
DNA	ácido desoxirribonucleico
DP	desvio-padrão
DP	potencial de <i>declustering</i>
EC	<i>dwell time</i> e energia de colisão
ECA	estômago corpo alto
ECM	estômago corpo médio
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EI	ionização por impacto de elétrons
EP	potencial de entrada
ESI	ionização por eletrospray
eV	elétron volts
FAME	ésteres metílicos de ácidos graxos
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FC	<i>fold change</i>
FGF19	fator de crescimento de fibroblastos 19
FXR	<i>Farnesoid X receptor</i>
GABA	<i>gamma-Aminobutyric acid</i>
GC	cromatografia gasosa
GC-MS	cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
GGT	gamma-glutamyl transpeptidase
GIP	<i>Gastric Inhibitory Polypeptide</i>
GLP-1	<i>Glucagon-like Peptide 1</i>
HbA1C	hemoglobina glicada
HC FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HDL	lipoproteína de alta densidade
HILIC	coluna cromatográfica por interação hidrofílica
HOMA	avaliação do modelo homeostático
HPLC	cromatografia líquida de alta performance
IMC	índice de massa corporal
Ion trap,	armadilha de íons

IR	índice de retenção
Kg/m ²	Quilos por metro quadrado
LC-MS	cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
LD	<i>lipid droplets</i>
LDL	lipoproteína de baixa intensidade
Lgr5	<i>G-protein coupled receptor 5</i>
LIM 35	Laboratório de Nutrição e Cirurgia Metabólica do Aparelho Digestivo
LPC	lisofosfatidilcolinas
LPS	lipopolisacarídeos bacterianos
<i>m/z</i>	razão massa/carga
MALDI	ionização/desorção a laser assistida por matriz
mg	miligramas
mg/dL	miligramas por decilitros
min	minuto
ml	mililitros
μl	microlitros
mm	milímetros
MRM	monitoramento de múltiplas reações
MS	espectometria de massas
MS/MS	espectometria de massas triplo quadrupolo
MS/TOF	espectrometria de massas acoplada a uma unidade de detecção de tempo de voo;
MSTFA	N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida
mTIC	metabólitos identificados, total ion chromatogram
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NF-κB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NIST	Instituto Nacional de Tecnologia de Padrões
NMR	ressonância magnética nuclear
NR	não respondedores
PC	fosfatidilcolinas
PCA	análise de componentes principais
PDA	pletismografia de deslocamento aéreo
PE	fosfatidiletanolaminas

pH	potencial hidrogeniônico
PLS DA	análise discriminante parcial por mínimos quadrados
PP	peptídeo pancreático
PPAR	<i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>
ppm	partes por milhão
PYY	peptídeo YY
Q0	entrada de íons no sistema de espectrometria de massas
Q1	unidade que seleciona os íons recém-formados
Q2	célula de colisão
Q3	unidade em que os íons selecionados são direcionados ao detector
QC	controle de qualidade
R	respondedores
rcf	força centrífuga relativa
RNA	ácido ribonucleico
RNA _m	ácido ribonucleico mensageiro
RNA _r	ácido ribonucleico ribossômico
RT	tempo de retenção
Sham	cirurgia placebo
SM	esfingomielinas
SREBP 1	<i>sterol regulatory element binding proteins 1</i>
T3	triiodotironina
T4	tiroxina
TCA	ciclo do ácido tricarboxílico, ou ciclo de Krebs
TCLE	termo de consentimento livre e esclarecido
TG	triglicerídios
TGR5	<i>membrane Takeda G-protein receptor 5</i>
TLR4	<i>toll like receptors 4</i>
TMAO	N-óxido de trimetilamina
TMCS	trimetilclorosilano
TOF	<i>time of flight</i>
TOF/TOF	associação de duas unidades seguidas de Tempo de voo
U/L	unidades por litro
Ug	unidades por grama

UPLC	cromatografia líquida de ultra performance
v	volts
VIP	variáveis de importância na projeção
VLDL	lipoproteínas de muito baixa densidade
WCMC	<i>NIH West Coast Metabolomics Center</i>

FIGURAS

Figura 1 -	Fluxo dos comandos biológicos e a contribuição de cada etapa no fenótipo metabólico	16
Figura 2 -	Caracterização das unidades e do fluxograma de operação do espectrômetro de massas	20
Figura 3 -	Coberturas de metabólitos por plataforma	21
Figura 4 -	Desenho do protocolo do estudo com a descrição dos procedimentos gerais de exames e coletas de amostras em seus respectivos tempos.....	29
Figura 5 -	Fluxo de seleção de pacientes. Quadros pontilhados indicam fatores de não inclusão identificados ao longo do processo de triagem e seleção	32
Figura 6 -	Ilustração da derivação gástrica em Y de Roux.....	34
Figura 7 -	Método de análises utilizado para realização de abordagens de estudo	38
Figura 8 -	Detalhamento do fluxo completo de análises de dados	39
Figura 9 -	Evolução de parâmetros clínicos ao longo do acompanhamento pós-operatório	63
Figura 10 -	Diagrama de Venn apresentando o resumo dos metabólitos identificados com abordagem multiplataformas.....	65
Figura 11 -	Análise de componentes principais (PCA) do plasma	68
Figura 12 -	Análise de componentes principais (PCA) da urina	69
Figura 13 -	Análise de componentes principais (PCA) do tecido gastrointestinal.....	70
Figura 14 -	Classificação de metabólitos significativamente alterados, de acordo com a diversidade química de amostras gastrintestinais	72
Figura 15 -	Network de similaridade bioquímica e estrutural demonstra diferenças metabólicas no plasma	75

Figura 16 - Network de similaridade bioquímica e estrutural demonstra diferenças metabólicas na urina.....	76
Figura 17 - Network de similaridade bioquímica e estrutural demonstra diferenças metabólicas no ECA	77
Figura 18 - Network de similaridade bioquímica e estrutural demonstra diferenças metabólicas no duodeno.....	78
Figura 19 - Network de similaridade bioquímica e estrutural demonstra diferenças metabólicas no jejuno	79
Figura 20 - Network de similaridade bioquímica e estrutural demonstra diferenças metabólicas no íleo.....	80
Figura 21 - Alterações metabólicas dispostas pela similaridade química	84
Figura 22 - Variáveis de importância na projeção (VIP) do plasma.....	86
Figura 23 - Variáveis de importância na projeção (VIP) da urina	87
Figura 24 - Variáveis de importância na projeção (VIP) do tecido gastrointestinal.....	88
Figura 25 - Representação dos contrastes das transformações induzidas pela cirurgia entre os compartimentos estudados	91
Figura 26 - Análise de componentes principais (PCA) do plasma de pacientes respondedores.....	97
Figura 27 - Análise de componentes principais (PCA) do plasma de pacientes não respondedores.....	98
Figura 28 - Análise de componentes principais (PCA) da urina de pacientes respondedores.....	99
Figura 29 - Análise de componentes principais (PCA) da urina de pacientes respondedores.....	99
Figura 30 - Classificação de metabólicos significativamente alterados, de acordo com a diversidade química do plasma e com a melhora do DM2	100
Figura 31 - Classificação de metabólicos significativamente alterados, de acordo com a diversidade química da urina e com a melhora do DM2	101

Figura 32 - Alterações metabólicas dispostas pela similaridade química no plasma, de acordo com a melhora do DM2	103
Figura 33 - Alterações metabólicas dispostas pela similaridade química na urina, de acordo com a melhora do DM2	103
Figura 34 - Variáveis de importância na projeção (VIP) do plasma de respondedores	104
Figura 35 - Variáveis de importância na projeção (VIP) do plasma de não respondedores	105
Figura 36 - Variáveis de importância na projeção (VIP) da urina de respondedores	106
Figura 37 - Variáveis de importância na projeção (VIP) da urina de não respondedores	106
Figura 38 - Resumo de alterações metabólicas relacionadas à obesidade e DM2	114
Figura 39 - Formação de <i>lipid droplets</i> e possível mobilização após a DGYR.....	117
Figura 40 - Alterações plasmáticas de ácidos biliares de pacientes respondedores e não respondedores e efeitos metabólicos mediados pela ativação de sensores biológicos	123
Figura 41 - Transformações envolvidas na melhora metabólica estimulada pela ω oxidação	127
Figura 42 - Influência do PPAR α e γ na homeostase glicêmica e de lipídios.....	138
Figura 43 - Representação gráfica integrada das alterações metabólicas e mecanismos das hipóteses propostas em pacientes respondedoras.....	142
Figura 44 - Representação gráfica integrada das alterações metabólicas e mecanismos das hipóteses propostas em pacientes não respondedoras.....	143
Figura 45 - Integração de todas as alterações metabólicas e hipóteses propostas	144

TABELAS

Tabela 1 -	Células enteroendócrinas e seus mensageiros químicos, tipos de comunicação intercelular e localização no trato gastroenteropancreático	8
Tabela 2 -	Evolução de parâmetros clínicos do pré e pós-operatório de 3 meses	62
Tabela 3 -	Resumo dos principais achados das análises metabolômicas, de acordo com a plataforma analítica e amostra biológica.....	66
Tabela 4 -	Resumo de vias metabólicas enriquecidas em todas as amostras em estudo.....	82
Tabela 5 -	Alterações de AB plasmáticos após DGYR	94
Tabela 6 -	Evolução de parâmetros clínicos do pré e pós-operatório de 3 meses, classificadas de acordo com a melhora do DM2	95
Tabela 7 -	Descrição do número de alterações gerais e entre subgrupos de respondedores e não respondedores.....	96
Tabela 8 -	Levantamento dos principais estudos envolvendo metabolômica no contexto da DGYR e do DM2	146

GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Níveis de alteração de metabólitos aumentados no trato gastrointestinal.....	92
Gráfico 2 -	Níveis de alteração de metabólitos diminuídos no trato gastrointestinal.....	93

RESUMO

Machado, NM. *Impacto da derivação gástrica em Y de Roux no perfil metabólico global de mulheres obesas portadoras de diabetes tipo 2* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

Nos últimos anos, muito vem se aprendendo sobre o papel metabólico da derivação gástrica em Y de Roux (DGYR), embora ainda existam questões importantes a serem respondidas. Pacientes obesos, metabolicamente descompensados, apresentam rápida melhora do quadro de diabetes mellito tipo 2 (DM2) no pós-operatório precoce da DGYR. As taxas de remissão do DM2 chegam em até 89% após 1 ano, mas os mecanismos e os fatores determinantes dessa melhora ainda são desconhecidos. Até o quanto se pode averiguar, não há nenhum estudo clínico que explique completamente esse fenômeno em seres humanos. O advento da era pós-genômica vem mudando substancialmente o modo pelo qual a ciência e a medicina são praticadas, possibilitando a investigação de doenças sobre perspectivas moleculares. Obesidade e DM2 resultam de alterações sistêmicas no metabolismo e, nesse contexto, a metabolômica surge como abordagem promissora para investigação das transformações promovidas pela DGYR, ao estudar flutuações dinâmicas de moléculas que traduzem o metabolismo, os metabólitos. Estas moléculas refletem a resposta final de sistemas biológicos frente a alterações metabólicas, genéticas e ambientais, para constituir fonte importante de informação celular e sistêmica. Na presente pesquisa, considerou-se que os mecanismos de ação da DGYR incluem alterações metabolômicas intestinais e sistêmicas que modulam diversas vias metabólicas, e que podem levar à melhora do DM2 em pacientes obesos. Com essa perspectiva, realizou-se um estudo clínico prospectivo autocontrolado (pareado), no qual foram estudadas 23 pacientes obesas portadoras de DM2 submetidas à DGYR. Análises metabolômicas foram realizadas com abordagem multicompartimental, em amostras de plasma, urina e biópsias do tecido gastrointestinal nos períodos pré e pós-operatório de 3 meses. Estas análises foram conduzidas no centro de referência internacional na Universidade da Califórnia, nos Estados Unidos da América (*NIH West Coast Metabolomics Center*), com uso de plataformas analíticas de cromatografia líquida e gasosa, acopladas à espectrometria de massas. As pacientes foram analisadas em conjunto e, para determinar a relação da cirurgia com o controle glicêmico, foram divididas, posteriormente, de acordo com a remissão do DM2, utilizando os critérios da *American Diabetes Association*. Todas as pacientes apresentaram melhora na composição corporal e nos parâmetros clínicos avaliados, demonstrando que, do ponto de vista clínico, não existem diferenças aparentes entre as pacientes. Contudo, o perfil metabolômico revelou um padrão discriminatório de alterações, indicando grandes diferenças entre as pacientes que apresentaram ou não melhora do DM2. No plasma, 235 metabólitos estiveram significativamente alterados, na urina 113 e 106, 0, 82, 146 e 60

no estômago corpo alto, estômago corpo médio, duodeno, jejuno e íleo, respectivamente. Os principais metabólitos envolvidos nestas alterações incluíram AB, toxinas urêmicas produzidas pela microbiota, ácidos dicarboxílicos e diferentes classes lipídicas. Diversas hipóteses foram geradas com base nos resultados, indicando que a DGYR altera profundamente o perfil metabolômico e que a remissão do DM2 parece estar associada à melhora da flexibilidade metabólica estimulada pela maior atividade da ω oxidação e ativação de receptores nucleares que modificam o metabolismo de lipídios e da glicose. Em contrapartida, a não remissão do DM2 parece ser em razão de mudanças na composição da microbiota e presença de disfunção renal subclínica, que restringem a adaptação metabólica na qual esta melhora ocorre. Portanto, supõe-se que a DGYR desempenha um papel funcional, incluindo, mas não limitado à regulação no fluxo e na utilização de substratos, na composição e/ou atividade da microbiota e na ativação de receptores nucleares. Estas alterações metabólicas parecem atuar em conjunto, formando um circuito de alterações que ativam gatilhos que levam à melhora do DM2.

Descritores: cirurgia bariátrica; derivação gástrica; diabetes mellito tipo 2; obesidade; metabolômica; bioquímica.

ABSTRACT

Machado, NM. *Impact of Roux-em-Y gastric bypass on metabolomic profile of obese women with type 2 diabetes* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2018.

In recent years, much has been learned about the metabolic role of Roux-em-Y gastric bypass (RYGB), although there are still important questions to be answered. Obese metabolically decompensated patients present fast improvement of type 2 diabetes (T2D) in the early RYGB postoperative. T2D remission rates reach up to 89% after a year, but the precise mechanisms and determinant factors of this improvement are still unknown. To the best of our knowledge, there is no clinical study that fully explains the phenomena in humans. Post-genomic era has substantially changed the way science and medicine are practiced, making it possible to investigate diseases at molecular level. Obesity and T2D result from systemic metabolic alterations and, in this context, metabolomics appears as a promising approach to investigate changes induced by RYGB, as is focused on dynamic fluctuations of the molecules that translate metabolism, the metabolites. These molecules reflect the ultimate response of biological systems to metabolic, genetic and environmental changes, representing an important source of cellular and systemic information. In this research, we considered that the mechanisms of RYGB action includes systemic and gastrointestinal metabolomic alterations, which modulate several metabolic pathways, and that may lead out T2D improvement in obese patients. In this perspective, we developed a prospective clinical study, self-controlled (paired), in which 23 obese patients with T2D submitted RYGB were investigated. Metabolomic analysis were performed in a multi-compartmental approach, analyzing plasma, urine and gastrointestinal biopsies before and after 3 months of surgery. Analysis were performed at an international reference metabolomics center, located at University of California, United States of America (*NIH West Coast Metabolomics Center*), by using liquid and gas chromatography, coupled to mass spectrometry. Patients were analyzed together, and to determine the relationship of glycemic control with RYGB, we also analyzed patients divided by groups, classified according T2D remission, following the American Diabetes Association criteria. All patients presented body composition and clinical improvements, showing no difference from the clinical perspective. On the other hand, metabolomic profile exhibited a discriminatory pattern of alterations, suggesting important differences between patients with and without T2D remission. On plasma, 235 metabolites were significantly changed, while urine 113 and 106, 0, 82, 146 and 60 at stomach upper body, stomach median body, duodenum, jejunum and ileum, respectively. The principal metabolites involved in these alterations includes bile acids, uremic toxins produced by microbiota, dicarboxylic acids, and different lipid classes. Several hypotheses were generated from our results, indicating that RYGB deeply changes

metabolomic profile and that T2D remission seems to be associated with metabolic flexibility improvement, stimulated by increased ω oxidation and nuclear receptors activation, modifying lipid and glucose metabolism. In contrast, non-remission of T2D seems to be related to changes of microbiota, associated with subclinic kidney dysfunction, that impairs the metabolic adaptation in which RYGB occurs. Thus, we suppose that RYGB develops a functional role, including – but not limited to – regulation in the substrate flux and utilization, microbiota composition and activity, and activation of nuclear receptors. These metabolic alterations seem to act together to form a circuit of alterations that activate triggers that lead to T2D improvement.

Descriptors: bariatric surgery; gastric bypass; type 2 diabetes; obesity; metabolomics; biochemistry.

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

Obesidade e diabetes mellitus tipo 2 (DM2) são doenças crônicas multifatoriais que resultam de alterações sistêmicas no metabolismo, sendo estritamente ligadas por várias interações bioquímicas complexas. Mundialmente, quase 90% das pessoas com DM2 estão acima do peso ou obesas e, de acordo com a Federação Internacional de Diabetes, o Brasil está entre os cinco países com o maior número de diabéticos¹.

O trato gastrointestinal desempenha papel central na regulação metabólica e na homeostase glicêmica e, atualmente, a intervenção cirúrgica Derivação Gástrica em Y de Roux (DGYR) vem sendo considerada a abordagem mais eficiente para a perda de peso e melhora do DM2. O controle glicêmico é observado no pós-operatório precoce e, apesar das taxas de remissão do DM2 serem altas, os mecanismos e os fatores determinantes dessa melhora ainda são desconhecidos²⁻⁵. Até quanto pode-se averiguar, não há nenhum estudo clínico que explique completamente esse fenômeno em seres humanos e, apesar das diversas hipóteses levantadas, os achados são insuficientes para estabelecer novas condutas^{6,7}.

O advento da era pós-genômica vem mudando substancialmente o modo pelo qual a ciência e a medicina são praticadas, possibilitando o estudo de doenças sob a perspectiva molecular. Nesse sentido, a metabolômica surge como uma abordagem promissora para investigação das transformações promovidas pela DGYR, pois estuda flutuações dinâmicas de moléculas que traduzem o metabolismo, os metabólitos. Estas moléculas refletem a resposta final de sistemas biológicos frente a alterações metabólicas, genéticas e ambientais⁸ constituindo a maior fonte de informação celular e sistêmica.

Estudamos a resposta metabolômica sistêmica e gastrointestinal de pacientes obesas com DM2, submetidas à DGYR, para conhecer as bases moleculares das alterações induzidas pela cirurgia e sua relação com o controle da glicemia.

2 Revisão da literatura

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Diabetes mellitus tipo 2

O DM2 é uma doença metabólica crônica e progressiva, cujos efeitos impactam negativamente o estado de saúde, a qualidade de vida e acarretam altos custos sociais⁹. Anormalidades metabólicas comumente associadas incluem obesidade, hipertensão, dislipidemia, inflamação, hipercoagulação e disfunção das células endoteliais¹⁰. Mundialmente, estima-se que 382 milhões de pessoas são acometidas com DM2 e a previsão para 2035 é de 471 milhões de casos¹¹. Em 2017, uma pesquisa revelou que o número de brasileiros diagnosticados com diabetes cresceu 61,8%, passando de 5,5% para 8,9% da população¹².

O DM2 é um distúrbio metabólico altamente complexo e, embora esteja claro que sua patogênese envolva a combinação de resistência insulínica e do comprometimento da função de células betapancreáticas¹³, a transição do estágio inicial assintomático até a manifestação do DM2 não é bem definida. Por isso, ainda não foram estabelecidos critérios para identificação da fase subclínica^{14,15} e alterações irreversíveis podem ser observadas na ocasião do diagnóstico.

Assim, pode-se dizer que a história natural do DM2 ainda é desconhecida¹⁶ e a investigação molecular de seus aspectos metabólicos representa uma abordagem promissora para compreender sua etiologia. Nesse sentido, reconhecendo o papel do trato gastrointestinal na homeostase glicêmica e a melhora do DM2 no após a DGYR, considera-se o estudo metabolômico de amostras sistêmicas e gastrintestinais de pacientes diabéticos submetidos à DGYR, como uma boa oportunidade para explorar os aspectos ainda abstratos do DM2.

2.1.1 A bioquímica do diabetes mellitus tipo 2

O DM2 é acompanhado de defeitos na oxidação mitocondrial de substratos, o que resulta na deposição elevada de triglicerídeos intracelulares em tecidos sensíveis à insulina^{17,18}. Múltiplos defeitos no fluxo metabólico no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA ou ciclo de Krebs), fosforilação oxidativa, além da redução na plasticidade mitocondrial, que representam a capacidade de se adaptar a diferentes requerimentos energéticos por meio da fissão e da fusão mitocondrial estão diminuídos em pacientes diabéticos¹⁹, caracterizando um estado de inflexibilidade metabólica²⁰.

A regulação metabólica é altamente dependente da mitocôndria, que desempenha um papel importante na homeostase energética pela metabolização de nutrientes e produção de energia na forma de trifosfato de adenosina (ATP) e calor. Para compreender o papel da mitocôndria na patogênese do DM2, o excesso de calorias é, certamente, um ponto de partida. O alto consumo de calorias gera uma taxa de entrada intensa de substrato ao longo da cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria e isso é, com frequência, associado com o baixo gasto energético. O estilo de vida sedentário impõe um desequilíbrio entre a geração e o consumo de ATP que, se perpetuado, resulta no acúmulo de espécies reativas de oxigênio, danificando proteínas, ácido desoxirribonucleico (DNA) e lipídios nos componentes da membrana celular. Assim, um quadro de disfunção mitocondrial se estabelece, prejudicando também a capacidade de produção de ATP de maneira eficiente^{21,22}.

Este desequilíbrio bioquímico estimula a atividade de proteínas desacopladoras, que dissipam o gradiente protônico antes que possa ser utilizado para formação de energia na forma de ATP²³. Isso leva à despolarização da membrana e pode, eventualmente, interromper a geração de ATP mitocondrial²⁴. Este estado representa um mecanismo de defesa natural que protege as mitocôndrias do efeito destrutivo causado pelo

excesso de espécies reativas de oxigênio. Contudo, esta regulação mitocondrial negativa implica na geração de energia citosólica, que é metabolicamente ineficiente comparada à mitocondrial, produzindo apenas duas moléculas de ATP, em vez de 36²⁵. Isto explica a fadiga de pacientes diabéticos metabolicamente descompensados, podendo ainda ser acompanhada de hiperfagia, na qual a sensação de fome é constante em razão da inabilidade celular de obter energia.

O déficit na β oxidação de lipídios é introduzido pela regulação negativa da função mitocondrial, que condiciona o acúmulo de ácidos graxos livres no plasma e nos tecidos. Assim, o desequilíbrio metabólico causado pela hiperglicemia e hiperlipidemia crônica levam ao dano na secreção insulínica estimulada pela glicose, levando à resistência insulínica e DM2. O quadro de resistência insulínica se estabelece por defeitos na sinalização de insulina, em consequência do acúmulo de lipídios. Alguns autores também descrevem a resistência insulínica como um mecanismo de sobrevivência aos efeitos negativos da hiperglicemia crônica. A maioria das células é capaz de reduzir o transporte de glicose dentro da célula quando elas são expostas à hiperglicemia²⁶, exceto as células e órgãos frequentemente envolvidos nas complicações do DM2, como células endoteliais capilares na retina, células no glomérulo renal, neurônios e células de Schwann nos nervos periféricos²⁴.

Portanto, pacientes com DM2 são incapazes de adaptar seu metabolismo e substratos energéticos que atuam como intermediários do TCA podem ser combustíveis essenciais nos quadros de resistência insulínica e DM2²⁷. Assim, entende-se que o DM2 não é uma doença de um órgão, e sim uma síndrome que afeta progressivamente diversos sistemas.

2.2 Papel metabólico do trato gastrointestinal e sua relação com o diabetes mellitus tipo 2

O trato gastrointestinal é um órgão endócrino participa ativamente do metabolismo, traduzindo a informação química dos nutrientes em uma resposta metabólica intermediada pela secreção de hormônios e sinalização neural²⁸. Diversos tipos de células epiteliais, secreções e variações nas estruturas anatômicas estratificam-se longitudinalmente ao longo do trato gastrointestinal, tornando-o funcionalmente especializado²⁹.

Embora seja o maior órgão endócrino do organismo, o sistema enteroendócrino é o menos compreendido³⁰. Hormônios como a grelina, colecistoquinina, enteroglucagon, incretinas e o peptídeo YY (PYY) foram identificados como hormônios intestinais sintetizados pelas células enteroendócrinas. Estes hormônios ativam circuitos neurais que se comunicam com órgãos periféricos como o fígado, tecido muscular, ilhotas pancreáticas de *Langerhans* e tecido adiposo^{31,32}.

Como há sobreposição de diferentes células endócrinas na distribuição topográfica do intestino, cada tipo de célula possui um padrão característico de distribuição no trato gastroenteropancreático. Os mensageiros químicos, tipos de comunicação intercelular e localização foram descritos por Rodrigues et al., 2005 (Tabela 1)³³.

Tabela 1 - Células enteroendócrinas e seus mensageiros químicos, tipos de comunicação intercelular e localização no trato gastroenteropancreático

CÉLULA SECRETORA	FAMÍLIA	MENSAGEIRO QUÍMICO	COMUNICAÇÃO INTERCELULAR			LOCALIZAÇÃO MAIS FREQUENTE
			T (E)	P	N	
I	CCK/G	CCK	+	-	+	Duodeno/jejuno
G		Gastrina	+	-	-	Antro/duodeno
S	VIP/secretina	Secretina	+	-	-	Duodeno/jejuno
K		GIP	+	-	-	Duodeno/jejuno
D ₁ ou H		VIP	-	+	+	Sistema nervoso central e periférico
A		Glucagon	+	+	+	Pâncreas/regiões cárdica e pilórica do estômago, intestino delgado
L ou EG		Enteroglucagon (EG)/glicentina	+	+	-	Íleo e cólon
L		Oxintomodulina	+	-	-	Intestino grosso
L		GLP-1	+	-	-	Intestino grosso
L		GLP-2	+	-	-	Intestino grosso
EC ₂	Taquicinas	Substância P	-	+	+	Todo TGI e glândulas anexas, principalmente no fundo gástrico
		Neurocininas	-	-	+	Sistema nervoso entérico
P		GRP/ Bombesina	-	+	+	Estômago e duodeno
N	Neurotensina	Neurotensina	-	+	+	Íleo
D	Somatostatina	Somatostatina	+	+	+	Estômago (antro), Duodeno, jejuno e Pâncreas
F ou PP	PP	Polipeptídeo pancreático (PP)	+	+	+	Pâncreas
L		Peptídio YY	+	+	+	Intestino delgado e pâncreas
L		Neuropeptídio Y	+	-	+	Sistema nervoso central e periférico
M ou EC ₁	Motilina	Motilina	+	-	-	Intestino delgado
M ou EC ₂		Encefalinas/Endorfinas	-	+	+	Todo o TGI, especialmente no antro
EC		Serotonina	-	+	+	Todo o TGI
ECL		Histamina	-	+	-	estômago
Enterócitos*		Prostaglandinas (PGE ₂)	-	+	+	Todo o TGI

* Os enterócitos não são células endócrinas, mas como a maioria das células, senão todas, secretam algum(s) tipo(s) de eicosanóide(s). T(E)- telócrina (endócrina); P-parócrina; N-neurócrina. GLP-peptídeos semelhantes ao glucagon.

A presença de nutrientes estimula as células enteroendócrinas da mucosa intestinal a sintetizar hormônios que atuam em alvos periféricos e centrais por nervos aferentes. A glicose oral estimula a liberação de insulina mediada por GIP (do inglês, *Gastric Inhibitory Polypeptide*) e GLP-1 (do inglês, *Glucagon-like Peptide 1*) e a interação coordenada da secreção destes hormônios regula a homeostase glicêmica. Em conjunto, GIP e GLP-1 aumentam a ação da insulina e a função das células betapancreáticas³⁴.

Condições potencialmente mórbidas, como a obesidade DM2, são diretamente impactadas por associações complexas entre nutrição e atividade intestinal. O intestino de pacientes obesos exibe diferenças morfológicas e funcionais em relação a indivíduos magros. Pesquisas relatam o aumento do número de células enteroendócrinas e da absorção de nutrientes, contudo, isto não é acompanhado do aumento na produção hormonal e há ainda uma diminuição na secreção do hormônio da saciedade nas células epiteliais intestinais³⁵⁻³⁷.

Por outro lado, pacientes com DM2 exibem menor ação do GIP e níveis reduzidos de GLP-1³⁴. O trato gastrintestinal é considerado um órgão crítico para o metabolismo da glicose, especialmente por seu papel na liberação de hormônios glicorregulatórios que, em conjunto com a insulina e glucagon, atuam na regulação da homeostase glicêmica. Fisiologicamente, a manutenção da glicemia ocorre pela interação complexa entre esses hormônios, particularmente na transição entre o estado de jejum e o estado pós-prandial^{14,38}. Uma das principais contribuições do trato gastrintestinal na homeostase glicêmica é o efeito de incretinas. A presença de glicose oral contribui para mais da metade da resposta secretória de insulina, e GIP e GLP-1 são os dois principais hormônios incretínicos secretados pelo intestino após a ingestão de glicose e de outros nutrientes³¹. No DM2, o efeito insulínico de GIP é diminuído, e a secreção de GLP-1 é reduzida. O GLP-1 também inibe a secreção pós-prandial de glucagon, reduz o esvaziamento gástrico e a ingestão alimentar, contribuindo para a regulação pós-prandial de glicose³⁹.

A taxa de esvaziamento gástrico e a concentração plasmática de glicose são mutuamente dependentes^{40,41}, assim, a homeostase glicêmica pós-prandial resulta do equilíbrio entre a taxa de entrada e descarte de glicose. Portanto, a relação entre a função biológica e as características moleculares de diferentes regiões do trato gastrintestinal são importantes para entender o estado metabólico e seus eventuais desvios associados ao desenvolvimento de doenças⁴².

2.3 Derivação gástrica a Y de Roux na homeostase glicêmica

Na última década, a efetividade das cirurgias bariátricas resultou em um aumento importante no número de procedimentos no mundo inteiro, sendo estimada a realização de, pelo menos, 580 mil operações em 2014⁴³. Tradicionalmente, procedimentos cirúrgicos bariátricos dividem-se em três categorias: restritivos, disabsortivos e mistos. A DGYR é o tipo de cirurgia mais utilizada em pacientes metabolicamente descompensados, sendo classificada como um procedimento misto no qual o estômago é dividido em uma pequena bolsa gástrica (20 a 30 ml), que é anastomosada no jejuno, criando a alça alimentar. A partir desta mudança anatômica, os nutrientes ingeridos são desviados e não entram em contato com grande parte do estômago, duodeno e jejuno proximal. A anastomose da alça biliopancreática com o jejuno permite a drenagem dos AB e secreções pancreáticas, que se misturam aos nutrientes ingeridos no jejuno, região denominada canal comum⁴⁴.

Basicamente, os efeitos da DGYR ocorrem a partir da modificação do fluxo dos ácidos biliares (AB), diminuição do tamanho gástrico, rearranjo anatômico intestinal, mudanças no fluxo de nutrientes, manipulação vagal e modulação entérica de hormônios intestinais⁴⁴. Diversas pesquisas relatam a melhora da função de células beta e respostas a incretinas, alteração de microbiota, mudança no metabolismo intestinal de glicose e aumento da atividade metabólica do tecido adiposo marrom, após a DGYR⁴⁵. Sobre a perspectiva molecular, foram observadas modificações no perfil metabolômico em nível sistêmico, analisado a partir de amostras de plasma de pacientes diabéticos e obesos comparados entre si, antes e depois da DGYR⁴⁶. Estas alterações associam-se à melhora da resistência insulínica⁴⁷, alteração nas taxas de oxidação de glicose e de ácidos graxos⁴⁸, mudanças nas concentrações de intermediários de diversas vias metabólicas, além de influenciar o eixo intestino-cérebro-fígado^{49,50}.

A manipulação cirúrgica do trato gastrointestinal promove um impacto profundo no metabolismo, induzindo mudanças importantes em processos de sinalização estimulados por nutrientes e hormônios. Além disso, ocorre mudança na morfologia e função intestinal, pois a presença de nutrientes parcialmente intactos no lúmen estimula o aumento da taxa de proliferação celular, número de células, comprimento das vilosidades e profundidade de criptas. Da mesma forma, a ausência de nutrientes causa o efeito oposto. Assim, os segmentos desviados atrofiam-se pela ausência de nutrientes, e os segmentos que permanecem em contato com o fluxo de nutrientes adaptam-se modificando a arquitetura da mucosa entérica. Os efeitos dos nutrientes no lúmen intestinal parecem ser independentes do peso corporal e de fatores sistêmicos⁵¹. Nutrientes e outros fatores secundários da dieta podem afetar diretamente a proliferação celular por meio da via canônica Wnt/ β -catenina nas células tronco ou progenitoras, pelo receptor Lgr5 (do inglês, *G-protein coupled receptor 5*). A glicose parece aumentar β -catenina pela via cAMP/PKA⁵² ou pelo aumento da acilação de β -catenina e translocação para o núcleo celular⁵³.

A melhora do controle glicêmico e a sensibilidade insulínica observada após a DGYR são acompanhadas de mudanças na secreção de hormônios intestinais, como o polipeptídeo pancreático (PP), grelina e GLP-1⁵⁴. As taxas da remissão completa do DM2 vêm sendo entre 69,5% e 89% após a DGYR^{55,56}, acompanhadas de baixas taxas de complicações, incluindo mortalidade (1%), desnutrição e efeitos gastrointestinais⁵⁷. Mas, os mecanismos que sublinham os benefícios da DGYR na melhora do DM2 não estão claros, e o motivo pelo qual alguns pacientes não alcançam a remissão completa do DM2 é desconhecido. Inúmeras pesquisas vêm sendo desenvolvidas com objetivo de compreender estes efeitos, entretanto, ainda não foi possível estabelecer uma hipótese concreta que explique os efeitos metabólicos da cirurgia.

Diversos mecanismos vêm sendo propostos para explicar a remissão do DM2 após a DGYR. A hipótese do intestino proximal sugere que o desvio do duodeno e do jejuno proximal do contato com nutrientes impede a

liberação de sinais diabetogênicos conhecidos como efeito anti-incretina. Assim, o quadro de resistência insulínica seria reduzido, favorecendo a homeostase glicêmica⁵⁸. Nesta hipótese, o GIP atuaria como sinal diabetogênico, pois apresenta efeito insulínico reduzido em pacientes com DM2, o que estimula a secreção de glucagon⁵⁹.

A hipótese do intestino distal propõe que o aumento do fluxo de nutrientes para o jejuno distal resultaria no aumento de sinais antidiabetogênicos mediados pelo PYY e GLP-1, favorecendo a regularização da glicemia. Esta hipótese seria justificada pelas concentrações plasmáticas destes hormônios que, geralmente, estão elevadas após os procedimentos cirúrgicos que desviam o intestino proximal, como é o caso da DGYR⁵. Todavia, estas hipóteses foram pouco exploradas e não possuem, em sua grande maioria, metodologia adequada para comprovar sua validade em seres humanos. Desta forma, os embasamentos teóricos e científicos ainda são limitados nessas hipóteses. Por outro lado, a hipótese que envolve AB parece mais coerente e apresenta argumentos mais sólidos.

AB são moléculas sinalizadoras e regulatórias com funções endócrinas sistêmicas que integram a regulação metabólica. A DGYR promove um aumento do fluxo entero-hepático, elevando a absorção de AB no íleo⁵. O progresso da bile na alça biliopancreática passa a ocorrer em um estado não diluído, no qual há um aumento da disponibilidade de AB para ligação em receptores específicos. Os principais receptores aos quais os AB se ligam são o receptor nuclear FXR (do inglês, *Farnesoid X receptor*) e o receptor de membrana TGR5 (do inglês, *membrane Takeda G-protein receptor 5*) que desempenham uma série de efeitos metabólicos em diversos órgãos, como o fígado, tecido adiposo, músculo esquelético, intestino e vesícula biliar. Assim, os AB desempenham um papel chave na modulação do metabolismo, sendo também reconhecidos como moléculas centrais na sinalização de diversos processos relacionados à utilização de substratos energéticos⁶⁰.

O papel metabólico dos AB é relevante, amplamente reconhecido, atuando por, pelo menos, três principais pontos que desencadeiam eventos sistêmicos. Primeiramente, os AB inibem a gliconeogênese de modo dependente e independente de FXR^{61,62}, e a ligação com TGR5 gera ativação intracelular de hormônios via cAMP, desencadeando diversos processos bioquímicos que influenciam o metabolismo⁶³. Em segundo lugar, os AB também atuam pela via fosfatidilinositol 3 quinase / serina-treonina quinase, promovendo diretamente a sinalização da insulina e a ativação da enzima glicogênio sintase, auxiliando no controle do metabolismo da glicose dependente de insulina no fígado⁶⁴. Em terceiro lugar, a atuação dos AB sobre o fator de crescimento de fibroblastos 19 (FGF19), desempenha papel hormonal e melhora a atividade mitocondrial à resistência insulínica⁶⁵. O FGF19 vem sendo reconhecido como regulador do metabolismo do glicogênio de maneira independente da insulina⁶⁶ e correlaciona-se com o estado nutricional⁶⁷.

No estado fisiológico, a potência da ligação dos AB pode ser diminuída, pois estes encontram-se mais diluídos e associados a micelas em razão da presença de nutrientes⁶⁸. Neste sentido, a melhora da homeostase glicêmica pode, portanto, resultar também do aumento dos níveis plasmáticos de AB, uma condição frequentemente observada após a DGYR^{69,70}. Nesse contexto, o intestino atuaria de forma indireta. Isso porque a secreção dos AB constitui a principal via de eliminação de colesterol, um processo regulado pelo intestino⁷¹.

A literatura também descreve que alteração na composição e na atividade da microbiota após a DGYR poderiam contribuir para a melhora do DM2. O aumento da riqueza da microbiota é bem documentado no pós-operatório da DGYR, sendo associado a alterações na expressão de genes do tecido adiposo⁷².

O papel da microbiota no desenvolvimento de doenças metabólicas como obesidade e DM2 é amplamente reconhecido e parece relacionar-se com inflamação crônica de baixo grau e aumento de translocação

bacteriana. Esse estado inflamado pode promover danos na secreção e sinalização de insulina, contribuindo para o desenvolvimento de DM2⁷³. Todavia, mudanças na composição da microbiota também podem estar associadas aos efeitos dos AB, pois o processo de desconjugação destes ocorre pela ação de hidrolases de sais biliares da microbiota⁷⁴.

2.4 Metabólitos, metaboloma e metabolômica

O surgimento das ciências ômicas, ramo que caracteriza e quantifica coletivamente as moléculas que traduzem a estrutura, função e a dinâmica do organismo, possibilitou o enfoque em aspectos individualizados nos estudos clínicos e experimentais. Neste contexto são estudados genes, proteínas e os produtos bioquímicos da atividade genética, os metabólitos.

Metabólitos são compostos de baixa massa molecular (<1.5 KDa) produzidos ou transformados pelo metabolismo e refletem a resposta final dos sistemas biológicos às alterações genéticas ou ambientais⁸. Estas moléculas podem desempenhar diferentes funções no metabolismo, atuando como combustível para a manutenção de atividades biológicas, sinalização de vias, inibidores ou estimuladores de enzimas, cofatores de enzimas catalíticas e componentes estruturais. O metaboloma pode ser definido como o conjunto de metabólitos em uma matriz biológica, e a metabolômica compreende o estudo científico do metaboloma e os processos químicos envolvendo os metabólitos.

Esta é considerada uma das mais avançadas abordagens do mapeamento químico de um organismo, pois o perfil destas moléculas é diretamente relacionado à função metabólica. Assim, é possível estudar alterações no metabolismo por meio de análises comparativas entre os perfis obtidos para diferentes amostras, compreender diferentes condições e processos metabólicos mais complexos⁷⁵.

O fenótipo metabólico designa características individuais e pode ser determinado basicamente a partir da associação entre a variação genética e outros fatores relevantes que interferem na condição biológica. A caracterização do fenótipo metabólico representa a documentação instantânea da condição de saúde do indivíduo, naquele determinado momento. Este perfil pode ser influenciado por uma série de fatores, dos quais podem ser destacados o estilo de vida, sexo, idade, meio ambiente, dieta e microbiota, além dos fatores genéticos. O fluxo dos comandos biológicos e a contribuição de cada etapa no fenótipo metabólico estão descritos a seguir (Figura 1).

Legenda: DNA, ácido desoxirribonucleico; RNA, ácido ribonucleico; RNAr, ácido ribonucleico ribossômico; RNAm, ácido ribonucleico mensageiro.

Figura 1 - Fluxo dos comandos biológicos e a contribuição de cada etapa no fenótipo metabólico

A Figura 1 descreve que a informação genética codificada no DNA representa “*o que pode acontecer*” ao longo da vida, em todas as suas fases de desenvolvimento e envelhecimento. Esta informação é, posteriormente, transcrita em uma molécula de ácido ribonucleico mensageiro (RNAm), que transmite os comandos que estão sendo realizados e, portanto, representa “*a tradução da mensagem*” naquele determinado momento. Durante este processo, ocorre a formação de elementos-chave do funcionamento biológico e do metabolismo, pois a partir do RNAm são sintetizadas proteínas. As proteínas são responsáveis por executar os comandos transcritos, ou seja, elas são as substâncias que efetivam as ações necessárias para promover o que foi determinado pelo código genético, a proteína é “*o que faz acontecer*”. A função biológica das proteínas apresenta uma ampla diversidade, os mensageiros químicos, as enzimas, os transportadores de membrana e vários constituintes estruturais são proteínas. No entanto, as proteínas podem ou não desempenhar suas funções, havendo a possibilidade de permanecerem inativas de acordo com o estado metabólico. Paralelamente, a transformação e a utilização de moléculas químicas provenientes de dieta ou de reservas endógenas dependem da condição biológica. Assim, o metabolismo seleciona e utiliza substratos para manutenção de suas funções vitais, equilibrando as reações de anabolismo e catabolismo, conforme as necessidades imediatas. Mas, fatores genéticos, estilo de vida, sexo, idade, meio ambiente, dieta e microbiota podem modificar o perfil metabólico. Para determinar este perfil, é necessário identificar os produtos finais destes processos celulares, os metabólitos. Estes regulam a atividade das proteínas, participam dos processos de transcrição e tradução, e representam uma espécie de impressão digital, pois apenas estas moléculas não estão sujeitas a modificações pós-traducionais e podem ser utilizadas para entender “*o que aconteceu*”^{76,77}.

2.5 Espectrometria de massas

A espectrometria de massas analisa compostos químicos a partir de um processo sofisticado de diferenciação e identificação de moléculas com base na razão massa/carga (m/z). Para isto, a amostra biológica (que pode ser urina, plasma, tecido ou outro material) contendo as moléculas de interesse é submetida a um processo rigoroso de preparo, e é inserida em um sistema de análise, sendo conduzida por três unidades básicas principais: câmara de ionização, analisador de massas e o detector⁷⁸.

Em uma amostra complexa, a separação de m/z pode ocorrer de várias formas, mas basicamente isso acontece pela deflexão de partículas provocada por um campo magnético, que é aplicado no analisador de massas. A trajetória, migração, deflexão e aceleração dos compostos químicos ou fragmentos ao longo do campo magnético será diretamente influenciada pela razão m/z . A caracterização das unidades e do fluxograma de operação do espectrômetro de massas é demonstrada na Figura 2. Para as análises metabolômicas, os analisadores de massas mais comumente usados são quadrupolos e tempo de voo (*time of flight* – TOF) isolados ou associados⁷⁸.

Considerando a variação do nível de complexidade e composição das amostras, são propostas diferentes maneiras de conduzir as análises. Em razão da alta sensibilidade da espectrometria de massas, protocolos tradicionais preconizam a separação prévia de moléculas, de acordo com suas características físico-químicas, especialmente a polaridade, para favorecer a identificação de metabólitos. Os procedimentos de extração melhoram a qualidade das análises e são realizados na etapa que antecede a entrada da amostra no sistema de espectrometria de massas, com auxílio de cromatografia líquida ou gasosa⁷⁸.

Apesar da possibilidade de otimização dos procedimentos de extração, a complexidade e a variedade das moléculas do metaboloma tornam virtualmente impossível determinar todos os metabólitos

simultaneamente, utilizando apenas um tipo de plataforma analítica, pois os instrumentos possuem afinidade por determinadas classes de moléculas (Figura 3). Além disso, ainda existe um grande número de metabólitos não identificados ou de função desconhecida⁷⁸.

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) é uma técnica de ampla aplicação nos estudos metabolômicos, e baseia-se na volatilidade dos compostos analisados e sua interação com a fase estacionária (em geral, derivados de siloxana). Como GC-MS é aplicável apenas a compostos voláteis, se faz necessária a transformação dos metabólitos em adutos voláteis durante os procedimentos de preparo de amostras, no qual este processo é chamado de derivatização, constituindo uma etapa fundamental nos estudos metabolômicos por GC-MS⁷⁸.

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS), nos seus vários modos (fase reversa, CSH; e por interação hidrofílica, HILIC) permite uma maior cobertura metabólica de compostos apolares e moderadamente polares, que interagem diferencialmente com as fases móvel e estacionária.

Legenda: HPLC, Cromatografia líquida de alta performance; CE, Eletroforese capilar; GC, Cromatografia gasosa; MALDI, Ionização/desorção a laser assistida por matriz; APCI, Ionização química de pressão atmosférica; EI, Ionização de elétrons; CI, Ionização química; TOF, Tempo de voo; TOF/TOF, associação de duas unidades seguidas de Tempo de voo; MS/TOF, espectrometria de massas acoplada a uma unidade de detecção de tempo de voo; MS, Espectrometria de massas; MS/MS(triplo), Espectrometria de massas tripo quadrupolo; Ion trap, armadilha de íons; Hybrid, detector híbrido; Q0, entrada de íons no sistema de espectrometria de massas; Q1, unidade que seleciona os íons recém-formados; Q2, célula de colisão, íons são fragmentados; Q3, unidade em que os íons selecionados são direcionados ao detector.

Figura 2 - Caracterização das unidades e do fluxograma de operação do espectrômetro de massas⁷⁸

Legenda: GC-MS, cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas; LC-MS, cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas; ESI, ionização por eletrospray; EI, ionização por impacto de elétrons; CI, ionização química; APCI, ionização química por pressão atmosférica; APPI, fotoionização a pressão atmosférica

Figura 3 - Coberturas de metabólitos por plataforma

3 Hipótese e justificativa de estudo

3 HIPÓTESE E JUSTIFICATIVA DE ESTUDO

O DM2 é uma doença metabólica heterogênea cujos sintomas são amplamente descritos, mas a origem exata de seus distúrbios é desconhecida. A progressão do estágio inicial assintomático até a manifestação da doença não é bem definida e, por isso, alterações irreversíveis são observadas na ocasião do diagnóstico, não havendo o estabelecimento de uma base de evidências para identificação da fase subclínica^{79,80}.

Na última década, a evolução da compreensão dos mecanismos fisiopatológicos do DM2 resultou em importantes avanços na abordagem terapêutica. Atualmente, o desenvolvimento de estudos controlados vem contribuindo para a prática clínica, porém, ainda há um grande número de barreiras desafiadoras para o tratamento do DM2, implicando na necessidade de investigações mais abrangentes. A remissão do DM2 é fortemente atribuída ao procedimento de DGYR, contudo, apesar do amplo acervo de pesquisas que investigam esse efeito, os resultados em seres humanos ainda são inconclusivos e não explicam totalmente esta melhora. Assim, dada a natureza do DM2, a investigação do estado metabólico assume um papel central⁸¹.

O reconhecimento do impacto de alterações moleculares promoveu uma revolução nas investigações científicas atuais. O surgimento das ciências ômicas possibilitou a caracterização e quantificação coletiva de moléculas que traduzem a estrutura, função e a dinâmica do organismo, viabilizando o enfoque em aspectos individualizados nos estudos clínicos e experimentais. Nesse contexto, é possível investigar as bases moleculares do estado metabólico e, a partir destas análises, compreender a resposta final dos sistemas biológicos a alterações genéticas ou ambientais.

Alterações metabólicas iniciam-se em nível molecular, celular e tecidual e, muitas vezes, transformações biológicas podem não ser detectadas nos níveis sistêmicos. Para a compreensão de alterações

biológicas complexas, é importante a investigação dos microambientes onde as alterações ocorrem. Este estudo foi desenvolvido para propor um alicerce para observação das bases moleculares de transformações metabólicas gastrintestinais e sistêmicas induzidas pela DGYR, estabelecendo possíveis relações com a melhora do quadro de DM2.

Para o desenvolvimento desta pesquisa, considerou-se que a DGYR pode promover alterações metabólicas intestinais e sistêmicas associadas com a remissão pós-operatória de DM2 em pacientes obesos. A partir da intervenção cirúrgica, múltiplas vias metabólicas seriam moduladas e potencialmente associadas à melhora observada. Com essa perspectiva, espera-se identificar alterações que reflitam o impacto metabólico da DGYR que traduzam a melhora do DM2 no pós-operatório precoce.

Entretanto, a metabolômica proporciona a obtenção de amplos conjuntos de dados que refletem o fenótipo metabólico global e, desta forma, ao contrário de investigações tradicionais, esta abordagem gera hipóteses e possibilita descobertas biológicas fundamentais que seriam impossíveis ou impraticáveis com a abordagem clássica de teste de hipóteses⁸²⁻⁸⁵.

4 Objetivos

4 OBJETIVOS

Estudar as bases moleculares sistêmicas e gastrintestinais da resposta metabólica à derivação gástrica em Y de Roux e sua possível contribuição na melhora pós-operatória do diabetes mellito tipo 2.

5 Métodos

5 MÉTODOS

5.1 Ética

O protocolo desta pesquisa foi aprovado pelo comitê de ética institucional local, a Comissão de Ética para Análises de Projetos de Pesquisas do Hospital das Clínicas (CAPPesq – ANEXO A) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC FMUSP), e aprovado em 4 de junho de 2014, sob registro on-line 4.241 com número de Parecer 675.029 e www.clinicalTrials.gov (NCT01251016)⁸⁶. Todos os procedimentos foram realizados, de acordo com a declaração de Helsinki de 1964, suas adequações posteriores e padrões éticos comparáveis. Todas as pacientes manifestaram concordância na participação deste protocolo, registrada pela assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – ANEXO B).

5.2 Desenho do estudo

Trata-se de uma pesquisa clínica prospectiva autocontrolada (pareada), com abordagem metabólica multicompartimental e multiplataformas. Os principais procedimentos estão ilustrados na Figura 4.

● Triagem	Identificação do perfil das pacientes pela história clínica, registros de exames e prescrições
● Avaliação da indicação cirúrgica	Avaliação clínica, física e laboratorial realizada pelo 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	Aferição do peso e composição corporal pelo exame de pletismografia de deslocamento aéreo
● Coleta de plasma	Coleta de plasma em jejum de 12h, preparo de alíquotas e armazenamento em -80°C
● Coleta de urina	Coleta de urina 24 horas, 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
● GRYR	Intervenção cirúrgica: Gastroplastia Redutora a Y de Roux. Procedimento acompanhado pela aluna executante do projeto
◆ Acompanhamento pós-operatório	As pacientes foram avaliadas nos períodos de 3, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias do pós-operatório em relação ao peso, uso de medicação e exames laboratoriais

Legenda: d, dias; HC, Hospital das Clínicas; FMUSP, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; TCLE, termo de consentimento livre e esclarecido.

Figura 4 - Desenho do protocolo do estudo com a descrição dos procedimentos gerais de exames e coletas de amostras em seus respectivos tempos

Brevemente, foi realizada uma avaliação da história clínica pelos prontuários médicos e prescrições, seguidas de entrevista pessoal. Quando necessário, exames de sangue também foram feitos. Após esta triagem, as pacientes foram avaliadas pelos residentes de cirurgia da Divisão de Cirurgia Bariátrica e Metabólica do Departamento de Gastroenterologia do HC FMUSP, sendo realizados exames físicos e laboratoriais de rotina e outros procedimentos de diagnóstico. Para estabelecer a indicação cirúrgica da DGYR, os casos foram individualmente discutidos por uma equipe multidisciplinar qualificada, durante as reuniões da comissão médica do departamento.

Como parte do acompanhamento, após a seleção dos casos, as pacientes foram submetidas ao exame de composição corporal, seguido de procedimentos para coleta de amostras de plasma, urina e biópsias. Na sequência, o procedimento cirúrgico foi realizado e a evolução clínica foi acompanhada, quinzenalmente, até os 3 meses, momento em que as amostras foram novamente coletadas.

5.3 Casuística e critérios de seleção de pacientes

Voluntárias foram recrutadas entre as pacientes obesas que foram admitidas no Departamento de Gastroenterologia na Divisão de Cirurgia Bariátrica e Metabólica do HC FMUSP. Foram incluídas pacientes do sexo feminino com idade entre 18 e 60 anos, com direito independente de assinar um formulário de consentimento, diagnosticadas com DM2 (glicemia de jejum de 126 mg/dL ou maior, HbA1C > 7% ou em uso de medicação antidiabética oral), Índice de massa corporal (IMC) entre 35 e 50 kg/m² e indicação clínica para o procedimento DGYR. Não foram incluídas pacientes em uso de insulina, diagnosticadas com disfunção hepática grave (ALT e AST > 90 U/L, FA > 300 U/L, GGT > 108 U/L), colecistectomizadas, portadoras de alterações na glândula tireoide (TSH > 4,2 µIU/ml, T3 > 200 ng/dL, T4 > 14,1 µg/dL), com presença de hérnia abdominal, colecistectomizadas ou que

estivessem participando de outra pesquisa intervencionista (Figura 2). Um total de 507 pacientes foi submetido à triagem, até a obtenção das 22 pacientes que se enquadravam nos critérios de inclusão (Figura 5).

Legenda: N, número de pacientes; DM2, diabetes mellito tipo 2; DGYR, derivação gástrica em Y de Roux.

Figura 5 - Fluxo de seleção de pacientes. Quadros pontilhados indicam fatores de não inclusão identificados ao longo do processo de triagem e seleção

5.4 Local de execução do trabalho

O presente protocolo de pesquisa foi realizado no Laboratório de Nutrição e Cirurgia Metabólica do Aparelho Digestivo (LIM-35) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), em parceria com a Unidade de Cirurgia Bariátrica e Metabólica (HC-FMUSP) e com o Serviço de Endoscopia Gastrointestinal (HC-FMUSP). As análises metabolômicas foram realizadas no *NIH West Coast Metabolomics Center* (WCMC), localizado no Centro de Genomas da Universidade da Califórnia, em Davis (Estados Unidos da América), durante o estágio internacional de 16 meses da aluna executante deste projeto.

5.5 Derivação gástrica em Y de Roux

Todas as pacientes foram submetidas a DGYR por laparotomia. A técnica reduz o volume do estômago com a construção de uma bolsa gástrica proximal de, aproximadamente, 30 ml e exclui o restante do estômago, duodeno e parte do jejuno proximal do fluxo de nutrientes. Para o desenvolvimento do presente estudo, o tamanho de alças foi padronizado, sendo a biliopancreática de 50-60 cm e a alça alimentar de 100-120 cm. A reconstrução do trânsito alimentar foi realizada com a anastomose gastrojejunal término-lateral entre a bolsa gástrica e o jejuno. Foi realizada a secção do jejuno proximal ou médio, medido entre 50 e 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 exclusiva 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. Assim, o fluxo biliodigestivo é restaurado, formando-se

a alça biliopancreática. Esta enteroanastomose (Y de Roux – Figura 6) marca o ponto de convergência entre as duas alças intestinais, em que o alimento que vem pela alça intestinal alimentar encontra-se com as secreções biliodigestivas que vem da alça biliopancreática. A partir dessa junção, denominada alça intestinal comum, há maior absorção de nutrientes no restante do intestino distal. O procedimento cirúrgico foi acompanhado pelo pesquisador do projeto para segurar que as alças intestinais seriam devidamente medidas durante a cirurgia.

Figura 6 – Ilustração da derivação gástrica em Y de Roux

5.6 Acompanhamento da evolução clínica

Para monitorar a evolução clínica, as pacientes foram acompanhadas no pós-operatório, inicialmente, 3 dias após a intervenção cirúrgica e a cada 15 dias até os 3 meses. Este acompanhamento teve como objetivo monitorar o estado de saúde e registrar indicadores clínicos de progresso. Foi avaliado o peso corporal e IMC, realizados exames laboratoriais de rotina e verificação das medicações utilizadas.

O peso corporal foi aferido em balança eletrônica com carga máxima 500 kg e subdivisão em frações de 100 gramas (Lucastec®, Brasil) e o IMC foi calculado pela fórmula peso (kg)/altura (m)², sendo que a altura foi medida com auxílio de um estadiômetro (Sanny®, American Medical do Brasil). As medidas antropométricas foram realizadas de acordo com as orientações das diretrizes do manual de antropometria (IBGE, 2013)⁸⁷.

O uso de medicamentos foi consultado nas prescrições e relato dos pacientes durante a consulta de acompanhamento. Exames laboratoriais de rotina incluíram glicemia de jejum, insulina, peptídeo C, Colesterol total, HDL, LDL, VLDL e triglicerídeos. A HbA1C foi dosada nos pré e pós-operatórios de 3 meses. Todos os exames foram realizados no laboratório central do HC FMUSP. Adicionalmente, aplicou-se o Modelo de Avaliação da Homeostase (HOMA) para determinar o grau de resistência insulínica (IR) e a capacidade funcional das células betapancreáticas (BETA), com as fórmulas descritas a seguir⁸⁸.

HOMA-IR	$\text{Glicemia jejum} \times 0,0555 \times \text{Insulina jejum} / 22,5$
	Valores de referência: $\leq 3,40$

HOMA-BETA	$(20 \times \text{Insulina jejum}) / (\text{Glicemia jejum} \times 0,0555) - 3,5$
	Valores de referência: 167,0 - 175,0

5.7 Composição corporal

Para determinação da gordura e da massa magra corporal em quilos (kg) e em percentual (%) as pacientes foram avaliadas por meio de pletismografia de deslocamento aéreo (PDA). Esta técnica foi realizada com o aparelho BOD POD® *body composition system; Life Measurement* (COSMED®USA). O equipamento utiliza a relação inversa entre pressão e volume, baseado na Lei de Boyle e aplica os princípios da densitometria para a estimar a composição corporal por meio do cálculo da densidade corporal ($D = \text{massa/volume}$)⁸⁹.

5.8 Classificação dos pacientes de acordo com a melhora do DM2

Ainda como parte do acompanhamento, após 1 ano da DGYR, a remissão do DM foi avaliada de acordo com o critério da *American Diabetes Association* (ADA): glicemia de jejum <100mg/dl e HbA1C <6,5%, na ausência de terapia medicamentosa ou procedimentos relacionados durante, pelo menos, 12 meses após a cirurgia⁹⁰. Desta forma, as pacientes foram subdivididas: pacientes respondedores e não respondedores.

5.9 Obtenção das amostras

5.9.1 Plasma

Amostras de plasma foram coletadas após o jejum de 12h, utilizando tubos tratados com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e centrifugados a 2.800 rpm durante 10 minutos em 4°C. O plasma sobrenadante foi transferido para microtubos em pequenas alíquotas e mantido em -80°C até a análise.

5.9.2 Urina

As amostras de urina de 24h foram coletadas e mantidas em temperatura constante ($\cong 4-8^{\circ}\text{C}$) da coleta até a manipulação. Estas amostras foram transferidas para microtubos em pequenas alíquotas e mantidas em -80°C até a análise.

5.9.3 Biópsias gastrintestinais

Biópsias do estômago corpo alto (ECA) e corpo médio (ECM), duodeno, jejuno e íleo foram coletadas por meio de enteroscopia anterógrada de duplo balão. O exame foi realizado no Serviço de Endoscopia Gastrointestinal do HC FMUSP, cerca de 2 semanas antes e no pós-operatório de 3 meses após DGYR. O preparo para o exame incluiu jejum de 12 horas e suspensão de medicação entre 3-5 dias (exceto hipertensivos). O enteroscópio de duplo-balão utilizado foi o modelo EN-450T5, Fujifilm Corporation®, Tokyo-Japão, com um tubo flexível (overtube modelo TS-13140, Fujifilm Corporation®, Tokyo-Japão) com dois balões acoplados que facilitam a passagem do enteroscópio ao longo do intestino delgado. Após a coleta, as biópsias foram transferidas para criotubos e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, sendo posteriormente armazenadas -80°C até as análises. No exame pré-operatório, os locais de coleta das biópsias foram marcados com tinta nanquim SPOT®, utilizado como ponto de referência para a coleta do pós-operatório.

5.10 Análises metabólicas

Como o objetivo do estudo é composto pela caracterização de dois desfechos principais (1- descrever a resposta metabólica geral à DGYR e 2- correlacioná-la à resposta metabólica com a melhora do DM2), os dados obtidos foram analisados de duas formas. Primeiramente, os efeitos gerais da cirurgia foram avaliados pela comparação de todos os indivíduos antes e

após a cirurgia, com todas as amostras. Para a segunda abordagem, foi realizada uma subdivisão de grupos, classificando-os em respondedores e não respondedores à remissão do DM2, de acordo com os critérios de classificação da ADA (Figura 7).

Legenda: DGYR, derivação gástrica em Y de Roux.

Figura 7 - Método de análises utilizado para realização de abordagens de estudo

A segunda abordagem incluiu apenas as amostras de plasma e urina, em razão do número de amostras disponíveis do tecido gastrointestinal ser insuficiente para a subdivisão dos grupos e para realização da análise estatística adequada. O fluxo completo das análises está detalhado na Figura 8.

Legenda: LC-MS, cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas; GC-MS, cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas; DGYR, derivação gástrica em Y de Roux.

Figura 8 - Detalhamento do fluxo completo de análises de dados

5.11 Preparo de amostras

Considerando a ampla diversidade química e a faixa de concentração de metabólitos em amostras biológicas, foram realizados ajustes no preparo das amostras, no sentido de favorecer a separação de metabólitos por classes. A extração de metabólitos foi realizada utilizando dois protocolos, sendo um integrado, com separação de classes polares e apolares por fases e outro específico para metabólitos primários. Na extração integrada, a separação em fases polar e apolar foi obtida utilizando uma solução aquosa à base de metanol e água, associada a uma mistura de padrões internos (IS), seguida da extração orgânica com metanol-tolueno. Os extratos secos foram diluídos novamente em uma solução de metanol e água.

Para extração de metabólitos primários, foi utilizada uma solução mista de acetonitrila, isopropanol e água, adicionadas à N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA) com 1% de trimetilclorosilano (TMCS). Uma mistura de marcadores internos de retenção foi adicionada aos extratos secos para trimetilsililação dos prótons para aumentar a volatilidade dos metabólitos. O índice de retenção foi preparado utilizando ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) com comprimento da cadeia linear de C8, C9, C10, C12, C14, C16, C18, C20, C22, C24, C26, C28 e C30, dissolvidos em clorofórmio na concentração de 0.8mg/ml (C8-16) e 0,4 mg/ml (C18-C30).

As biópsias gastrintestinais incluíram uma etapa adicional no preparo das amostras, realizada para fragmentar e homogeneizar o tecido. Esta etapa foi realizada com auxílio de esferas de aço em um equipamento automático de alto rendimento (Geno/Grinder®).

O protocolo completo do preparo de amostras está descrito no material suplementar (ANEXO C).

5.12 Análise alvo de AB

Para extração de AB, 50 µL de amostras de plasma foram tratadas com uma combinação de acetonitrila e metanol (1:1 v/v) na presença de padrões internos que incluíam sete espécies modificadas com deutério: ácido glicocólico-d4, ácido tauroquenodesoxicólico-d4, ácido cólico-d4, ácido glicoquenodesoxicólico-d4, ácido quenodesoxicólico-d4, ácido desoxicólico e ácido litocólico, todos na concentração de 1000 nM. Em seguida, as amostras foram tratadas com 5 µL de antioxidantes (0,2 mg/ml de hidroxitolueno butilado/ EDTA) diluído com metanol e água (1:1 v/v). Na sequência, as amostras foram misturadas a 25 µL de um coquetel-padrão, descrito com maiores detalhes em anexo (ANEXO C).

5.13 Volume de amostras de acordo com a plataforma e tipo de amostra

A quantidade de amostras brutas foi determinada de acordo com a complexidade da amostra biológica, baseada na abundância de metabólitos.

Plataforma analítica	Plasma	Urina	Biópsias
LC-MS CSH C18 TOF	20ul	Não se aplica	5mg
LC-MS CSH C18 TOF AB	50ul	Não se aplica	Não se aplica
LC-MS HILIC TOF	20ul	200ul	5mg
GC-MS TOF	30ul	40ul*	5mg

*40 ul representa a base dos extratos na primeira aquisição, o volume das amostras foi determinado de acordo com os níveis de creatinina.

5.14 Análises por espectrometria de massas

Para obter uma visão mais abrangente das alterações metabólicas, as análises metabolômicas do presente estudo foram conduzidas de maneira *untarget*, na qual o máximo de metabólitos possível é mensurado. Adicionalmente, para aumentar o poder analítico, a cobertura de moléculas investigadas foi ampliada com a combinação de três instrumentos com afinidade para diferentes classes de metabólitos – abordagem multiplataformas.

Compostos polares e lipídios complexos foram mensurados nos instrumentos 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS e Agilent 1290 Infinity II LC System (Agilent Technologies®), uma combinação de cromatografia líquida de ultraperformance (UPLC) com o método TOF *tandem mass spectrometer (MS/MS)*, utilizando duas colunas: interação hidrofílica (HILIC) para compostos polares e de superfície híbrida carregada (CSH) para análise de compostos apolares. Adicionalmente, foi realizada cromatografia gasosa acoplada ao TOF no instrumento Agilent 6890 GC Pegasus III TOF MS para identificação de metabólitos primários (aminoácidos, hexoses, fosfatos, nucleotídeos, lipídios e sais orgânicos).

Todas as amostras biológicas foram analisadas em conjunto, de acordo com o tipo de amostra, e a aquisição foi realizada com distribuição aleatória.

5.15 Espectrometria de massas

As intensidades dos picos de metabólitos foram determinadas como descrito abaixo.

5.15.1 Instrumento 1 – Cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (LC-MS)

Agilent 1290 Infinity II LC System

Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS

Modo de aquisição

Análises foram realizadas com a taxa de fluxo de 6.0ml/min e volume de injeção de 1.67 μ l para o modo positivo e 5 μ l para o modo negativo. O instrumento foi configurado para mensurar moléculas com a faixa de varredura entre 60 e 1.700 m/z e velocidade de 2 espectros por segundo.

A ionização por *eletrospray* foi aplicada a +305kV. Durante a mensuração de moléculas apolares com a coluna CSH, a fragmentação MS/MS foi realizada com a energia de colisão de 20eV para ambos os modos positivo e negativo. Para compostos polares, apenas o modo positivo foi conduzido, com a mesma energia de colisão. As amostras foram mantidas a 4°C durante toda aquisição. Mais detalhes são descritos, a seguir:

Fase móvel: 400 μ l/min (fluxo de injeção)

A: 60% acetonitrila em água ultrapura

B: 100% isopropanol

Gradiente: 0,6 μ l/min

0 - 2 min: 70% A e 30% B

2 -2,5 min: A: 52% A e 48% B

2,5 - 11 min: 18% A e 82% B

11 - 12 min: 1% A e 99% B

12,10 a 15 min: 85% A e 15% B

Fase estacionária (HILIC): coluna ACQUITY UPLC® BEH Amide (Waters-Part nº 186004802) 2.1X150mm, tamanho de partícula de 1,7µm.

Fase estacionária C18: coluna ACQUITY UPLC® CSH™ C18 (Waters-Part nº 186005297) 2.1X150mm, tamanho de partícula de 1,7µm.

Todas as amostras foram analisadas de maneira aleatória na mesma corrida. Mudanças na razão da altura dos picos e a concentração de analitos também foram monitoradas.

5.15.2 Instrumento 2 – Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (GC-MS)

Gerstel CIS4 – com injetor dual MPS

Agilent 6890 GC Pegasus III TOF MS

Condições do injetor

O equipamento Agilent 6890 GC é equipado com um sistema Gerstel de troca automática de liner (ALEX) que inclui um trilho duplo de amostra polivalente e um sistema de injeção a frio Gersel CIS com programa de temperatura seguinte: 50°C a 275°C e temperatura final na taxa de 12°C por segundo, com um detentor de 3 minutos. O fluxo do injetor foi 0.5l com velocidade de injeção de 10 µl/s em um injetor sem divisão com tempo de purga de 25 segundos. O *liner* foi trocado a cada dez amostras e a seringa para injeções de 10 µl foi lavada três vezes com 10 µl de acetato de etil.

Condições da cromatografia gasosa

Foi utilizada uma coluna capilar Rtx5Sil MS de 30 m com diâmetro interno de 0,25 mm (filme de dimetil polisiloxano 95% com espessura de 0,25 μm), com 10 m adicionais integrados. Um fluxo constante de gás Hélio a 99.9999% de pureza foi injetado em 1 ml/min. A temperatura do forno foi mantida constante a 50°C durante 1 minuto e, então, reduzida para 20°C/min e aumentada até 330°C, temperatura na qual foi mantido constante durante 5 min.

Configurações do espectrômetro de massas

O espectrômetro de massas foi controlado com o software do fabricante. A linha de transferência de temperatura entre a cromatografia gasosa e o espectrômetro de massas foi fixada em 280°C. Foi aplicada a ionização por impacto de elétrons a 70v, com a temperatura da fonte a 250°C. A taxa de aquisição foi de 17 espectros por segundo, com faixa de varredura de 85500Da.

5.15.3 Instrumento 3 – Cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas híbrido (LC-MS) para análise de AB

Waters ACQUITY UPLC acoplado a AB Sciex 4000

QTrap triplo quadrupolo linear

Modo de aquisição

A cromatografia líquida e o espectrômetro foram controlados com o software Analyst 1.6.2, o tempo de separação foi 18 min. A coluna foi mantida a 45°C.

Fase móvel: 400 µl/min (fluxo de injeção)

A: 0,1% ácido fórmico em água ultrapura

B: 0,1% ácido fórmico em acetonitrila

Gradiente: 0,6 µl/min

0–0.5 min: 10% B e 90% A;	4.6–11 min 30.4-40% B e 69,6-60% A;
0.5–1 min: 10-20% B e 80-90% A;	11-12.5 min 40-95% B e 60-5% A;
1-1.5 min: 20-22.5% B e 80-77,5% A;	12.5–14 min 95% B e 5% A;
1.5–4.3 min 22.5-30% B e 77,5-70% A;	14–14.5 min 95-10% B e 5-90% A;
4.3–4.6 min 30-30.4% B e 70-69,6% A;	14.5-18 min 10% B e 90% A.

Configurações do espectrômetro de massas

As análises foram realizadas no modo de monitoramento de múltiplas reações (MRM), com ionização em *electrospray* no modo negative (ESI-). O gás de colisão e cortina utilizado foi N₂. Os parâmetros da fonte de ESI foram otimizados, com temperatura a 600°C, voltagem capilar a -4500V, fonte de íons turbo *spray* gás GS1 e GS2 a 30 psi, gás de cortina de 35 psi. O potencial de *declustering* (DP) potencial de entrada (EP), potencial de saída da célula (CXP), *dwell time* e energia de colisão (EC) foram otimizados de acordo com a resposta de cada analito.

Fase estacionária: coluna Waters ACQUITY UPLC BEH C18 (100 × 2,1 mm; 1,7 µm)

Controle de qualidade

Como estamos primeiramente interessados nas respostas no nível de regulação de metabólitos e estes se relacionam a diversas mudanças, foi necessário controlar a variação biológica da variação proveniente de fontes indefinidas que são, involuntariamente, introduzidas durante a condução dos experimentos. A fonte de íons, efeitos de matriz como supressão iônica, assim como a detecção, integração e alinhamento de picos durante o processamento de dados podem promover erros.

Para validar a consistência técnica e garantir que o instrumento em si não causou amplos desvios aleatórios ou sistemáticos, a partir dos dados obtidos durante a aquisição das amostras, a variação analítica e a reprodutibilidade dos perfis foram verificadas durante as análises. Isto foi realizado utilizando uma mistura de moléculas de referência que cobriam todas as classes químicas de metabólitos identificados em análises típicas.

Esta mistura é nomeada amostra de controle de qualidade (QC) e representa uma estratégia de correção em lotes de amostras, muito utilizada e necessária para estudos de metabolômica em larga escala. Na presente investigação, foram utilizadas amostras de plasma EDTA dissódico (HMPLEDTA) produzido industrialmente (Bioreclamation IVT- Westbury, NY/USA). Este QC foi injetado a cada 10 amostras durante as análises no sistema UPLC-MS. Para o monitoramento do GC-MS, uma curva de calibração de seis pontos foi utilizada com uma mistura de moléculas conhecidas em diferentes concentrações. Adicionalmente, padrões internos modificados com isótopos foram misturados às amostras, para ajustar a escala das amostras com as condições das bibliotecas por meio da correção do tempo de retenção para LC-MS e o índice de retenção (RI) para análises no sistema GC-MS.

6 Processamento de dados

6 PROCESSAMENTO DE DADOS

Os dados foram adquiridos pelos métodos descritos, os dados brutos foram convertidos por meio do software AnalysisBaseFileConverter (Reifycs Inc., Tokyo, Japan). Para lipídios complexos e metabólitos polares analisados por LC-MS, os dados foram processados pelo software MS-DIAL gratuito, desenvolvido no WCMC (http://prime.psc.riken.jp/Metabolomics_Software/)⁹¹.

O processamento de dados fornece métodos automáticos de detecção de picos (*peak piking*), alinhamento de tempo de retenção para corrigir desvios experimentais na instrumentação e quantificação relativa. Além disso, para a identificação equivocada, como diferentes isômeros ou cadeias laterais de ácidos graxos, os dados de fragmentação de moléculas (tandem MS) foram utilizados para determinar a identidade das estruturas.

Metabólitos primários analisados por espectros de GC-MS foram processados com base nos dados BinBase, sendo os resultados filtrados baseados em múltiplos parâmetros para excluir picos inconsistentes.

7 Identificação e anotação de metabólitos

7 IDENTIFICAÇÃO E ANOTAÇÃO DE METABÓLITOS

Milhares de *features* de metabólitos – picos correspondentes a íons com razão m/z e tempo de retenção únicos – podem ser rotineiramente detectados em amostras biológicas. Os *features* de cada conjunto de dados foram associados com um valor de intensidade, indicando sua abundância relativa na amostra. A identificação dos metabólitos foi pautada na massa acurada e no tempo de retenção acurado, comparados com as bibliotecas do WCMC contendo espectros correspondentes.

Todas as entradas do BinBase foram comparadas com espectros de massa da biblioteca FiehnLib com 1.200 espectros autênticos utilizando informações de índice de retenção e espectros de massa ou da biblioteca 11 do Instituto Nacional de Tecnologia de Padrões (NIST).

Os metabólitos foram reportados de análises subsequentes, representando <20% do coeficiente de variação do QC, após a normalização. Foram excluídos os seguintes metabólitos⁹²:

- 1) Foram confundidos com contaminantes potenciais;
- 2) Foram mensurados em <50% das amostras; e
- 3) Não puderam ser separados na base dos padrões cromatográficos de eluição e divisão em espectros iônicos m/z “pai e filho”;

Para os 24 AB, a detecção e quantificação foram realizadas calculando intensidade/concentração de acordo com uma curva de calibração de 7 pontos.

8 Normalização

8 NORMALIZAÇÃO

As etapas de normalização são necessárias para remover fatores que causam viés sistemático indesejado nas intensidades de íons em razão das alterações ocorridas durante o preparo de amostras ou pela condição das amostras. Neste estudo, a normalização das amostras foi determinada considerando sua natureza.

8.1 Plasma

Os dados obtidos das amostras de plasma foram reportados com a altura dos picos quantitativos, normalizados pela soma da intensidade de todos os metabólitos identificados (mTIC) e utilizados para análises estatísticas posteriores.

8.2 Urina

A concentração urinária de qualquer metabólito depende não só da taxa de excreção, mas também do fluxo urinário, pois o sistema renal regula a reabsorção de água. Para ser consistente com as concentrações verdadeiras de metabólitos e para manter as amostras comparáveis entre si, as amostras de urina foram normalizadas, de acordo com os níveis de creatinina. Esta estratégia é, frequentemente, utilizada em estudos de metabolômica, pois a creatinina é relacionada com a produção de metabólitos e sua taxa de eliminação é estável e não muda em 24h, sendo proporcional à massa magra.

Adicionalmente, é importante destacar que, em relação aos níveis de creatinina e a normalização das amostras, em pacientes diabéticos, a

glicosúria pode causar modificação não enzimática de moléculas com grupo amina, e isto, possivelmente, leva a mudanças em outros metabólitos durante o preparo de amostras, podendo haver reações durante a adição de solventes no processo de extração, injeção, cromatografia, ionização, fragmentação ou detecção⁹³.

8.3 Biópsias gastrintestinais

Partindo do princípio de que a quantidade de tecido é diretamente proporcional à concentração de metabólitos, para a mensuração precisa da concentração relativa de metabólitos em amostras comparáveis, as amostras de tecido foram normalizadas pelo peso. Cerca de 5 mg das biópsias descongeladas foram utilizados nas extrações para análises metabolômicas, e a concentração relativa foi ajustada após o processamento de dados.

9 Análise estatística

9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

9.1 Conjunto de dados das análises metabolômicas

Neste estudo, as análises estatísticas e a interpretação dos dados foram focadas apenas nos metabólitos conhecidos. Estes foram agrupados em categorias biológicas, classificadas pelo *NIH Medical subject heading from United States National Library of Medicine*. Antes das análises propriamente ditas, os dados foram transformados em log e escalonados em pareto, reduzindo a importância relativa de valores muito altos, mas, mantendo a estrutura dos dados parcialmente intacta.

O teste de *Wilcoxon* não paramétrico foi aplicado para reduzir o conjunto geral de valores, o potencial de *over-fitting* e favorecer a interpretação biológica das assinaturas metabólicas. Os p-valores brutos foram considerados na etapa que responde ao primeiro objetivo, que consiste na descrição de eventos biológicos relacionados ao impacto da DGYR. Para ser consistente com a literatura biológica, o nível de significância de 5% ($p < 0.05$) foi empregado.

Análises multivariadas foram realizadas nos modelos supervisionado e não supervisionado. A análise dos componentes principais (PCA) representa uma ferramenta de padrão de reconhecimento analítico não supervisionado, que fornece uma visão geral de dados complexos por meio da análise de covariância de estrutura. As coordenadas das amostras são reescritas em um outro sistema de eixo, mais conveniente para a análise de dados. Em outras palavras, representam uma transformação linear que preserva o máximo da variância dos dados originais em uma dimensão menor, e sua aplicação revela a estrutura de grupos quando a variação intragrupo é suficientemente menor do que a variação entre grupos⁹⁴.

A análise discriminante parcial por mínimos quadrados (PLS DA), consiste no modelo multivariado supervisionado, que depende da classificação dos grupos estabelecidos e é usada para otimizar a divisão em diferentes grupos de amostras. Isto é realizado com base na ligação das matrizes de dados, na qual a informação estatística é obtida do modelo PLS DA e pode ser utilizada para determinar quais metabólitos contribuem mais para a separação dos grupos⁹⁵.

Estes metabólitos foram identificados como variáveis de importância na projeção (VIP). Os dados foram analisados utilizando uma ferramenta de processamento de dados de metabolômica MetaboAnalyst 2.0 (<http://www.metaboanalyst.ca>)⁹⁶.

O *fold change* (FC) foi aplicado para determinar as alterações relativas e, para descrever o tamanho de seu efeito e a direção das alterações dos metabólitos. O cálculo consistiu na razão entre a média pós/pré-operatório e os valores menores que 1 foram convertidos e acrescentados de sinal negativo (-).

9.2 Ácidos Biliares

O tratamento dos dados obedeceu aos mesmos parâmetros descritos para os demais conjuntos de dados das análises metabolômicas globais. Valores de p brutos foram utilizados para selecionar os AB significativamente alterados.

9.3 Análise de enriquecimento

A análise de enriquecimento foi utilizada como uma representação geral para diferenciar um conjunto de metabólitos que está sendo mais afetado em diferentes classes de amostras. Uma lista de metabólitos e suas

abundâncias relativas, incluindo mudanças, foi submetida no Metaboanalyst 3.0⁹⁷, para calcular quando uma via, em particular, estava estatisticamente mais representada.

9.4 Mapeamento de *Network*

Para comunicar ideias sobre os sistemas biológicos, o mapeamento de network foi criado para gerar uma representação visual e exibir mais detalhes dos dados de maneira mais coesiva e perspicaz. A correlação de networks em metabolômica representa uma visão bruta das correlações observadas. Todos os metabólitos foram organizados em um plano bidimensional, de modo que as distâncias em pares refletem, aproximadamente, sua correlação de pares em uma escala multidimensional. A relação química e bioquímica foi construída entre todos os metabólitos identificados e os códigos de identificação química do PubChem (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/) foram utilizados para calcular as similaridades de estrutura. As assinaturas moleculares foram comparadas e um limite para estrutura foi definido pelo coeficiente de Tanimoto 0.7. As propriedades dos pontos (*nodes*) no *network* representam metabólitos que foram definidos com base em modelos estatísticos e multivariados. MetaMapp (metamapp.fiehnlab.ucdavis.edu)⁹⁸ foi utilizado para gerar arquivos, que foram, em seguida, processados no pacote de bioinformática para visualização e integração de dados, o Cytoscape 3.5.1⁹⁹.

9.5 Enriquecimento estatístico de similaridade química

O enriquecimento estatístico baseado na similaridade química foi aplicado utilizando as ontologias químicas e similaridades estruturais para agrupar metabólitos (ChemRICH <http://chemrich.fiehnlab.ucdavis.edu/>)¹⁰⁰.

A estratégia constrói conjuntos de todos os metabólitos identificados de acordo com o estudo e sem sobreposições. A ferramenta gera clusters de metabólitos, conforme a similaridade química e o mapeamento de ontologias, utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov e mostra o impacto significativo de agrupamentos do estudo ($p < 0.05$); a presença de vias existentes relacionadas aos metabólitos é checada utilizando a base de dados do NCBI BioSystems, encontrada em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosystems/>, que centraliza e cruza as conexões com conjuntos de dados existentes¹⁰¹.

9.6 Variáveis Clínicas

A análise estatística dos parâmetros clínicos contou com a análise descritiva de todas as variáveis, seguida do Teste t para dados que apresentam normalidade conforme o Teste de *Shapiro-Wilks* e *Wilcoxon-test* para aqueles não normais de acordo com o *Shapiro-wilks*.

10 Resultados

10 RESULTADOS

Esta pesquisa possui caráter multicompartimental e investiga plasma, urina e biópsias de cinco regiões do trato gastrointestinal, totalizando sete tipos de amostras. Em razão da complexidade destas matrizes biológicas, foram usadas três plataformas analíticas para determinar com maior precisão o perfil metabolômico global. Adicionalmente, foi realizada análise-alvo de AB no plasma, reconhecendo seu papel metabólico e regulatório.

A partir destas análises, um amplo conjunto de dados foi gerado. Para integração destas informações e determinação da importância clínica e biológica dos resultados, diferentes ferramentas de estatística e bioinformática foram aplicadas. Os resultados foram explorados sob duas perspectivas principais:

- Identificação do impacto da DGYR sobre o perfil metabolômico global, comparando as amostras sistêmicas e gastrintestinais nos períodos pré e pós-operatório;
- Avaliação da relação entre as alterações metabolômicas e a melhora do DM2, comparando as amostras sistêmicas de grupos de pacientes classificados de acordo com a remissão completa;

Os resultados estão apresentados conforme cada tipo de amostra, seguindo as perspectivas descritas acima. A ordem de apresentação das análises segue um padrão lógico, onde foram gerados gráficos e tabelas de visualização dos dados, que permitem a identificação de mudanças no perfil global, classes químicas alteradas, metabólitos importantes, potenciais vias enriquecidas, dentre outros aspectos fundamentais.

10.1 Evolução de parâmetros clínicos

A DGYR promoveu impacto positivo sobre todos os parâmetros clínicos e de composição corporal avaliados após 3 meses (Tabela 2). O detalhamento da evolução destes parâmetros também é apresentado em formato de gráficos, onde é possível observar a evolução, de acordo com as medidas tomadas ao longo do acompanhamento (Figura 9).

Tabela 2 - Evolução de parâmetros clínicos do pré e pós-operatório de 3 meses

Variáveis	Média		Desvio padrão		Mediana		Mínimo		Máximo		p valor
	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	
% Gordura corporal	51.8	45.3	6.4	6.3	52.5	46.4	31.8	32.6	63.5	55.4	0.000
% Massa magra	48.2	54.7	6.4	6.3	47.5	53.6	36.5	44.6	68.2	67.4	0.000
Gordura corporal (kg)	58.9	42.0	13.5	10.0	58.4	43.2	33.7	21.0	85.0	61.2	0.000
Massa magra (kg)	53.9	49.8	7.0	5.7	53.7	49.2	41.2	40.7	72.3	61.9	0.003
Peso (kg)	112.8	91.8	15.6	12.2	109.5	86.9	81.9	63.2	141.2	112.0	0.000
Glicose (mg/dL)	215.9	104.0	72.5	21.7	208.0	98.5	77.0	75.0	359.0	159.0	0.000
Insulina (μU/mL)	21.7	11.2	14.7	9.3	16.5	7.9	5.0	4.1	76.6	51.5	0.000
%HbA1c	8.9	6.0	1.7	0.5	8.6	6.0	5.5	5.0	12.8	7.3	0.000
HOMA-IR	11.2	2.8	9.0	2.6	8.7	1.9	2.1	0.8	47.2	13.7	0.000
HOMA-BETA	38.6	36.5	29.8	31.2	28.5	28.7	5.7	14.2	110.2	168.3	0.833
Peptídeo C (ng/mL)	4.0	2.9	1.3	0.9	4.0	2.9	1.8	1.5	7.3	6.1	0.000
Cholesterol total (mg/dL)	193.7	162.4	35.7	48.4	192.0	149.5	91.0	106.0	282.0	343.0	0.001
HDL (mg/dL)	43.8	42.1	9.8	9.5	43.0	40.0	27.0	24.0	65.0	60.0	0.185
LDL (mg/dL)	117.3	97.3	33.9	37.9	114.0	88.5	31.0	57.0	193.0	238.0	0.015
VLDL (mg/dL)	30.0	23.0	9.6	9.4	29.5	21.0	16.0	11.0	48.0	48.0	0.003
Triglicerídeos (mg/dL)	169.1	115.3	90.6	46.9	150.0	104.5	81.0	55.0	528.0	239.0	0.001

Legenda: HbA1c%, hemoglobina glicada; HOMA-IR, grau de resistência insulínica (IR) pelo modelo homeostático; HOMA-BETA, capacidade funcional das células beta pancreáticas pelo modelo homeostático; HDL, lipoproteínas de alta densidade; LDL, lipoproteínas de baixa densidade; VLDL, lipoproteína de densidade muito baixa.

Legenda: (a) evolução de frações lipídicas ao longo do acompanhamento. (b) evolução da glicemia de jejum. (c) evolução de insulina e peptídeo C, (d) evolução dos parâmetros de composição corporal. (e) evolução de HOMA-IR e HOMA-BETA.

Figura 9 - Evolução de parâmetros clínicos ao longo do acompanhamento pós-operatório

10.2 Resposta metabolômica global à DGYR

Aplicando a combinação de três plataformas analíticas, sendo CSH em dois modos de ionização (positivo e negativo), diferentes classes de metabólitos foram identificadas, compreendendo moléculas do metabolismo primário, compostos polares e lipídios complexos. Como pré-requisito para o estudo, foram apenas investigados metabólitos conhecidos, permitindo a interpretação dos dados a partir das comparações existentes na literatura.

Em razão da ampla afinidade e sensibilidade das plataformas analíticas utilizadas, observou-se a identificação simultânea de alguns metabólitos em mais de uma plataforma (Figura 10). Nestas condições, a sobreposição foi corrigida a partir do coeficiente de variação, conforme o QC, sendo mantido o de menor flutuação ao longo das análises. Os números de metabólitos total, metabólitos identificados e as alterações estatisticamente significantes estão apresentados de acordo com as plataformas analíticas na Tabela 3.

Legenda: CSH-MS no modo de ionização positivo e negativo, HILIC-MS e GC-MS, de acordo com o tipo de amostra. As estruturas elípticas indicam o número de metabólitos identificados que foram detectados em cada plataforma analítica, e áreas sobrepostas representam o número de metabólitos compartilhados entre as plataformas. (a) plasma, (b) urina, (c) ECA, (d) ECM, (e) duodeno, (f) jejuno e (g) íleo.

Figura 10 - Diagrama de Venn apresentando o resumo dos metabólitos identificados com abordagem multiplataformas

Tabela 3 - Resumo dos principais achados das análises metabolômicas, de acordo com a plataforma analítica e amostra biológica

<i>Features</i> [†]					Metabólitos identificados [‡]					Número de metabólitos significativamente alterados [§]				
Amostra	GC	HILIC	CSH+	CSH-	GC	HILIC	CSH+	CSH-	Total por amostra	GC	HILIC	CSH+	CSH-	Total por amostra
Plasma	351	1963	1475	620	116	93	227	130	566	62	22	63	42	189
Urina	591	2173	NR	NR	178	67	NR	NR	245	80	21	NR	NR	101
ECA										28	19	9	28	84
ECM										0	0	0	0	0
Duodeno	261	4016	695	956	120	191	166	126	603	8	6	22	24	71
Jejuno										16	18	54	31	119
Íleo										12	22	7	8	49

Legenda: TGI, trato gastrointestinal; ECA, estômago corpo alto; ECM: estômago corpo médio; GC, cromatografia gasosa; HILIC, coluna de interação hidrofílica; CSH +/-, coluna de superfície híbrida carregada em modo positivo ou negativo; NR, não realizado; [†] Feature, entidade molecular com razão massa/carga (m/z) e tempo de retenção (RT) únicos; [‡] Metabólitos identificados, baseados em bibliotecas MS DIAL e BinBase; [§] Metabólitos significativamente alterados, p<0,05, após correção de sobreposições de metabólitos entre plataformas;

A análise multivariada não supervisionada revela clara discriminação entre as pacientes antes e após a cirurgia (Figura 11). A análise PCA identifica duas direções espaciais (PC1 e PC2), o primeiro componente principal é a direção onde as amostras apresentam a maior variação e a segunda representa a outra direção não correlacionada ao primeiro componente, ao longo da qual as amostras expõem a maior variação. Estas dimensões podem ser interpretadas como o resultado de todas as variáveis projetadas nos eixos x e y, e, quanto maior a projeção do vetor, mais importante será a contribuição das variáveis nessa dimensão. A variação é diretamente proporcional à separação dos grupos e, portanto, quanto maior a variação maior será a diferença entre os grupos. Isto demonstra fenótipos metabolicamente distintos nos pré e pós-operatórios da DGYR. Nas amostras de plasma, pode-se observar que a plataforma CSH-MS apresentou melhor separação entre os grupos em ambos os modos de ionização, positivo e negativo, com 59,1% e 51,1% de variância, respectivamente.

Legenda: *Score plots* baseados em (a) GC-MS, componente principal 1 e 2 (PC1/PC2) combinados representam 36,2% de variância dos conjuntos de dados; (b) HILIC-MS, 31,2%; (c) CSH-MS modo positivo, 59,1%; and (d) CSH-MS modo negativo, 51,1%. Amostras obtidas no pré-operatório (pre_, círculos vermelhos) e 3 meses após a cirurgia (post_, círculos verdes).

Figura 11 - Análise de componentes principais (PCA) do plasma

Na disposição dos dados, variações no PCA são esperadas. Elas representam diferenças biológicas entre as pacientes incluídas nesta pesquisa, características físico-químicas dos metabólitos detectados em cada plataforma analítica e, mais importante, a seleção exclusiva de metabólitos conhecidos.

Nas amostras de urina, a análise de PCA também demonstrou fenótipos metabólicos distintos, apoiando o conceito da transformação

metabolômica induzida pela DGYR (Figura 12). É importante mencionar que a concentração urinária de metabólitos é influenciada por diversos fatores, incluindo a presença de nefropatia diabética não diagnosticada ou subclínica, redução de massa muscular e capacidade limitada de exercício ou catabolismo. Estes fatores podem contribuir para quadros de glicosuria, condição identificada em sete amostras da presente pesquisa, exigindo etapas adicionais de diluição padronizadas em todas as amostras.

Legenda: *Score plots* baseados em (a) GC-MS, componente principal 1 e 2 (PC1/PC2) combinados representam 31% de variância dos conjuntos de dados; (b) HILIC-MS, 34,7%. Amostras obtidas no pré-operatório (pre_, círculos vermelhos) e 3 meses após a cirurgia (post_, círculos verdes).

Figura 12 - Análise de componentes principais (PCA) da urina

Nas amostras de tecido gastrointestinal, a análise de PCA mostrou diferenças superiores na plataforma CSH-MS, em ambos os modos de ionização, positivo e negativo. De modo geral, a variância foi maior no intestino, sendo o duodeno com 61,9%, o jejuno com 67% e o íleo com 62,9% no modo positivo (Figura 13).

Legenda: *Score plots* baseados nas séries (a) estômago corpo alto (ECA), componentes principais 1 e 2 (PC1/PC2) combinados apresentam 37,8%, 37,2%, 54,2%, e 45,9% da variância do conjunto de dados em (1) GC-MS, (2) HILIC-MS, CSH-MS no modo de ionização positivo (3) e negativo (4), respectivamente. No estômago corpo médio (b), PC1/PC2 representam 53,4%, 44,4%, 49,4%, e 54% da variância em (1), (2), (3), e (4) respectivamente. (c) duodeno, PC1/PC2 representam 38,7%, 42,3%, 61,9%, e 47,6% da variância em (1), (2), (3), e (4). (d) jejuno PC1/PC2 representam 36,6%, 35,1%, 67%, e 45,9% da variância em (1), (2), (3), e (4). (e) íleo PC1/PC2 representam 36%, 33,8%, 62,9%, e 49,7% da variância em (1), (2), (3), e (4). Amostras obtidas no pré-operatório (pre_ em círculos vermelhos) e 3 meses após a cirurgia (post_, círculos verdes).

Figura 13 - Análise de componentes principais (PCA) do tecido gastrintestinal

Na análise de PCA, interpretações geométricas dos dados são oferecidas, utilizando poucos componentes e tornando possível acessar, visualmente, as similaridades e diferenças entre as amostras e determinando quando elas se agrupam.

Já a análise multivariada supervisionada, PLS DA, foi aplicada para determinar se os dados continham informação suficiente para distinguir os grupos. Observou-se que todas as amostras apresentaram um agrupamento nítido de classes (ANEXOS D, E, F). Comparadas a outras amostras, duodeno, jejuno e íleo mostraram níveis superiores de transformação após a DGYR no modo de ionização positivo da plataforma CSH, com 59,1%, 64,8%, e 53,5%, respectivamente.

Conforme previamente demonstrado nos dados da Tabela 3, todos os tipos de amostras apresentaram mudanças significantes em metabólitos, exceto o ECM. Por este motivo, análises adicionais não foram realizadas com as amostras deste segmento gastrointestinal.

10.2.1 A análise de enriquecimento por similaridade química

A análise de enriquecimento por similaridade química identificou um total de 72 classes, sendo 14 compartilhadas entre todos os tipos de amostras. No plasma, 35 classes foram identificadas, sendo 26 alteradas com impacto estatístico; a urina 33 classes, sendo 24 alteradas; o ECA 47 classes, sendo 14 alteradas; o duodeno 46 classes, sendo sete alteradas; o jejuno 45 classes, sendo 12 alteradas; e o íleo 48 classes, sendo seis alteradas. A seguir, é apresentada a classificação dos metabólicos significativamente alterados ($p < 0,05$) de acordo com a diversidade química, visando a demonstrar o impacto de grupos de metabólitos nas transformações metabolômicas em cada tipo de amostra (Figura 14).

Legenda: (a) plasma, (b) urina, (c) ECA, (d) duodeno, (e) jejuno e (f) íleo. O eixo y mostra os clusters com maior impacto de acordo com o p valor, sendo os mais relevantes dispostos na região superior. As cores do gráfico representam a proporção de metabólitos alterados, sendo vermelho para aumentados, azul para diminuídos e violeta, lilás e rosa para clusters que possuem metabólitos aumentados e diminuídos, tendo a variação do tom de cores de acordo com a proporcionalidade das alterações. Apenas classes estatisticamente alteradas ($p < 0.05$) são apresentadas. Devido ausência de metabólitos alterados, o ECM não atendeu os requisitos desta classificação e por isso não é apresentado.

Figura 14 - Classificação de metabólitos significativamente alterados, de acordo com a diversidade química de amostras gastrintestinais

Diferentes padrões de alterações metabólicas foram observados entre as amostras biológicas estudadas. Conforme a composição natural das amostras e a função biológica das moléculas, as classes lipídicas apresentaram-se mais alteradas nas amostras de plasma e no tecido gastrointestinal, sendo as fosfatidilcolinas (PC) insaturadas diminuídas em maior proporção no plasma e aumentadas no ECA, duodeno e jejuno. No plasma, também foi observado o aumento de ácidos graxos saturados e insaturados, diminuição de triglicerídios (TG) e lisofosfatidilcolinas (LPC), bem como alterações em esfingomielinas (SM) e aumento de outras classes, incluindo aminoácidos e ácidos dicarboxílicos (ADC).

Na urina, a maioria das classes -se aumentada, incluindo dipeptídios, ácido tricarboxílico, índoles, hexoses, açúcares alcoólicos e aminoácidos. Nas amostras gastrintestinais, observam-se alterações similares nas amostras de ECA, duodeno e jejuno, incluindo a diminuição de TG insaturados, e esta mesma classe está mais aumentada no íleo. Diversas classes de aminoácidos apresentaram-se diminuídas no ECA, e os dissacarídeos e os peptídeos estiveram aumentados no íleo. De maneira mais objetiva, uma síntese da formação destes clusters é descrita em anexo (ANEXO G).

10.2.2 Mapeamento de network metabólico

Para gerar uma representação visual global das associações metabólicas de modo mais detalhado, um *network* bioquímico foi construído utilizando abordagem guiada pelos dados (*data-driven approach*). As diferenças previamente descritas foram ilustradas de modo mais compreensivo, demonstrando as assinaturas metabólicas de cada tipo de amostra. Como pré-requisito para a análise, foram apenas utilizadas correlações experimentalmente observadas e, para este fim, os *networks* foram construídos, incluindo apenas os metabólitos conhecidos.

No *network*, o tamanho dos metabólitos e suas cores representam a direção e a importância relativa da mudança, e a distância entre eles reflete

a similaridade estrutural dos espectros de massa, obtidos por meio de uma matriz de correlação. O formato das estruturas representa as classes químicas ou subdomínios bioquímicos. Correlações entre metabólitos de diferentes agrupamentos são observadas, e a relação entre metabólitos que compartilham reações (relação bioquímica) não foi necessariamente direta. A seguir, apresentamos os networks comparativos das amostras do plasma (Figura 15), urina (Figura 16), ECA (Figura 17), duodeno (Figura 18), jejuno (Figura 19) e íleo (Figura 20).

Neste modelo de apresentação dos dados, estruturas geométricas representam metabólitos, conectados de acordo com a relação bioquímica precursor/produto (linhas vermelhas), ou similaridade estrutural (Tanimoto. 0.07, linhas azul-celeste). O tamanho das estruturas representa a importância das alterações, de acordo com o *fold change* e a cor representa a mudança relativa (vermelho: aumentado; lilás: diminuído e cinza: sem alterações). A distância entre os metabólitos reflete a similaridade do espectro de massas. Domínios bioquímicos são caracterizados pelo formato das estruturas geométricas, descritas ao lado da legenda. A presença de significância estatística ($p < 0,05$) é representada pela borda azul. Códigos de identificação do PubChem e KEGG ID foram utilizados por metabólito listado, visando a mimetizar correlações bioquímicas experimentalmente conhecidas. A reprodução do *network* resulta da integração dos dados das plataformas UPLC-MS (CSH e HILIC), e GC-MS.

Legenda: linhas que conectam estruturas na cor vermelha representam relação bioquímica; linhas em azul representam relação de similaridade estrutural; (Δ) aminoácidos; (□) carboidratos; (○) lipídios; (▽) outros; a presença de borda azul indica significância estatística; preenchimento das estruturas geométricas indica o sentido da alteração, rosa, aumentado; lilás diminuído; cinza inalterado; O tamanho das estruturas representa a importância das alterações de acordo com o *fold change*; TG, triglicerídio; SM, esfingomielina; PC, fosfatidilcolina; PE, fosfatidiletanolamina.

Figura 15 - Network de similaridade bioquímica e estrutural demonstra diferenças metabólicas no plasma

Figura 16 - Network de similaridade bioquímica e estrutural demonstra diferenças metabólicas na urina

Legenda: linhas que conectam estruturas na cor vermelha representam relação bioquímica; linhas em azul representam relação de similaridade estrutural; (Δ) aminoácidos; (□) carboidratos; (○) lipídios; (▽) outros; a presença de borda azul indica significância estatística; preenchimento das estruturas geométricas indica o sentido da alteração, rosa, aumentado; lilás diminuído; cinza inalterado; O tamanho das estruturas representa a importância das alterações de acordo com o *fold change*; TG, triglicerídio; SM, esfingomielina; PC, fosfatidilcolina; PE, fosfatidiletanolamina.

Figura 18 - Network de similaridade bioquímica e estrutural demonstra diferenças metabólicas no duodeno

Legenda: linhas que conectam estruturas na cor vermelha representam relação bioquímica; linhas em azul representam relação de similaridade estrutural; (Δ) aminoácidos; (□) carboidratos; (○) lipídios; (▽) outros; a presença de borda azul indica significância estatística; preenchimento das estruturas geométricas indica o sentido da alteração, rosa, aumentado; lilás diminuído; cinza inalterado; O tamanho das estruturas representa a importância das alterações de acordo com o *fold change*; TG, triglicerídio; SM, esfingomielina; PC, fosfatidilcolina; PE, fosfatidiletanolamina.

Figura 20 - Network de similaridade bioquímica e estrutural demonstra diferenças metabólicas no íleo

As correlações baseadas por análises de *network* oferecem uma ferramenta complementar à estatística multivariada, sendo tipicamente aplicadas em dados de metabolômica para identificar diferenças entre grupos de metabólitos. A extração de elementos importantes de grandes conjuntos de dados é decisiva para gerar conhecimento útil com poder exploratório, especialmente porque metabólitos refletem atividades celulares em nível funcional.

10.2.3 Enriquecimento de vias metabólicas

Tendo em vista a abordagem clássica para estudos de metabolômica, que considera a avaliação de mudanças de metabólitos em relação à atividade de vias metabólicas, foi realizada uma análise de enriquecimento de vias com todas as amostras estudadas. Esta análise sugere possíveis vias metabólicas alteradas pela DGYR. Foram identificadas 48 vias enriquecidas em todas as amostras, indicando alterações mais importantes no metabolismo de aminoácidos e, em menor escala, lipídios e vitaminas (Tabela 4).

Tabela 4 - Resumo de vias metabólicas enriquecidas em todas as amostras em estudo

Vias metabólicas enriquecidas	Número de metabólitos por via	Plasma	Urina	Tipo de amostra				
				ECA	ECM	Duodeno	Jejuno	Íleo
				Número de hits				
Metabolismo da alanina	6	4	4	2	2	2	2	2
Reciclagem de amônia	18	8	9	8	8	8	8	8
Metabolismo da arginina e prolina	26	8	8	9	9	9	9	9
Metabolismo do aspartato	12	5	5	5	5	5	5	5
Beta oxidação de AG de cadeia longa	14	2	2	3	3	3	3	3
Metabolismo da beta-alanina	13	2	2	4	4	4	4	4
Metabolismo da Betaína	10	3	2	4	4	4	4	4
Biossíntese de AB	49	2	2	2	2	2	2	2
Metabolismo da biotina	4	1	2	1	1	1	1	1
Biossíntese de catecolaminas	5	1	2	1	1	1	1	1
Ciclo do ácido tricarboxílico	23	5	6	4	4	4	4	4
Metabolismo da cisteína	8	3	3	2	2	2	2	2
Alongamento de AG na mitocôndria	26	1	1	1	1	1	1	1
Metabolismo de AG	29	2	1	2	2	2	2	2
Degradação de frutose e manose	18	2	2	2	2	2	2	2
Metabolismo da galactose	25	4	3	5	5	5	5	5
Gliconeogênese	27	3	4	3	3	3	3	3
Ciclo glicose-alanina	12	4	4	3	3	3	3	3
Metabolismo do glutamato	18	4	4	5	5	5	5	5
Metabolismo da glutatona	10	4	4	5	5	5	5	5
Metabolismo de glicerolípídios	13	3	1	6	6	6	6	6
Metabolismo de glicina, serina e treonina	26	8	9	10	10	10	10	10
Glicólise	21	2	3	3	3	3	3	3
Metabolismo da histidina	11	1	4	4	4	4	4	4
Sinalização da insulina	19	2	2	4	4	4	4	4
Metabolismo de corpos cetônicos	10	1	1	1	1	1	1	1
Degradação da lisina	13	1	1	1	1	1	1	1
Transporte de malato-aspartato	8	3	2	2	2	2	2	2
Metabolismo da metionina	24	7	9	9	9	9	9	9
Cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria	15	2	2	2	2	2	2	2
Metabolismo do nicotinato e nicotinamida	13	1	1	1	1	1	1	1
Biossíntese de pantotenato e CoA	10	1	1	2	2	2	2	2
Via pentose fosfato	18	1	3	3	3	3	3	3
Metabolismo da fenilalanina e tirosina	13	2	3	4	4	4	4	4
Biossíntese de fosfolípídios	19	4	2	4	4	4	4	4
Metabolismo da porfirina	22	1	1	2	2	2	2	2
Metabolismo do propanoato	18	2	3	2	2	2	2	2
Biossíntese de proteínas	19	15	15	17	17	17	17	17
Metabolismo de purinas	45	3	7	14	13	14	14	14
Metabolismo da pirimidina	36	2	5	7	7	7	7	7
Metabolismo de selenoaminoácidos	15	1	1	1	1	1	1	1
Metabolismo de esfingolípídios	15	2	2	2	2	2	2	2
Metabolismo de amido e sucrose	14	2	3	3	3	3	3	3
Metabolismo de taurina e hipotaurina	7	2	2	3	3	3	3	3
Metabolismo do triptofano	34	4	4	3	3	3	3	3
Metabolismo da tirosina	38	2	6	2	2	2	2	2
Ciclo da uréia	20	10	9	9	9	9	9	9
Degradação de valina, leucina e isoleucina	36	5	3	3	3	3	3	3

Legenda: Vias metabólicas enriquecidas, indicadas pela análise de representação; Número de metabólitos por via, indica o número de metabólitos conhecidos que atuam naquela via; Número de *hits*, número de metabólitos da via de referência que foram identificados no tipo de amostra determinado.

Adicionalmente, realizou-se uma análise das transformações, considerando a participação dos metabólitos alterados em vias metabólicas conhecidas. Esta análise foi feita nas bases de dados oficiais, a partir do *software* online ChemRICH (Figura 21). Nesta avaliação, pôde-se observar que as vias metabólicas de um amplo percentual dos metabólitos alterados são desconhecidas, ou seja, apesar do conhecimento da identidade de moléculas que se alteram em função da DGYR, não se conhece seu comportamento exato em um sistema biológico.

Reconhecendo estas limitações, esta interpretação será composta por uma combinação de testes, fornecendo subsídios à construção de um raciocínio lógico, dentro do contexto investigado.

Legenda: (a) plasma, (b) urina, (c) ECA, (d) duodeno, (e) jejuno e (f) ileo. Estruturas sólidas indicam relação com via metabólica conhecida, enquanto estruturas vazias indicam desconhecimento da participação do metabólito em vias já descritas. As cores representam o sentido das alterações, em vermelho metabólitos aumentados; em azul diminuídos; em amarelo não significantes.

Figura 21 - Alterações metabólicas dispostas pela similaridade química

10.2.4 Variáveis de importância na projeção – VIP

A seguir, são descritas as variáveis VIP, onde foram identificados os metabólitos que contribuem significativamente à discriminação entre os grupos, apresentados de acordo com a matriz estudada. Com base nos resultados obtidos a partir das análises de VIP, foram identificadas que, após a DGYR, as alterações mais relevantes do plasma incluem aumento de *3-hydroxybutyric acid*, ou ácido hidroxibutírico; aumento de *12(13)-Epoxy-9Z-octadecenoic acid* ou ácido vernólico; aumento de urobilina; variações relativas dos níveis de aminoácidos e diminuição de diversas classes de lipídios (Figura 22).

Legenda: (a) GC-MS, cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas; (b) HILIC-MS, cromatografia líquida em coluna de interação hidrofílica acoplada a espectrometria de massas; (c) CSH, cromatografia líquida em coluna de fase reversa acoplada a espectrometria de massas no modo de ionização positivo; (d) CSH, cromatografia líquida em coluna de fase reversa acoplada a espectrometria de massas no modo de ionização negativo. Metabólitos com alterações significativas e sua importância relativa estão expressos em valores numéricos no eixo X. Estruturas localizadas na margem direita indicam a concentração relativa dos metabólitos correspondentes de amostras no pré (0) e no pós-operatório (1).

Figura 22 - Variáveis de importância na projeção (VIP) do plasma

Na urina, a diminuição de glicose apresentou impacto superior em relação ao plasma. Além disso, foi observado aumento de moléculas-chave, como o ácido succínico; acilcarnitinas e *p-tolyl glucuronide* ou *p-tolil-glucuronido* (Figura 23).

Legenda: (a) GC-MS, cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas; (b) HILIC-MS, cromatografia líquida em coluna de interação hidrofílica acoplada a espectrometria de massas. Metabólitos com alterações significativas e sua importância relativa estão expressos em valores numéricos no eixo X. Estruturas localizadas na margem direita indicam a concentração relativa dos metabólitos correspondentes de amostras no pré (0) e no pós-operatório (1).

Figura 23 - Variáveis de importância na projeção (VIP) da urina

Em relação ao trato gastrointestinal, são apresentadas as análises de VIP referentes a todos os segmentos, com exceção do ECM (Figura 24). Em razão da ausência de alterações nesta região, as análises adicionais não foram realizadas para este segmento. Diferentes moléculas contribuíram na discriminação entre períodos, refletindo o impacto da cirurgia. Todos os tecidos apresentaram variações entre aminoácidos, lipídios e outras moléculas derivadas de vitaminas, sendo a redução de TG uma característica marcante.

No ECA, os aminoácidos de cadeia ramificada (leucina, isoleucina e valina), PC e TG apresentam maior destaque. No duodeno, acilcarnitinas estavam diminuídas, e as modificações das classes PC, fosfatidiletanolaminas (PE) e SM mostraram-se importantes no pós-operatório. O jejuno e o duodeno apresentaram redução importante de glicose e *1,5-anhydroglucitol* ou 1,5 anidroglicitol. O jejuno e o íleo apresentaram alterações similares, e a classe de ceramidas esteve alterada no jejuno.

Legenda: **(a)** ECA, **(b)** Duodeno, **(c)** Jejuno e **(d)** Íleo. As amostras estão dispostas em padrão horizontal, de acordo com a plataforma analítica, sendo **(1)** GC-MS, cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas; **(2)** HILIC-MS, cromatografia líquida em coluna de interação hidrofílica acoplada a espectrometria de massas; **(3)** CSH, cromatografia líquida em coluna de fase reversa acoplada a espectrometria de massas no modo de ionização positivo; **(4)** CSH, cromatografia líquida em coluna de fase reversa acoplada a espectrometria de massas no modo de ionização negativo. Metabólitos com alterações significantes e sua importância relativa estão expressos em valores numéricos no eixo X. Estruturas localizadas na margem direita indicam a concentração relativa dos metabólitos correspondentes de amostras no pré (0) e no pós-operatório (1).

Figura 24 - Variáveis de importância na projeção (VIP) do tecido gastrointestinal

10.2.5 Regulação metabólica pela perspectiva do *fold change*

As alterações encontradas fornecem diversas pistas de transformações metabólicas induzidas pela DGYR. A seguir, são ressaltadas as alterações mais relevantes, considerando o *fold change* (>2.6), ponto de corte considerado mais relevante frente à ampla variação encontrada nas demais classes de metabólitos. A tabela completa com os metabólitos alterados e seus respectivos p valores e *fold change* estão detalhados no material suplementar (ANEXO H-M).

As repercussões biológicas diretas ou indiretas serão apresentadas brevemente e, posteriormente, detalhadas na discussão. Algumas destas alterações coincidem com os resultados apresentados na análise VIP, entretanto, aqui estão sendo enfatizadas apenas aquelas com significância estatística.

- No plasma: observa-se o aumento de cinco ácidos dicarboxílicos e, ácido hidroxibutírico, urobilina, SM e diminuição de TG e PC; sugerindo estímulo à cetose, desordem hematológica (hemólise), redução da resistência insulínica e remodelação do metabolismo de lipídios, respectivamente;
- Na urina: observa-se uma diminuição muito importante de glicose, associada ao aumento de p-tolil-glucuronido, ácido aminovalérico, homocisteína, ácido metilglutâmico e ácido aloxanóico. Estas alterações indicam mudanças na atividade da microbiota, desordens no metabolismo de aminoácidos e nos níveis de subprodutos do metabolismo de purinas e pirimidinas;
- No trato gastrointestinal: o ECM não apresentou alterações metabolômicas significantes. Todas as demais regiões mostraram mudanças e compartilham similaridades de classes alteradas, contudo, em diferentes proporções:
 - ECA: observa-se redução dos aminoácidos leucina, triptofano, tirosina, valina, histidina, fenilalanina, arginina; o dipeptídeo

prolilglutamina (Pro-Gln) e do tripeptídeo tirosil-aspartyl-arginine (Tyr-Asp-Arg);

- Duodeno: diminuição de diversos TG saturados e insaturados de cadeia longa (de 44-54 carbonos) e ácido linolênico; e aumento de ácido ascórbico;
- Jejuno: redução de TG saturados e insaturados (de 44-58 carbonos) representaram 90% das alterações para este ponto de corte. Também houve diminuição da ceramida (d39:1), galactosilglicerol, ribose e adenosina difosfato ribose e do ácido sucínico; e
- Íleo: diminuição de TG, carnosina, dipeptídeos, ácido hexurônico (ácido ascórbico) e galactinol; e aumento de ácido aminovalérico.

As alterações metabolômicas observadas no trato gastrointestinal tomadas em conjunto correspondem a mudanças induzidas pela DGYR no processo digestivo e absorptivo, refletindo as bases da adaptação metabólica. Com exceção do ECM, alterações de diversas classes de lipídios foram observadas, modificando a composição da mucosa de todos os demais segmentos estudados. Isto sugere que a utilização das reservas endógenas pode também gerar alterações em processos de sinalização intermediados por estas moléculas. O jejuno apresentou alterações mais representativas e, por analogia, isso pode ocorrer em função da adaptação da mucosa em razão da exposição a um fluxo de nutrientes e outras substâncias digestivas, antes inexistentes. Além disso, encontra-se evidências de alterações no metabolismo de carboidratos neste mesmo segmento e de aminoácidos nas regiões do ECA e do íleo. Adicionalmente, a presença de determinados metabólitos sugere mudanças na atividade da microbiota.

Em termos de proporção, identifica-se que o grau das alterações metabolômicas foi mais expressivo em nível tecidual. O ECA e o jejuno apresentaram 41% e 51% dos metabólitos para esse ponto de corte do *fold change*, respectivamente. Estes contrastes metabolômicos entre os

compartimentos estudados revelam que o plasma foi o compartimento com maior número de metabólitos alterados, seguido do jejuno, urina, ECA, duodeno e íleo (Figura 25). Pode-se observar também o compartilhamento de metabólitos entre as amostras, sendo maior entre o plasma e o trato gastrointestinal e entre as amostras do duodeno e jejuno.

Legenda: Ao centro, o trato gastrointestinal após a DGYR apresenta as 4 regiões com perfis metabólicos alterados: ECA, duodeno, jejuno e íleo. Os fluidos corporais estão representados em círculos, sendo o plasma em vermelho e a urina em amarelo ($p < 0,05$). Os gráficos em pizza demonstram a direção das alterações, sendo vermelho para aumento e azul para diminuição. As linhas que ligam cada estrutura e o número a eles associado apontam o número de compostos igualmente modificados entre um ou mais compartimentos.

Figura 25 - Representação dos contrastes das transformações induzidas pela cirurgia entre os compartimentos estudados

Em outra perspectiva, as transformações em nível gástrico e intestinal são apresentadas de acordo com o sentido das mudanças: metabólitos aumentados no Gráfico 1 e diminuídos no Gráfico 2.

Gráfico 1 - Níveis de alteração de metabólitos aumentados no trato gastrointestinal

Legenda: PC, fosfatidilcolina; SM, esfingomielinas; Classes químicas são representadas por cores, sendo apresentados apenas metabólitos significativamente alterados

Gráfico 2 - Níveis de alteração de metabólitos diminuídos no trato gastrointestinal

Legenda: TG, triglicerídios; Cer, ceramidas; PC, fosfatidilcolina; SM, esfingomielinas; Classes químicas são representadas por cores, sendo apresentados apenas metabólitos significativamente alterados

Dentre os metabólitos aumentados, as PC apresentaram-se alteradas de modo mais expressivo no ECA e no duodeno. As SM estiveram mais alteradas no ECA, duodeno e jejuno, e aminoácidos no duodeno e jejuno. Dentre os metabólitos diminuídos, as classes lipídicas representaram as flutuações mais relevantes. Os TG apresentaram-se diminuídos, sendo mais expressivamente alterados na região do jejuno. Algumas SM também se apresentaram reduzidas em conjunto com outras classes lipídicas, como as ceramidas e os ácidos graxos (ácido araquídico). Os aminoácidos estiveram diminuídos no jejuno.

10.2.6 Análise de AB

Dentre os AB dosados no plasma, 15 atenderam aos critérios de qualidade para análise, conforme descrito nos métodos. Na disposição dos dados para avaliação do efeito da DGYR, apenas o ácido litocólico apresentou alteração significativa após a cirurgia ($p < 0.01$), com diminuição de sua concentração plasmática em 2,6 vezes (Tabela 5).

Tabela 5 - Alterações de AB plasmáticos após DGYR

<i>Ácido biliar</i>	<i>p valor</i>	<i>fold change</i>	<i>Sentido da alteração</i>
Ácido cólico	0.13728	4.6	↑
Ácido deoxicólico	0.73347	1.17	↑
Ácido glicodesoxicólico	0.43191	1.3	↑
Ácido glicoiodeoxicólico	0.045447	1	-
Ácido glicólico	0.56207	1.5	↓
Ácido glicolitocólico	0.79365	1.7	↓
Ácido glicoquenodesoxicólico	0.10321	1	-
Ácido glicoursodeoxicólico	0.48978	5.3	↓
Ácido litocólico	0.00072	2.6	↓
Ácido quenodesoxicólico	0.6333	3.6	↑
Ácido taurocólico	0.94338	1.2	↓
Ácido taurodeoxycólico	0.45237	1.5	↑
Ácido taurolitocólico	0.50488	3.5	↓
Ácido tauroquenodeoxycólico	0.11934	1.4	↑
Ácido ursodeoxycólico	0.75929	1	-

Legenda: aumentado (↑), diminuído (↓) e inalterado (-).

O ácido litocólico é um ácido biliar secundário, produzido por bactérias a partir do ácido quenodesoxicólico no intestino delgado distal e no cólon. A alteração deste ácido biliar pode advir de alterações na microbiota, seja na mudança de sua composição ou atividade¹⁰².

10.3 Resposta metabólica na melhora do diabetes mellitus tipo 2

10.3.1 Evolução de variáveis clínicas de acordo com a melhora do DM2

Após a divisão das pacientes, de acordo com a melhora do DM2, 13 pacientes foram classificadas como respondedoras e 10 como não respondedoras. Destaca-se que, em razão das dificuldades na coleta de amostras por limitações clínicas das pacientes, as análises de plasma referem-se a 13 respondedoras e a oito não respondedoras.

A evolução dos parâmetros clínicos mostrou-se similar entre os grupos, mantendo o padrão observado na comparação dos períodos isolados (pré e pós-operatórios). Isto demonstra que, no pós-operatório de 3 meses, o efeito metabólico positivo da DGYR foi similar em ambos os grupos, não havendo diferenças clinicamente aparentes (Tabela 6).

Tabela 6 - Evolução de parâmetros clínicos do pré e pós-operatório de 3 meses, classificadas de acordo com a melhora do DM2

Variáveis	Média pré		Média pós		DP pré		DP pós		p valor	
	R	NR	R	NR	R	NR	R	NR	R	NR
% Gordura corporal	51.84	52.01	43.73	43.60	5.32	5.90	6.02	6.82	0.000	0.000
% Massa magra	48.16	47.99	56.27	56.40	5.32	5.90	6.02	6.82	0.000	0.000
Gordura corporal (kg)	57.39	59.59	39.07	40.79	13.39	12.93	9.77	10.37	0.000	0.000
Massa magra (kg)	52.45	54.01	49.22	51.73	7.77	5.00	6.11	5.34	0.029	0.164
Peso (kg)	109.84	113.59	88.29	92.52	18.12	13.58	13.32	12.14	0.000	0.000
Glicose (mg/dL)	204.15	250.11	95.33	113.75	60.26	68.60	11.83	21.79	0.000	0.001
Insulina (μ U/mL)	23.76	22.48	8.99	15.57	10.92	23.15	3.67	16.17	0.002	0.047
%HbA1c	8.92	9.46	5.97	6.04	1.67	1.49	0.40	0.54	0.000	0.000
HOMA-IR	11.61	13.67	2.12	4.15	6.89	13.92	0.94	4.34	0.001	0.016
HOMA-BETA	42.92	30.75	30.85	48.81	21.42	35.27	14.02	53.80	0.365	0.219
Peptídeo C (ng/mL)	4.33	4.09	2.81	3.36	1.30	1.66	0.41	1.43	0.003	0.018
Colesterol total (mg/dL)	200.15	198.78	173.00	157.38	34.39	30.49	65.48	36.45	0.034	0.014
HDL (mg/dL)	45.08	45.11	41.75	41.25	9.88	8.78	8.36	10.62	0.011	0.206
LDL (mg/dL)	114.54	130.22	105.83	95.25	32.68	32.92	50.35	29.12	0.308	0.035
VLDL (mg/dL)	32.75	25.75	25.42	20.88	10.31	6.88	12.63	4.64	0.061	0.036
Triglicerídeos (mg/dL)	191.00	154.11	127.50	104.63	112.51	84.10	62.84	24.37	0.052	0.039

Legenda: R, respondedores; NR, não respondedores; DP, desvio padrão.

10.3.2 Resposta metabólica à DGYR de acordo com a melhora do DM2

Do ponto de vista metabólico, foi possível identificar diferenças importantes entre os pacientes respondedores (remissão completa do DM2) e não respondedores (remissão parcial do DM2). Estes resultados indicam variações em conjuntos específicos de metabólitos que discriminam a resposta à DGYR de pacientes respondedores de pacientes não respondedores. Com base nos testes estatísticos não paramétricos, as transformações metabólicas foram mais profundas nos pacientes respondedores, concentrando um número superior de mudanças em relação ao grupo não respondedor (Tabela 7).

Tabela 7 - Descrição do número de alterações gerais e entre grupos de respondedores e não respondedores

Tipo de amostra	Geral		Respondedores* (p<0.05)		Não respondedores* (p<0.05)	
	Total	p<0.05	Total	Exclusivos	Total	Exclusivos
Plasma	335	184	175	84	100	9
Urina	218	93	78	35	58	15

*Metabólitos mensurados simultaneamente em mais de uma plataforma analítica tiveram as sobreposições corrigidas

A classificação destes pacientes de acordo com a melhora do DM2 revelou mudanças importantes nos fenótipos metabólicos, com delineamento mais claro no perfil das pacientes, além de exibir alterações mais relevantes. Para reconhecer a variação entre as amostras de cada grupo, a análise de PCA foi realizada, seguindo esta nova distribuição dos dados. Observa-se que a variação intragrupo de cada período é suficientemente menor do que a variação entre os períodos pré e pós-operatórios no plasma (Figuras 26 e 27) e na urina (Figuras 28 e 29). Ressalta-se que para estabelecer uma relação coerente que atendesse aos requisitos estatísticos aceitáveis para a

realização de comparações, a subdivisão dos grupos foi aplicada apenas nas amostras de plasma e urina, tendo em vista que o número de amostras do tecido gastrointestinal foi insuficiente para criar subgrupos numericamente equilibrados.

Legenda: *Score plots* baseados em (a) GC-MS, componente principal 1 e 2 (PC1/PC2) combinados representam 40,6% de variância dos conjuntos de dados; (b) HILIC-MS, 33,2%; (c) CSH-MS modo positivo 63,9% e (d) CSH-MS modo negativo 55,8%. Amostras obtidas no pré-operatório (pre_, círculos vermelhos) e 3 meses após a cirurgia (post_, círculos verdes).

Figura 26 - Análise de componentes principais (PCA) do plasma de pacientes respondedores

Legenda: *Score plots* baseados em (a) GC-MS, componente principal 1 e 2 (PC1/PC2) combinados representam 38,3% de variância dos conjuntos de dados; (b) HILIC-MS, 43,7%; (c) CSH-MS modo positivo 59,1% e (d) CSH-MS modo negativo 52,1%. Amostras obtidas no pré-operatório (pre_, círculos vermelhos) e 3 meses após a cirurgia (post_, círculos verdes).

Figura 27 - Análise de componentes principais (PCA) do plasma de pacientes não respondedores

Legenda: *Score plots* baseados em (a) GC-MS, componente principal 1 e 2 (PC1/PC2) combinados representam 35,8% de variância dos conjuntos de dados e (b) HILIC-MS, 41,5%. Amostras obtidas no pré-operatório (pre_, círculos vermelhos) e 3 meses após a cirurgia (post_, círculos verdes).

Figura 28 - Análise de componentes principais (PCA) da urina de pacientes respondedores

Legenda: *Score plots* baseados em (a) GC-MS, componente principal 1 e 2 (PC1/PC2) combinados representam 34,7% de variância dos conjuntos de dados e (b) HILIC-MS, 32,8%. Amostras obtidas no pré-operatório (pre_, círculos vermelhos) e 3 meses após a cirurgia (post_, círculos verdes).

Figura 29 - Análise de componentes principais (PCA) da urina de pacientes respondedores

Estes padrões de alterações resultam da combinação das características metabólicas individuais das pacientes e os efeitos da cirurgia. Na análise de PLS DA, também houve clara diferenciação de classes dos pré e pós-operatórios (ANEXO N-Q).

A seguir, são detalhados os aspectos metabolômicos referentes a estas mudanças, seguindo o mesmo padrão utilizado para descrever as alterações gerais entre os pré e o pós-operatórios de 3 meses.

10.3.4 A análise de enriquecimento por similaridade química de acordo com a melhora do DM2

O enriquecimento por similaridade química evidenciou as principais classes de metabólitos alteradas, revelando padrões distintos entre os respondedores e não respondedores no plasma (Figura 30) e na urina (Figura 31).

Legenda: (a) respondedores; (b) não respondedores. O eixo y mostra os clusters com maior impacto de acordo com o p valor, sendo os mais relevantes dispostos na região superior. As cores do gráfico representam a proporção de metabólitos alterados, sendo vermelho para aumentados, azul para diminuídos e violeta, lilás e rosa para clusters que possuem metabólitos aumentados e diminuídos, tendo a variação do tom de cores de acordo com a proporcionalidade das alterações. Apenas classes estatisticamente alteradas ($p < 0.05$) são apresentadas.

Figura 30 - Classificação de metabólitos significativamente alterados, de acordo com a diversidade química do plasma e com a melhora do DM2

Legenda: (a) respondedores; (b) não respondedores. O eixo y mostra os clusters com maior impacto de acordo com o p valor, sendo os mais relevantes dispostos na região superior. As cores do gráfico representam a proporção de metabólitos alterados, sendo vermelho para aumentados, azul para diminuídos e violeta, lilás e rosa para clusters que possuem metabólitos aumentados e diminuídos, tendo a variação do tom de cores de acordo com a proporcionalidade das alterações. Apenas classes estatisticamente alteradas ($p < 0.05$) são apresentadas.

Figura 31 - Classificação de metabólicos significativamente alterados, de acordo com a diversidade química da urina e com a melhora do DM2

Ao analisar estas alterações, os presentes resultados revelam as classes de metabólitos envolvidas nas transformações metabolômicas mais profundas nos pacientes respondedores. No plasma, as PC insaturadas, SM, PE, TG, ceramidas e açúcares alcoólicos apresentaram-se alteradas em proporções similares em ambos os grupos de respondedores e não respondedores. Os ácidos graxos saturados e insaturados, carnitinas, ADC e outras classes estiveram aumentados, e hexoses, PC insaturadas, LPC saturadas e insaturadas estiveram diminuídas apenas nos respondedores. Exclusivamente nos pacientes não respondedores, aminoácidos, glutamatos e açúcares ácidos apresentaram-se aumentados.

Na urina, grande parte das classes de metabólitos alteradas apresentaram-se aumentadas. Dipeptídeos, aminoácidos, glutamatos, fenóis, indoles, ácido tricarboxílico, carnitinas, hexoses e açúcares alcoólicos estiveram alterados em respondedores e não respondedores. Tratando-se, especialmente, dos respondedores, dissacarídeos estiveram diminuídos, e

fenilacetatos, ADC, imidazoles, purinonas, pentoses e hipuratos apresentaram-se aumentados. Os não respondedores apresentaram uma única classe exclusiva, representada pelos ácidos graxos saturados, que estavam reduzidos.

10.3.5 Enriquecimento de vias metabólicas de acordo com a melhora do DM2

Apesar das claras diferenças observadas com a subdivisão dos grupos, a análise de enriquecimento das vias não foi capaz de identificar vias, possivelmente, alteradas para esta nova disposição dos dados. Isto pode ter ocorrido em virtude de alguns fatores, dentre eles, limitações no algoritmo dos *softwares* disponíveis para simulação de vias alteradas. Nota-se que diversos metabólitos não foram reconhecidos por falha na identificação de seus códigos PubChem ID, gerados a partir de uma base de dados de moléculas químicas e suas atividades biológicas. Com isso, muitos metabólitos não puderam ser incorporados na simulação das vias enriquecidas, limitando assim a geração de resultados. Adicionalmente, esta nova disposição de dados selecionou um número menor de metabólitos alterados, reduzindo ainda mais as possibilidades de identificação de vias enriquecidas.

Além disso, é ainda mais importante destacar que atualmente a análise de enriquecimento das vias metabólicas ainda é muito limitada, dado o desconhecimento sobre as vias existentes, seus componentes e outros fatores que serão relatados com maiores detalhes na sessão de discussão da presente tese.

Dando sequência à avaliação dos resultados, a seguir, são apresentados os conjuntos de metabólitos de acordo com sua participação em vias metabólicas conhecidas no plasma (Figura 32) e na urina (Figura 33). Nesta disposição de dados, também pode-se reconhecer no plasma quais pacientes respondedores apresentam alterações mais expressivas que pacientes não respondedores. Na mesma proporção, muitos destes

metabólitos alterados embora identificados, ainda não foram reconhecidos como pertencentes às vias metabólicas já descritas. Na urina, o número de alterações parece proporcional, contudo, há um predomínio de metabólitos aumentados nos respondedores.

Legenda: (a) respondedores; (b) não respondedores. Em vermelho encontram-se os metabólitos aumentados, em azul os diminuídos e em amarelo os não significantes. Estruturas sólidas indicam relação com via metabólica conhecida, enquanto estruturas vazias indicam desconhecimento da participação do metabólito em vias já descritas.

Figura 32 - Alterações metabólicas dispostas pela similaridade química no plasma, de acordo com a melhora do DM2

Legenda: (a) respondedores; (b) não respondedores. Em vermelho encontram-se os metabólitos aumentados, em azul os diminuídos e em amarelo os não significantes. Estruturas sólidas indicam relação com via metabólica conhecida, enquanto estruturas vazias indicam desconhecimento da participação do metabólito em vias já descritas.

Figura 33 - Alterações metabólicas dispostas pela similaridade química na urina, de acordo com a melhora do DM2

10.3.6 Variáveis de importância na projeção – VIP

Considerando a nova disposição dos dados, os metabólitos selecionados pela análise VIP assumem poder discriminatório de maior relevância, dado o potencial diagnóstico introduzido com a subdivisão dos grupos. Esta análise pode ser utilizada para estimar a atividade de determinadas vias, identificando alterações que demonstrem o impacto da DGYR sobre respondedores e não respondedores.

Os dados do presente estudo demonstram o compartilhamento de alterações entre os dois subgrupos, havendo também alterações exclusivas em cada um deles no plasma (Figuras 34 e 35) e na urina (Figuras 36 e 37).

Legenda: (a) GC-MS, cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas; (b) HILIC-MS, cromatografia líquida em coluna de interação hidrofílica acoplada a espectrometria de massas; (c) CSH, cromatografia líquida em coluna de fase reversa acoplada a espectrometria de massas no modo de ionização positivo; (d) CSH, cromatografia líquida em coluna de fase reversa acoplada a espectrometria de massas no modo de ionização negativo. Metabólitos com alterações significativas e sua importância relativa estão expressos em valores numéricos no eixo X. Estruturas localizadas na margem direita indicam a concentração relativa dos metabólitos correspondentes de amostras no pré (0) e no pós-operatório (1).

Figura 34 - Variáveis de importância na projeção (VIP) do plasma de respondedores

Legenda: (a) GC-MS, cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas; (b) HILIC-MS, cromatografia líquida em coluna de interação hidrofílica acoplada a espectrometria de massas; (c) CSH, cromatografia líquida em coluna de fase reversa acoplada a espectrometria de massas no modo de ionização positivo; (d) CSH, cromatografia líquida em coluna de fase reversa acoplada a espectrometria de massas no modo de ionização negativo. Metabólitos com alterações significativas e sua importância relativa estão expressos em valores numéricos no eixo X. Estruturas localizadas na margem direita indicam a concentração relativa dos metabólitos correspondentes de amostras no pré (0) e no pós-operatório (1).

Figura 35 - Variáveis de importância na projeção (VIP) do plasma de não respondedores

No plasma, aminomalonato, serina, glicina, hidroxibutirato, citosina, isoleucina, teofilina, fenol, fosfato, ácido araquidônico, treofilina, SM, TG e ceramidas representam alguns dos metabólitos alterados em ambos, respondedores e não respondedores. Dentre as alterações exclusivas, pacientes respondedores apresentam o ácido treônico, ácido aloxanóico, triptofano e ácido pipecólico; e pacientes não respondedores apresentam glicose, piperidona e urobilina modificados.

Legenda: (a) GC-MS, cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas; (b) HILIC-MS, cromatografia líquida em coluna de interação hidrofílica acoplada a espectrometria de massas. Metabólitos com alterações significativas e sua importância relativa estão expressos em valores numéricos no eixo X. Estruturas localizadas na margem direita indicam a concentração relativa dos metabólitos correspondentes de amostras no pré (0) e no pós-operatório (1).

Figura 36 - Variáveis de importância na projeção (VIP) da urina de respondedores

Legenda: (a) GC-MS, cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas; (b) HILIC-MS, cromatografia líquida em coluna de interação hidrofílica acoplada a espectrometria de massas. Metabólitos com alterações significativas e sua importância relativa estão expressos em valores numéricos no eixo X. Estruturas localizadas na margem direita indicam a concentração relativa dos metabólitos correspondentes de amostras no pré (0) e no pós-operatório (1).

Figura 37 - Variáveis de importância na projeção (VIP) da urina de não respondedores

Na urina, glicose, hidroxiprolina, indoxil-sulfato, frutose, ácido sucínico, ácido glutâmico, biotina, acilcarnitinas, p-tolil glucuronida, ácido aminovalérico e glutamina compõem o conjunto de metabólitos alterados em ambos os grupos. Nos respondedores, o ácido hipúrico, trimetilamina, glutamina e n-metil glutamina compõem alterações exclusivas. Os não respondedores apresentaram apenas o fenol como composto exclusivo de maior relevância dentro do contexto de estudo.

10.3.7 Alterações metabolômicas de pacientes respondedores

10.3.7.1 Plasma

Um total de 84 metabólitos apresentaram-se alterados exclusivamente no plasma de pacientes respondedores. Destes, 42 estavam diminuídos e 42 aumentados. Este conjunto de metabólitos é composto por diversas classes, incluindo lipídios como AG, TG, LPC, PC, PE, SM, acilcarnitinas, bem como aminoácidos e outros compostos como corpos cetônicos. Em razão do amplo conjunto de dados obtidos a partir das análises metabolômicas, serão destacadas as moléculas cuja atividade biológica apresente relação com a manifestação do DM2.

Dentre as classes aumentadas, destacam-se os ADC (ácido oxálico e ácido sucínico), hipoxantina, ácido hidroxibutírico, ácido aloxânico, ácido parabânico, ácido oxâmico, ácido nicotínico e as acilcarnitinas (C2:0 e C8:0). Os metabólitos diminuídos incluíram cistina, triptofano, as acilcarnitinas (C3:0 e C4:0), ácido antranílico, cisteína e ácido indol-3-láctico.

Em relação aos AB, pacientes respondedores apresentaram aumento dos AB primários, sendo eles o ácido glicoquenodesoxicólico e o ácido tauroquenodesoxicólico (ANEXO R).

10.3.7.2 Urina

A urina de pacientes respondedores apresentou um total de 35 metabólitos alterados, exclusivamente, neste grupo. Destes, 30 estavam aumentados e cinco diminuídos. Considerando os valores de *fold change*, os metabólitos com alterações mais expressivas estavam aumentados e incluem transcrotobetaína, ácido 4-hidroxifenilacético, ácido 3-aminoisobutírico, ácido aloxânico, N-óxido de trimetilamina (TMAO), N-acetil-L-histidina e indole-3-acetato.

10.3.8 Alterações metabolômicas de pacientes não respondedores

10.3.8.1 Plasma

Um total de nove metabólitos foi exclusivamente alterado no plasma de pacientes não respondedores, sendo todos eles aumentados. Os mais relevantes incluem a piperidona, urobilina, ácido úrico e ácido 4-acetamidobutírico. Em relação aos AB, houve alterações em dois metabólitos secundários, incluindo a diminuição do ácido litocólico e aumento do ácido glicodeoxicólico (ANEXO R).

10.3.8.2 Urina

A urina de pacientes não respondedores apresentou 15 metabólitos alterados, sendo oito aumentados e sete diminuídos. De acordo com os valores de *fold change*, grande parte destas alterações não foi expressiva e também não foram identificadas relações diretas entre os metabólitos alterados que não apresentam uma associação direta ao quadro de DM2.

11 Discussão

11 DISCUSSÃO

11.1 Contribuição científica

A patogênese da obesidade e do DM2 envolve desequilíbrios na regulação metabólica, com alteração de funções celulares e mecanismos de sinalização metabólica. Nesse contexto, metabólitos são as moléculas que melhor caracterizam a relação entre o metabolismo e a bioquímica do desenvolvimento de doenças e, portanto, representam importantes alvos de investigação. Especialmente para o estudo dos efeitos da DGYR, a análise das flutuações de níveis de metabólitos, em diferentes compartimentos, auxilia a identificação de processos bioquímicos que podem implicar na melhora metabólica e do DM2. Diversos estudos tentam explicar as bases moleculares dos efeitos da DGYR, contudo, limitam-se a investigar amostras de plasma, contam com populações heterogêneas e dispõem de recursos analíticos limitados. Assim, pesquisas realizadas em seres humanos ainda não explicam completamente os mecanismos metabólicos de ação da DGYR.

A presente pesquisa apresenta contribuição científica original, na qual são descritas as respostas metabolômicas sistêmicas e gastrointestinal da DGYR em uma coorte de mulheres obesas e diabéticas metabolicamente similares. Identifica-se a assinatura metabolômica de pacientes que obtiveram melhora do DM2 e encontram-se evidências que parecem explicar o motivo pelo qual algumas pacientes não apresentaram melhora após a DGYR. Estes achados contribuem para delinear um caminho metabólico formado por um conjunto de alterações que atuam em pontos chave do metabolismo e propõem uma visão inédita do algoritmo terapêutico pelo qual a DGYR opera.

11.2 Modelo de análises metabolômicas

As transformações metabolômicas de compartimentos diretamente influenciados pela DGYR (nível sistêmico e gastrointestinal) são avaliadas, para melhor compreender as bases moleculares das transformações metabólicas envolvidas na melhora clínica e metabólica do pós-operatório de 3 meses. Plasma, urina e trato gastrointestinal apresentam diferentes fluxos de metabólitos, que variam de acordo com as condições fisiológicas, fisiopatológicas e adaptativas. Relações metabólicas funcionais intra e extracompartimentais são orientadas por sinais de todos os níveis de regulação, incluindo genes, proteínas, atividade enzimática, níveis de metabólitos, modificações pós-translacionais e exposição a fatores ambientais. Nesse sentido, a condição biológica é refletida com maior precisão a partir da resposta metabolômica.

11.3 Resultados

Pela perspectiva terapêutica clássica, a presente pesquisa revela que a DGYR promoveu impacto positivo em todas as pacientes, ao melhorar variáveis da composição corporal e exames bioquímicos avaliados, exceto HOMA-BETA e HDL. Após a divisão dos pacientes, de acordo com a melhora do DM2, este padrão manteve-se e aponta que não há diferenças clinicamente aparentes entre os grupos. Já do ponto de vista metabolômico, foram identificadas precocemente transformações significativas no perfil metabólico, sobretudo, em relação à remissão do DM2. Em nível sistêmico, estes resultados indicam que estas transformações foram significantes no plasma e na urina e, em nível gastrointestinal, houve mudanças significantes em todos os segmentos analisados, exceto na região do estômago excluído (ECM).

11.3.1 Análises metabolômicas

A presente investigação conta com sete tipos de amostras biológicas, analisadas pela combinação de três plataformas analíticas, o que resultou na produção de amplo conjunto de informações bioquímicas. Tendo em vista que os sistemas biológicos devem ser entendidos pela ação multinível, interconectada, não linear e dinâmica dos metabólitos, realizou-se a discussão crítica e interpretação dos dados de modo a estabelecer possíveis relações entre as amostras sistêmicas e gastrintestinais obtidas, considerando as características de pacientes em relação à remissão do DM2 (respondedores e não respondedores). Neste sentido, optou-se pela concentração nos seguintes resultados:

- Triglicerídios (TG), esfingomielinas (SM), fosfatidilcolinas (PC) e lisofosfatidilcolinas (LPC) estão alterados no trato gastrintestinal após DGYR;
- Existe alteração dos ácidos biliares (AB) plasmáticos após DGYR;
- Existe aumento da ω oxidação de ácidos graxos após DGYR nas pacientes respondedoras;
- TMAO, ácido succínico, ácido glicoquenodesoxicólico e ácido tauroquenodesoxicólico são discriminantes em pacientes respondedoras; e
- Piperidona, urobilina, transcrotobetaína, ácido litocólico e ácido úrico são discriminantes em pacientes não respondedoras.

Os resultados selecionados permitem propor alguns mecanismos hipotéticos, a serem comprovados, pelos quais poderia ocorrer ou não a melhora de DM2 após DGYR. Estas hipóteses são:

- A DGYR promove remodelação do perfil metabolômico de lipídios sistêmicos e gastrintestinais;
- A DGYR modifica a microbiota;

- Alterações nos níveis de AB plasmáticos após a DGYR podem ativar o receptor FXR e contribuir para melhora do DM2;
- Melhora do DM2 após DGRY pode se associar ao aumento da flexibilidade metabólica induzida pela ω oxidação;
- Pacientes que não apresentam remissão do DM2 após DGYR podem apresentar disfunção renal subclínica;
- A não remissão do DM2 após DGYR pode associar-se a alterações na função do citocromo P450; e
- A DGYR pode modificar o metabolismo de ácidos graxos pelo aumento da expressão de PPAR nas pacientes que apresentam melhora do DM2.

Estas hipóteses apontam para mecanismos integrados por diversos processos bioquímicos, que formam um circuito de alterações e que podem atuar em conjunto para promover as transformações induzidas pela cirurgia. A seguir, as alterações metabólicas serão discutidas, de acordo com as hipóteses geradas e com base nos processos metabólicos nos quais estão envolvidas.

11.3.1.1 A DGYR promove remodelação do perfil metabólico de lipídios sistêmicos e gastrintestinais

As alterações metabólicas plasmáticas, observadas após a DGYR, incluem diversas classes de metabólitos, partícipes de vias centrais do metabolismo, como aminoácidos, lipídios, carboidratos, nucleotídeos e outras classes. As alterações metabólicas observadas na presente pesquisa podem refletir as mudanças orgânicas de redução de obesidade, controle glicêmico ou da associação de ambos. Por isso, seus resultados são cotejados com as alterações metabólicas previamente descritas na literatura¹⁰³ (Figura 38).

Legenda: Metabólitos estão apresentados de acordo com o sentido da alteração, sendo vermelho aumentado, azul diminuído e amarelo quando há alterações em ambos os sentidos, aumentados e diminuídos. Metabólitos escritos em itálico indicam alteração discreta de fold change (<1,2). Apenas metabólitos significativamente alterados são apresentados ($p < 0,05$).

Figura 38 - Diagrama de Venn apresenta o resumo de alterações metabolômicas plasmáticas relacionadas à obesidade e DM2 do presente estudo. Modificado de Park S et al., 2015¹⁰³

Nesta investigação, muitos metabólitos alterados no plasma foram anteriormente associados ao quadro de obesidade e DM2 (Figura 38). Particularmente, o DM2 possui um maior número de alterações metabolômicas exclusivas. Ao analisar estas alterações plasmáticas, em conjunto com as da urina e tecido gastrointestinal, identificou-se que os lipídios ocuparam grande parte das mudanças metabólicas encontradas. No plasma, após DGYR modificaram-se classes de lipídios tradicionalmente relacionados ao DM2, como TG, SM, LPC e PC¹⁰⁴, cujos níveis, em geral, diminuíram. Fosfatidiletanolaminas (PE) e ceramidas (Cer) também diminuíram no pós-operatório. As Cer desempenham um papel chave na regulação das vias de sinalização^{105,106}, estão envolvidas na patogênese do DM1 e 2¹⁰⁷; além de compartilhar semelhanças estruturais com lipopolissacarídeos (LPS), conhecidos por desencadear respostas

inflamatórias importantes¹⁰⁸. O aumento de PE associa-se ao DM2¹⁰⁹ e sua diminuição pode resultar em melhora metabólica. Ao considerar estas observações, a diminuição destas classes de metabólitos condiz com o impacto positivo da DGYR sobre a função metabólica e a melhora do DM2.

Todos os segmentos do trato gastrointestinal sofreram mudanças no perfil metabolômico, exceto no estômago excluído (ECM). Os TG foram os lipídios do TGI que mais se reduziram após a DGYR. Em relação ao período pré-operatório, houve redução em todos os segmentos digestivos (1,58 vezes menor no ECA; 7,04 vezes no duodeno; 15,9 vezes no jejuno e 2,91 vezes no íleo). A proporção de mudança de TG no jejuno foi maior do que a dos outros segmentos, que também ocorreu para PC, LPC e SM. Além dos lipídios, foi no jejuno que foram observadas mais alterações e em maior número de outras classes de metabólitos. Isso poderia ser porque, precocemente após a DGYR, há alteração importante na quantidade e composição da dieta, associada ao reposicionamento anatômico do jejuno. Isto resulta na diminuição de fornecimento e absorção de nutrientes. Pode haver também mudança na característica do estímulo trófico pelo contato com partículas de substratos parcialmente intactos, anteriormente associados a transformações na estrutura da mucosa intestinal em estudos experimentais¹¹⁰. Isto pode influenciar mecanismos de sinalização metabólica, especialmente, em razão do aumento do fluxo de AB, que estimula efeitos sistêmicos mediados por receptores nucleares⁷⁰.

A redução de TG no TGI poderia refletir uma adaptação compensatória que estimula a utilização das reservas intracelulares para atender as demandas energéticas. Isto poderia promover remodelamento do metabolismo intestinal e sistêmico de lipídios, que ocorrem não apenas no jejuno, mas também nos demais segmentos, especialmente, no duodeno e no íleo. O jejuno é o principal sítio de absorção de lipídios e seu armazenamento intracelular no trato gastrointestinal ocorre na forma de *lipid droplets* (LD), reservatórios que otimizam a absorção e fornecem suprimento sustentado de lipídios durante o jejum^{111,112}. Os LD são formados sobretudo

por TG e também possuem outras classes de lipídios como LPC e ácidos graxos, além de uma camada de fosfolipídios, especialmente, PC¹¹³.

O metabolismo de lipídios e a biogênese de LD envolvem interações complexas e interdependentes entre as diversas classes de lipídios, que passam pelo ciclo de Lands e pela via de Kennedy (ANEXO S)^{113–115}. As LD interagem dinamicamente com múltiplos compartimentos subcelulares e sua composição influencia diversas atividades biológicas, incluindo a regulação do metabolismo celular, o tráfego de membrana, o enovelamento de proteínas, as vias de sinalização e o metabolismo de carboidratos^{116–118}. Além disso, a interação entre LD e peroxissomos controlam o fluxo metabólico lipídico, participando da coordenação do metabolismo¹¹⁹.

O quadro de resistência insulínica do paciente diabético é caracterizado pelo aumento da síntese de lipídios e transporte de colesterol na mucosa intestinal, acompanhado por produção aumentada de quilomícrons¹²⁰. A disfunção intestinal e a superprodução de lipoproteínas são uma característica integral da dislipidemia observada no quadro de resistência insulínica e DM2^{121,122}. Quando em excesso, os carbonos derivados da glicose servem como substratos para a lipogênese *de novo*¹²³ e, portanto, as mudanças no repertório de lipídios da mucosa e a diminuição da disponibilidade de TG, PC e LPC observadas no trato gastrointestinal após a DGYR pode modificar a densidade das LD, o que impacta a atividade celular e estimula as adaptações metabólicas e de sinalização (Figura 39).

Legenda: (a) condições fisiológicas; (b) DGYR. Adaptado de Barbosa AD, et al. 2015¹¹⁴.

Figura 39 - Formação de *lipid droplets* e possível mobilização após a DGYR.

A relação entre lipídios, obesidade, resistência insulínica e DM2 é bem reconhecida em diversas pesquisas clínicas e experimentais. Os mecanismos que as correlacionam, ainda não foram bem esclarecidos, contudo, evidências sugerem que a dislipidemia desempenhe papel central¹²⁴. Nesse sentido, o acúmulo de lipídios pode contribuir para a resistência insulínica^{125,126}.

No DM2, dentre os fatores contribuintes para as alterações do metabolismo dos lipídios, incluem os efeitos da insulina na produção hepática de apoproteínas, regulação da lipoproteína lipase, função da proteína de transferência do éster de colesterol e ações periféricas da insulina no tecido adiposo e muscular¹⁰³.

Os níveis de esfingolipídios (incluindo SM e Cer) podem ser seletivamente regulados por fatores circulantes associados à obesidade e a doenças metabólicas¹⁰⁴. SM e Cer vêm sendo apontados como mediadores da perda da sensibilidade insulínica, além de promover estado pró-inflamatório e induzir morte e disfunção celular no pâncreas. Seus níveis plasmáticos são considerados biomarcadores potenciais para quadros de descompensação da resistência insulínica e DM2. Apesar destes achados, o papel de espécies específicas de esfingolipídios e suas vias metabólicas permanece obscuro^{17,127}.

A maior parte das moléculas lipídicas partícipes das categorias de LPC, PC, SM, PE e CE diminuíram significativamente no pós-operatório, embora algumas poucas moléculas tenham se comportado de forma distinta. A redução da maior parte das moléculas lipídicas pode implicar em melhora parcial, algumas variáveis bioquímicas são relacionadas com a melhora da resistência insulínica e do DM2. No entanto, concorda-se que ainda são necessários estudos específicos para obter conclusões mais relevantes a partir da transformação destas classes de lipídios¹²⁸,.

11.3.1.2 A DGYR modifica a microbiota intestinal

Nos resultados do presente estudo, observa-se que alterações em metabólitos produzidos ou modificados pela microbiota foram identificados em todos os tipos de amostras. Particularmente, os metabólitos TMAO, transcrotobetaína, indole-3-acetato, 5-hidroxibutirato, GABA (do inglês, *gamma-Aminobutyric acid*), putrescina, urobilina, P tolil-glucuronido, ácido 5-aminovalérico, 5-metoxitriptamina, ácido glicodesoxicólico e ácido litocólico estão entre os mais relevantes.

Mudanças na microbiota intestinal após a DGYR são bem documentadas na literatura¹²⁹. O pós-operatório da DGYR modifica a disposição anatômica do trato gastrointestinal, levando ao fluxo de proteínas e outras substâncias não digeridas para a região distal do intestino. Isto estimula a proliferação de bactérias proteolíticas que produzem metabólitos como amônia, fenóis, aminas, indóis e tióis, potencialmente tóxicos em altas concentrações¹³⁰. A fisiologia do hospedeiro é amplamente impactada pela produção de vários metabólitos bioativos derivados da interação da microbiota entre si, com o hospedeiro e com a dieta. Estes metabólitos atuam como moduladores biológicos de homeostase intestinal e imunológica, metabolismo energético, função vascular dentre outros^{131–133}.

Considera-se que as alterações encontradas nos referidos metabólitos revelam mudanças na composição ou atividade da microbiota intestinal. De fato, o protocolo do qual este estudo faz parte (SurmetaGIT⁸⁶)

incluiu a análise da microbiota, e Al Assal (2018)¹³⁴ demonstrou alterações em sua diversidade e composição no pós-operatório da DGYR. Contudo, não foi objeto do presente estudo cotejar os dados da microbiota intestinal.

11.3.1.3 Alterações nos níveis de AB plasmáticos após a DGYR podem ativar o receptor FXR e contribuir para melhora do DM2

Os AB foram dosados em amostras de plasma com abordagem metabolômica alvo. Ao comparar os resultados de AB obtidos nos períodos pré e pós-operatórios de todas as pacientes, apenas o ácido litocólico apresentou alteração significativa após DGYR, com diminuição de sua concentração em 2,6 vezes. Após a classificação dos grupos respondedores e não respondedores, identificou-se um padrão metabólico discriminatório, diferente da análise global entre o pré e o pós-operatório. Os pacientes respondedores apresentaram aumento significativo dos AB primários quenodesoxicólico, em suas duas formas conjugadas: ácido glicoquenodesoxicólico e ácido tauroquenodesoxicólico. Por outro lado, os pacientes não respondedores apresentaram alterações dos AB secundários, com aumento do ácido glicodesoxicólico e diminuição do ácido litocólico.

Além de atuar na solubilização de lipídios, os AB são moléculas sinalizadoras capazes de desempenhar funções endócrinas sistêmicas por meio da ativação de diferentes sensores biológicos. Desta maneira, os AB participam da regulação metabólica e podem atuar sobre a utilização de substratos energéticos em diferentes tecidos, influenciando também a homeostase glicêmica. Estes resultados sugerem que os AB alterados em respondedores e não respondedores ativam diferentes sensores, promovendo efeitos metabólicos positivos, porém distintos, mediados pela ativação de receptores nucleares e de membrana. Isto explicaria, em parte, o mecanismo pelo qual a melhora do DM2 ocorre após a DGYR.

Os ácidos glicoquenodesoxicólico e tauroquenodesoxicólico, alterados nos pacientes respondedores, possuem afinidade com o receptor

nuclear FXR (do inglês, *farnesoid X receptor*) que, ao ser ativado por estes AB, modula a sensibilidade insulínica no tecido adiposo, melhora a utilização de glicose e a gliconeogênese no fígado, controla o metabolismo dos AB regulando sua secreção, síntese e absorção na vesícula biliar. Além disso, FXR age no intestino estimulando FGF19¹³⁵, uma proteína que funciona como hormônio e promove melhora na atividade mitocondrial e da resistência insulínica.

Alinhado a isto, a literatura relata que obesos diabéticos submetidos à DGYR apresentam aumento de FGF19⁷⁰, sendo este mais expressivo em pacientes que apresentam remissão do DM2 (classificados pelos mesmos critérios adotados na presente pesquisa)¹³⁶. O receptor FXR também regula o metabolismo do colesterol e dos ácidos graxos¹³⁷ e sua ativação antagoniza NF-κB. Assim, há um efeito protetor nas células epiteliais intestinais, que também impedem o aumento do crescimento bacteriano e a injúria da mucosa, diminuem a produção de proteína C reativa e inflamação, além de preservar a barreira intestinal¹³⁸.

Outras pesquisas também apontam que os AB hidrofóbicos como o tauroquenodesoxicólico inibem a proliferação de linfócitos, a produção de citocinas inflamatórias, a resposta humoral e a via de sinalização de interferons^{139,140}. Portanto, pacientes respondedores parecem estar em melhores condições metabólicas e com menor quadro inflamatório. Adicionalmente, o aumento dos AB primários conjugados nos pacientes respondedores pode estar relacionado a mudanças na composição ou na atividade da microbiota, o que explicaria a redução das taxas de desconjugação de AB, um processo catalisado por hidrolases de sais biliares da microbiota⁷⁵.

Por outro lado, os AB alterados nos não respondedores sugerem diminuição da ativação de FXR e um aumento da ativação de TGR5 (do inglês, *membrane Takeda G-protein receptor 5*), um receptor de membrana específico para AB, que regula sua secreção na vesícula biliar e atua na liberação de GLP-1 no intestino, influenciando o gasto energético no músculo esquelético e no tecido adiposo, além de melhorar a função

hepática e pancreática e, conseqüentemente, a intolerância à glicose¹⁴¹. O ácido glicodesoxicólico liga-se a TGR5 por afinidade e, tendo em vista o seu aumento após a DGYR nos pacientes não respondedores, é provável que haja um maior estímulo deste receptor nesses pacientes. Já o ácido litocólico possui afinidade por FXR e TGR5 e, por apresentar-se diminuído nos pacientes não respondedores, indica menor grau de ligação a estes receptores.

Recentemente uma pesquisa demonstrou que os AB desempenham um papel importante na resposta inflamatória e na função imune de macrófagos, influenciando processos como fagocitose e autofagia. Isto se deu pela ativação de TGR5, que atuou na modulação da expressão de genes pró e anti-inflamatórios em macrófagos humanos. Esta condição esteve associada à ativação de TLR4 (do inglês, *toll like receptors 4*) por LPS (do inglês, *lypopolisaccharides*), endotoxinas da microbiota que prejudicam a função imune em resposta a infecções virais ou bacterianas¹⁴².

Diante do exposto, pode-se aventar a hipótese que pacientes respondedores apresentam aumento da ativação de FXR, e os não respondedores ativariam TGR5. Ambos receptores podem estimular a melhora da homeostase glicêmica, mas, por mecanismos diferentes e, tendo em vista seu impacto metabólico mais amplo, a ativação de FXR pode atuar na melhora do DM2 apresentada por pacientes respondedores.

Corroborando, parcialmente, com esta hipótese, encontra-se outra alteração que parece estar associada às diferenças do perfil de AB entre respondedores e não respondedores. Pacientes não respondedores apresentaram acúmulo de TMAO (N-óxido de trimetilamina, TMAO), um metabólito gerado pelo fígado a partir da transformação da trimetilamina produzida pela microbiota, que promove alterações importantes no metabolismo do colesterol e, conseqüentemente, no *pool* de AB¹⁴³.

Experimentalmente, a suplementação oral de TMAO diminuiu a absorção, o transporte reverso de colesterol e a expressão intestinal de seus transportadores (Npc1L1 e Abcg5/8), que permitem o deslocamento de colesterol para o interior e exterior de enterócitos, respectivamente. Além

disso, houve a redução da expressão de enzimas de síntese de AB no citocromo P450 (CYP7A1 e CYP27A1) e no fígado, CYP7A1 e CYP27A1 também estiveram diminuídos, acompanhados da redução dos transportadores de AB (Oatp1, Oatp4, Mrp2 e Ntcp)¹⁴⁴.

Portanto, a hipótese deste estudo contempla que as mudanças na microbiota e nos AB poderiam compor os mecanismos pelos quais a DGYR leva a melhora do DM2. Nos pacientes respondedores, uma sequência de eventos seria iniciada após a cirurgia, na qual haveria primeiramente a modificação da microbiota, que reduziria a taxa de desconjugação e biotransformação de AB. Estes, por sua vez, atuariam sobre FXR promovendo os efeitos metabólicos descritos anteriormente. Por outro lado, pacientes não respondedores também apresentariam alterações na microbiota, embora associadas com a retenção de TMAO, que modifica o metabolismo do colesterol e, conseqüentemente, os AB que, por sua vez, estariam mais propensos a ativar TGR5. O impacto metabólico da ativação dos receptores FXR e TGR5 por AB é demonstrado a seguir (Figura 40).

Legenda: A ativação de FXR por ácidos biliares impacta o metabolismo dos próprios ácidos biliares, na homeostase glicêmica, de energia e de lipídios, na vesícula biliar, no tecido adiposo, no fígado e no intestino. A ativação de TGR5 por ácidos biliares impacta o metabolismo dos ácidos biliares, homeostase glicêmica, de energia e de lipídios, embora por um número menor de processos metabólicos, que ocorre no fígado, intestino, músculo e tecido adiposo marrom. FXR, *FXR*, *FXR*; TGR5, *membrane Takeda G-protein receptor 5*; LCA, ácido litocólico; DCA, ácido desoxicólico; CDCA, ácido quenodesoxicólico; CA, ácido cólico;

Figura 40 – Alterações plasmáticas de ácidos biliares de pacientes respondedores e não respondedores e efeitos metabólicos mediados pela ativação de sensores biológicos^{135,141,145–147}

11.3.1.4 Melhora do DM2 após DGRY pode se associar ao aumento da flexibilidade metabólica induzida pela ω oxidação

No plasma de pacientes respondedoras, a carnitina apresentou-se discretamente aumentada. Associado a isto, identificam-se flutuações nos níveis de algumas espécies de acilcarnitinas. A carnitina desempenha papel importante no metabolismo de lipídios, como cofator para a β oxidação de ácidos graxos. Sua função compreende o transporte de ácidos graxos de cadeia longa pela membrana mitocondrial, que se dá na forma de ésteres de acilcarnitinas. Por intermediar o transporte de grupos acetil do interior para o exterior da membrana mitocondrial, a carnitina influencia o metabolismo de glicose e a detecção de combustível intracelular^{148–150}.

No pós-operatório, ao considerar todas as pacientes do estudo, as moléculas de acilcarnitinas C16:0, C8:0 e C2:0, apresentaram-se aumentadas e as acilcarnitinas C3:0 e C4:0 diminuídas. O papel biológico do efluxo das acilcarnitinas no compartimento plasmático é desconhecido, contudo as moléculas encontradas estavam aumentadas geralmente associam-se a uma β oxidação incompleta de ácidos graxos, enquanto aquelas diminuídas derivam do catabolismo de aminoácidos¹⁵¹. Isto remete a uma disfunção mitocondrial relacionada à resistência insulínica. Apesar disso, é importante observar que a oxidação incompleta de ácidos graxos leva à resistência insulínica apenas se não houver aumento proporcional da atividade do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA ou ciclo de Krebs)¹⁵¹, o que resultaria em um desequilíbrio metabólico.

Neste considerando, as alterações que indicam melhora da atividade do TCA são identificadas em pacientes respondedoras. A comparação geral revelou aumento de cinco ácidos dicarboxílicos (ADC), que incluem: aminomalonato, e os ácidos fumárico, málico, oxálico e sucínico. Com exceção do ácido sucínico, os ADC são produzidos pela ω oxidação, rota alternativa de catabolismo de ácidos graxos e podem, posteriormente, ser metabolizados pela β oxidação, rota metabólica que produz o ácido sucínico, um ADC que atua como intermediário do TCA.

No presente estudo ocorreu aumento do ácido sucínico apenas nas pacientes respondedoras. Este metabólito influencia o fluxo metabólico, gerando intermediários que favorecem o TCA e todas as suas ramificações¹⁵², que incluem o metabolismo de carboidratos, lipídios, aminoácidos e heme²⁷.

Em estado normofisiológico, a β oxidação ocorre essencialmente na mitocôndria e nos peroxissomos, enquanto a ω oxidação ocorre exclusivamente no retículo endoplasmático liso¹⁵³. A formação de ADC a partir da ω oxidação reduz a β oxidação mitocondrial e estimula a β oxidação de peroxissomos (mecanismo no ANEXO T). Após isso, os ADC são desviados para as mitocôndrias, onde a β oxidação é completada, gerando o

ácido sucínico, que entra como intermediário do TCA, e favorece esta rota metabólica¹⁵³.

O DM2 e suas complicações resultam, parcialmente, em alterações mitocondriais, que comprometem o rendimento metabólico do TCA. O DM2 é acompanhado de inflexibilidade metabólica, que consiste na incapacidade de adaptar o metabolismo a diferentes requerimentos energéticos, alternando a utilização de glicose por oxidação de ácidos graxos em consequência a resposta deficiente à insulina²⁷. Os quadros de DM2 e obesidade estão associados a distúrbios no metabolismo intermediário de carboidratos e lipídios, múltiplos defeitos no fluxo e inibição de etapas enzimáticas do TCA, bem como falhas na β oxidação mitocondrial¹⁵⁴.

Além disso, o desequilíbrio na razão entre oxidação e captação leva ao aumento das concentrações intracelulares de ácidos graxos de cadeia longa acil-coa, resultando na formação de di e triacilgliceróis, promovendo resistência insulínica em razão do acúmulo destes compostos, que prejudicam a sinalização. Apesar do TGI não ser considerado um alvo-padrão para resistência insulínica, este é o primeiro órgão que reconhece nutrientes e identifica moléculas que podem afetar este processo¹⁵⁵.

A DGYR parece estimular a ω oxidação, que pode atuar como via alternativa para oxidação de ácidos graxos quando os níveis intracelulares de acil-CoA são altos, reduzindo a disponibilidade desses precursores para a síntese de lipídios tóxicos como ceramidas e diacilgliceróis que prejudicam a sinalização da insulina^{153,156–158}. Assim, o aumento da ω oxidação no grupo respondedor pode atuar como mecanismo compensatório, com efeito protetor, que modifica o fluxo e a utilização de substratos energéticos, redistribuindo a oxidação de ácidos graxos entre o retículo endoplasmático, peroxissomos e mitocôndria. Desta maneira, a sobrecarga metabólica da mitocôndria é reduzida, favorecendo a atividade do TCA¹⁵⁹. Em razão da relação metabólica dos ADC com o DM2, sugerem-se que mudanças nessas classes de metabólitos poderão compor os mecanismos de melhora na glicemia de jejum de pacientes respondedores no pós-operatório da DGYR.

Os ADC são considerados substratos energéticos convenientes, pois suas características físico-químicas são intermediárias entre a glicose e os ácidos graxos. Estes metabólitos podem ser submetidos a β oxidação, como ácidos graxos, mas são solúveis em água do mesmo modo que a glicose, em razão de suas cadeias curta/média e a presença de dois grupos carboxílicos na porção terminal. O uso de ADC já foi proposto como terapia para o DM2, sendo utilizados como possíveis fontes alternativas de substrato energético²⁷. O ácido succínico, aumentado apenas no grupo respondedor, representa um metabólito-chave nesse processo, pois atua como intermediário metabólico e todas as vias ligadas ao TCA dependem da formação temporária deste metabólito²⁷.

Além disso, o ácido succínico pode sair da matriz mitocondrial e atuar no citoplasma e no espaço extracelular, alterando o padrão de expressão de genes, modulando o panorama epigenético ou atuando como um sinalizador similar a hormônios¹⁶⁰. No jejuno, identifica-se a diminuição de ácido succínico e, tendo em vista as alterações metabólicas da DGYR, atribui-se a esta diminuição a maior utilização deste metabólito pelo TCA, atendendo às novas demandas de produção de ATP para adaptação metabólica e regulação da função celular.

Em suma, estas mudanças resultam na melhora do fluxo e da utilização de substratos energéticos, melhorando a flexibilidade metabólica mitocondrial, pois redistribui a oxidação de ácidos graxos entre o retículo endoplasmático, peroxissomos e mitocôndria. Dentro do contexto bioquímico, este mecanismo é plausível e poderia atuar, em conjunto com outras circunstâncias, na melhora da glicemia de jejum de pacientes respondedores no pós-operatório da DGYR. A seguir, o mecanismo desta hipótese é apresentado, demonstrando as transformações metabólicas envolvendo os ADC, ω e β oxidação e TCA (Figura 41).

Legenda: pacientes obesas e com DM2 ao serem submetidas a DGYR apresentam estímulo a ω oxidação, que produz ácidos dicarboxílicos que, por sua vez, são submetidos a β oxidação, produzindo o ácido succínico. O ácido succínico atua como intermediário metabólico do TCA, influenciando todas as suas ramificações.

DM2, diabetes mellitus tipo 2; DGYR, derivação gástrica em Y de Roux; TCA, ciclo do ácido tricarboxílico ou ciclo de Krebs; AG, ácidos graxos;

Figura 41 – Transformações envolvidas na melhora metabólica estimulada pela ω oxidação

11.3.1.5 Pacientes que não apresentam remissão do DM2 após DGYR podem apresentar disfunção renal subclínica

Nos resultados do presente estudo, são encontradas alterações em TMAO, ácido úrico, ácido aloxanóico, xantina, hipoxantina, urobilina, AB e ácido succínico. Tomadas, em conjunto, estas mudanças permitem levantar a hipótese da existência de uma disfunção renal subclínica, que poderia ser um possível motivo pelo qual alguns pacientes não apresentariam remissão de DM2 após a DGYR.

1. TMAO

Na comparação global dos pré e pós-operatórios, houve aumento de TMAO no plasma e na urina de todas as pacientes. Em condições fisiológicas, o aumento plasmático de TMAO é acompanhado do aumento de sua excreção urinária. Contudo, no período pós-operatório, observa-se que houve aumento de TMAO urinário apenas em pacientes respondedores. Isto poderia sugerir que pacientes não respondedores retêm este metabólito. O TMAO é uma toxina urêmica, cujos níveis aumentam conforme a redução da função renal¹⁶¹ e, portanto, a diminuição de sua excreção urinária remete a um possível quadro de disfunção renal¹⁴³, considerada subclínica nas condições da presente pesquisa.

É possível que as alterações anatômicas do trato gastrointestinal e as mudanças na dieta no pós-operatório da DGYR modifiquem a microbiota intestinal¹²⁹ e isso poderá estar diretamente relacionado com o aumento da proliferação de bactérias que produzem toxinas urêmicas¹³⁰, como o TMAO. Ademais, TMAO também induz a expressão de citocinas inflamatórias e moléculas de adesão mediadas em parte pela via NF- κ B¹⁶². O que pode promover um estado mais inflamatório e mais susceptível à resistência insulínica no grupo não respondedor. A ativação da expressão de NF- κ B ocorre em membranas basolaterais de células renais tubulares proximais, podendo piorar o quadro de nefrotoxicidade quando há a captação de toxinas urêmicas^{163,164}.

2. Ácido úrico, ácido aloxanoico, xantina e hipoxantina

Estes resultados demonstraram elevação do ácido úrico plasmático no pós-operatório da DGYR, exclusivamente, nas pacientes não respondedoras. O aumento de ácido úrico é considerado marcador preditivo para o risco do desenvolvimento e progressão de doença renal, independente de outras condições associadas¹⁶⁵. A relação entre ácido úrico e injúria renal é relatada em várias populações em estudos epidemiológicos, contudo, os mecanismos fisiopatológicos potenciais ainda necessitam de

esclarecimentos¹⁶⁶. Experimentalmente, níveis elevados de ácido úrico levam ao dano renal, ao induzir a fibrose túbulo-intersticial, hipertensão e injúria glomerular¹⁶⁵. É possível que o aumento do ácido úrico leve à disfunção endotelial e inibição de óxido nítrico^{167,168}, o que também contribui para quadros de síndrome metabólica, dislipidemia e resistência insulínica¹⁶⁹, além de aumentar o risco de DM2¹⁷⁰.

O ácido úrico possui efeito pró-inflamatório intracelular, podendo estimular NADPH oxidase (do inglês, *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) e induzir a disfunção mitocondrial. Além disso, o ácido úrico foi proposto como marcador preditivo de obesidade e diabetes¹⁷¹ e seu aumento associa-se à síndrome metabólica¹⁷². Estes fatos são coerentes com o contexto aqui investigado, particularmente em razão da ocorrência desta alteração exclusivamente nas pacientes não respondedoras.

Ademais, foi demonstrado que o ácido úrico plasmático pode cruzar a barreira hematocefálica e atuar como um potente estímulo pró-inflamatório, ativando NF-κB. Esta inflamação hipotalâmica é considerada uma das causas de desordens metabólicas, pois influencia a ação periférica da insulina¹⁷³. Estudos anteriores também indicam que um dos mecanismos chave da dislipidemia e da intolerância à glicose podem ser originados no hipotálamo¹⁷⁴.

Em contraste a este aumento de ácido úrico nas pacientes não respondedoras, pacientes respondedoras apresentaram aumento de ácido aloxanoico no plasma e na urina. O ácido aloxanoico pode ser originado a partir do ácido úrico e, portanto, pacientes respondedoras podem estar convertendo o excesso de ácido úrico em ácido aloxanoico, e este pode ser um dos desvios metabólicos que diferenciam os dois grupos.

Biologicamente, isto teria efeito protetor em relação ao desenvolvimento de DM2. Neste processo, considera-se que pacientes respondedores, originalmente, possuam elevação de aloxana, um metabólito que é quimicamente transformado em ácido aloxanoico. Em pacientes com

DM2, os níveis de aloxana dependem diretamente do metabolismo do ácido úrico¹⁷⁵, seu precursor¹⁷⁶.

Estudos anteriores demonstraram que o ácido aloxanoico também pode ser produto do ácido úrico, sendo transformado em um processo intermediado por leucócitos¹⁷⁷. Diversas pesquisas exploraram o papel da aloxana sobre a glicemia, indicando que este metabólito pode induzir tanto a hipo como a hiperglicemia, dependendo da dose e do contexto aplicado. Contraditoriamente, a aloxana é muito utilizada como indutora de diabetes tipo 1 em estudos experimentais, por ser um análogo citotóxico da glicose que compromete as células betapancreáticas. Mas, este metabólito não exerce efeitos tóxicos em seres humanos¹⁷⁸.

A aloxana pode alterar o consumo de oxigênio mitocondrial, modificando a utilização de substratos e seu aumento pode estimular o consumo de ácido succínico¹⁷⁹, o que também está de acordo com estes resultados e são explanados no item 11.3.1.5, no qual se discute o aumento deste metabólito no grupo respondedor, possivelmente, relacionado à oxidação e melhora na flexibilidade metabólica. Adicionalmente, xantina e hipoxantina, metabólitos da degradação do ácido úrico, apresentaram-se aumentados na urina e no plasma das pacientes respondedoras, respectivamente. Desta maneira, supõe-se que haja um aumento da degradação do ácido úrico no grupo respondedor, isto é demonstrado pela formação de ácido aloxanoico.

Logo, o aumento do ácido úrico exclusivamente no grupo não respondedor permite sugerir que, apesar dos efeitos metabólicos positivos da DGYR, estes pacientes poderiam apresentar disfunção renal e ainda seriam metabolicamente susceptíveis ao DM2.

3. Urobilina e AB

Pacientes não respondedores apresentaram aumento importante da urobilina (FC 7,4) no plasma. A urobilina é um metabólito formado pela

degradação de hemoglobina. Em seres humanos, a hemoglobina possui meia vida de 120 dias e após este período é degradada, liberando heme que, posteriormente, é convertido em bilirrubina pelos macrófagos. A bilirrubina é direcionada ao fígado e conjugada aos AB, que são secretados no intestino e modificados pela microbiota, produzindo urobilina. O aumento dos níveis plasmáticos de urobilina é forte indicativo de hemólise intensa¹⁸⁰. Adiciona-se que, perturbações no metabolismo do heme foram previamente descritas em pacientes submetidos à cirurgia bariátrica¹⁸¹.

A anemia crônica é observada entre 12% e 30% dos pacientes após DGYR. Supõe-se que a DGYR mimetize a síndrome mielodisplásica, uma condição na qual as células sanguíneas são defeituosas. Mesmo com suplementação oral e concentrações plasmáticas adequadas de ferro, cobre, folato e vitamina B12, alguns pacientes podem apresentar anemia persistente após a cirurgia bariátrica. No espectro de desordens hematológicas relacionadas à DGYR, são descritas citopenias que resultam de inter-relação complexa de deficiências nutricionais e fatores inflamatórios, infecciosos, imunológicos ou relacionados ao uso de medicamentos^{182,183}.

As alterações no perfil dos AB também podem estar relacionadas ao possível quadro de hemólise. Algumas classes de AB possuem atividade hemolítica¹⁸⁴, como é o caso do ácido deoxicólico¹⁸⁵, que se observa aumentado, em sua forma conjugada, nos pacientes não respondedores. A incorporação de AB na membrana de eritrócitos é facilitada pela sua característica anfipática, que se modifica a conformação estrutural dos eritrócitos, provocando hemólise¹⁸⁴.

Portanto, aparentemente, as alterações nos níveis de AB e urobilina poderiam atuar, respectivamente, como causa e efeito de hemólise nos pacientes não respondedores. Dito isso, parte-se para um segundo nível de interpretação, no qual se considera as consequências da hemólise dentro do contexto investigado.

O heme apresenta alta biorreatividade e efeitos oxidantes¹⁸⁶ que estimulam a vasoconstrição e a citotoxicidade, causando lesão renal¹⁸⁷. O

heme pode tanto se ligar a gases vasodilatadores como ao óxido nítrico e monóxido de carbono, quanto permanecer em sua forma livre, que é citotóxica em razão de sua propriedade lipofílica, desestabiliza a lipídios de membrana e possui efeito oxidante e inflamatório¹⁸⁶. Adiciona-se que insultos nefrotóxicos podem liberar heme a partir de enzimas do citocromo P450¹⁸⁶.

Explanada a contribuição do heme na disfunção renal e o papel dos AB na hemólise, retorna-se à discussão para outro aspecto dos AB: a interação de seu receptor nuclear. Conforme aventado no item 11.3.4.1, pacientes respondedores poderiam apresentar aumento de AB que tem capacidade de ativar FXR, e os não respondedores, supostamente, diminuem a ativação de FXR.

Experimentalmente, a inibição da ativação de FXR promoveu piora da nefropatia de camundongos com diabetes tipo 1¹⁸⁸. Fisiologicamente, FXR modula SREBP 1 (do inglês, *sterol regulatory element binding proteins 1*)^{189,190}, um fator de transcrição que regula a síntese de colesterol e ácidos graxos. A lesão renal aumenta SREBP 1, o que resulta na deposição de colesterol e triglicerídios nos rins, levando à disfunção por inflamação, estresse oxidativo e fibrose e resulta também em proteinúria¹⁹¹. Desta maneira, supõe-se que a ativação de FXR em pacientes respondedoras poderia atuar modulando SREBP 1 e impedir a deposição de lipídios nos rins. Nas pacientes não respondedoras, isto poderia não ocorrer, o que as tornaria mais susceptíveis à nefropatia, condição classicamente associada a alterações no metabolismo dos lipídios¹⁹¹⁻¹⁹³. Aparentemente esse outro caminho metabólico parece fortalecer nossa hipótese de disfunção renal subclínica em pacientes não respondedores.

4. Ácido sucínico

Conforme discutido no item 11.3.1.5, a formação de ADC, especialmente, o ácido sucínico, que ocorreu exclusivamente no grupo respondedor, sugere melhora da flexibilidade metabólica neste grupo. Isto

ocorre a partir do desvio metabólico da degradação de ácidos graxos, que passa a acontecer também pela ω oxidação. Considera-se, de forma preliminar, esta hipótese central para a melhora do DM2, especialmente pelas características bioquímicas dos ADC, que promovem melhora no fluxo metabólico e impactam todas as vias ligadas ao TCA, inclusive o metabolismo de lipídios.

Fisiologicamente, a ω oxidação de ácidos graxos ocorre em sequência de reações bioquímicas catalizadas por enzimas do citocromo P450, localizadas no retículo endoplasmático liso de células renais^{194,195}. Portanto, é plausível que a suposta disfunção renal das pacientes não respondedoras possa modificar estas enzimas e, conseqüentemente, impedir a ω oxidação nestes pacientes. Conforme já discutido no item anterior, os pacientes não respondedores podem acumular lipídios nos rins, o que contribui para injúria e disfunção orgânica¹⁹⁶. Apesar da ω oxidação ser uma via menos utilizada no metabolismo dos ácidos graxos (4 a 15%)¹⁵², sua importância aumenta dramaticamente durante condições como o jejum e em doenças metabólicas¹⁹⁷.

A ideia de que os lipídios possam ter atuação na nefropatia diabética não é completamente recente, embora ainda não propriamente explorada. Depósitos de lipídios intraglomerulares foram descritos nos rins de pacientes diabéticos pela primeira vez, em 1936, por Kimmelstiel e Wilson, sendo posteriormente validados por outras pesquisas^{198,199}. Diversos modelos de síndrome metabólica e diabetes apresentam hiper-regulação de genes lipogênicos associadas ao desenvolvimento de depósitos de lipídios nos glomérulos e túbulos renais^{191,200,201}.

Tomadas em conjunto, as alterações metabólicas relacionadas à disfunção renal subclínica parecem explicar o motivo pelo qual a remissão do DM2 não ocorre em alguns pacientes no pós-operatório da DGYR. Supõe-se que o mecanismo de remissão do DM2 envolve a participação dos rins, mediando as reações de ω oxidação e eliminando toxinas urêmicas produzidas pela microbiota alterada, como o TMAO. A disfunção renal de

pacientes não respondedoras poderia reter TMAO, que modifica o metabolismo do colesterol, dos AB e transportadores de esteroides no fígado e no intestino¹⁴³. Consequentemente, o perfil dos AB das pacientes não respondedoras é diferente das pacientes respondedoras e diminui a ativação do receptor nuclear FXR, o que reduz o impacto metabólico da cirurgia e poderia ter associação direta com a disfunção renal. Associada a isso, a disfunção renal poderia alterar as enzimas do citocromo P450 renais, impedindo a ω oxidação nesse grupo.

Vale lembrar que a obesidade aumenta em até sete vezes o risco de doença renal em estágio final, independente de hipertensão e diabetes²⁰². Este risco aumentado é atribuído a mudanças como hiperfiltração glomerular, expansão da matriz glomerular, glomerulomegalia que, eventualmente levam à glomerulosclerose, fibrose intersticial e doença renal crônica^{203,204}.

Adiciona-se que pacientes com disfunção renal podem apresentar mudanças no perfil da microbiota intestinal, associadas com redução do trânsito intestinal²⁰⁵, excesso de proteínas não digeridas na região do cólon²⁰⁶ que resultam da má assimilação de proteínas em razão do estado urêmico²⁰⁷ e redução do consumo de fibras dietéticas²⁰⁸. Esta condição pode piorar com a terapia de suplementação de ferro e multivitamínicos²⁰⁹ e o uso de inibidores de bomba de prótons¹⁶², que podem aumentar as chances de doença renal entre 20% e 50%²¹⁰.

Coincidentemente, muitas destas circunstâncias ocorrem no pós-operatório da DGYR. A alteração anatômica estabelecida pela DGYR promove o fluxo de nutrientes e proteínas parcialmente digeridos para a região distal do intestino e induz importantes mudanças na dieta, que pode levar à diminuição do consumo de fibras. Paralelamente, o protocolo de acompanhamento pós-cirúrgico inclui a prescrição de suplementos polivitamínicos e de ferro, bem como inibidores da bomba de prótons (omeprazol), o que poderia comprometer ainda mais o quadro de disfunção renal. Ao serem metabolizados pela microbiota intestinal, nutrientes como

carnitina, colina, fosfatidil colina, triptofano e tirosina podem gerar toxinas urêmicas ou seus precursores. Estes nutrientes, estão disponíveis comercialmente e poderiam ser ingeridos na forma de suplementos nutricionais, e seu consumo por pacientes com disfunção renal pode levar a efeitos tóxicos²¹¹.

Diante do exposto, parece plausível sugerir que pacientes não respondedores possuem algum nível de disfunção renal subclínica, de origem pré-operatória por uma complicação do DM2 ou da obesidade e/ou desenvolvida ou agravada no pós-operatório, em razão dos efeitos tóxicos do aumento de heme, restringindo a eliminação adequada de toxinas urêmicas e impedindo a ω oxidação, como rota alternativa de oxidação de ácidos graxos.

11.3.1.6 A não remissão do DM2 após DGYR pode associar-se a alterações na função do citocromo P450

O citocromo P450 é um complexo enzimático, localizado na maioria dos tecidos do corpo. Ele é necessário para a síntese e degradação de hormônios, biossíntese de colesterol e metabolismo da vitamina D, dentre outras funções. Determinadas alterações no P450 podem afetar seus processos biológicos e promover doenças. As alterações metabolômicas observadas no presente estudo propiciam considerar o envolvimento de alteração do citocromo P450 em pacientes não respondedores pelos seguintes motivos:

1. A retenção de TMAO modifica enzimas do citocromo P450, particularmente, a família 7, subfamília A, polipeptídeo 1 (CYP7A1) e da família 27, subfamília A, polipeptídeo 1 (CYP27A1)¹⁴⁴;
2. No plasma de pacientes não respondedoras, observa-se o aumento expressivo da piperidona, um metabólito apontado como marcador de correlação negativa da atividade do citocromo P450, particularmente, da família 2, subfamília E, polipeptídeo 1 (CYP2E1)²¹². CYP2E1 atua

na oxidação de ácidos graxos e pode contribuir para o estresse oxidativo, sendo associado à patogênese do DM2²¹³;

3. O AB ácido glicodesoxicólico, aumentado no grupo não respondedor (item 11.3.1.4), reduz a expressão de CYP2E1²¹⁴;
4. Insultos nefrotóxicos, sugeridos em pacientes não respondedores (item 11.3.1.6) podem decorrer da liberação de heme a partir da degradação de enzimas do citocromo P450¹⁸⁶ e as mudanças do fluxo sanguíneo renal dependem da formação de metabólitos da subfamília CYP4 do citocromo P450¹⁹⁴; e
5. Ao considerar a ausência de ácido sucínico, depreende-se, nos pacientes não respondedores, a ausência de ω oxidação, que contribui para melhora do DM2 (item 11.3.1.5), e é dependente de enzimas do citocromo P450^{194,195}.

11.3.1.7 A DGYR pode modificar o metabolismo de ácidos graxos pelo aumento da expressão de PPAR nas pacientes que apresentam melhora do DM2

Na presente pesquisa, as mudanças nos níveis de AB plasmáticos são importantes para a compreensão de várias alterações metabólicas. Sugere-se que os AB aumentados em pacientes respondedoras poderiam ativar o receptor nuclear FXR, em diversos tecidos e contribuir para a melhora do DM2 no pós-operatório da DGYR.

A biossíntese, transporte e secreção de AB após a DGYR é regulada pela modificação do nível de expressão dos PPAR (do inglês, *peroxisome proliferator-activated receptor*) do tipo α ²¹⁵. Os PPAR são fatores de transcrição da família de receptores nucleares, que traduzem sinais nutricionais em padrões específicos de expressão genética e controlam a bioenergética celular²¹⁶. No contexto da presente investigação, são identificados alguns fatores que poderiam indicar uma relação potencial entre o PPAR e os eventos já descritos nas hipóteses. Os PPAR regulam a

expressão de genes envolvidos no metabolismo de diversos substratos e impactam diretamente a homeostase glicêmica e o metabolismo de AB no fígado e intestino^{217,218}. Além disso, PPAR têm participação direta no metabolismo energético e na oxidação de ácidos graxos¹¹³.

No intestino, dois principais tipos de PPAR foram descritos: alfa (α) e gama (γ)²¹⁹. A interação entre FXR e PPAR α e γ é reconhecida por pesquisas clínicas e experimentais. A ativação de FXR por AB aumenta a transcrição de PPAR α , resultando em uma resposta genética²²⁰ que reduz a esterificação de colesterol, suprime a produção de quilomícrons e aumenta a secreção de HDL pelos enterócitos²²¹. O quadro de resistência insulínica pode ser melhorado pela ação de PPAR γ e associa-se ao aumento da captação e oxidação de ácidos graxos pelo tecido adiposo, bem como o aumento da captação muscular de glicose. Isto diminui o dano lipotóxico, além de melhorar a sensibilidade à insulina, favorecendo a utilização de glicose por tecidos metabolicamente ativos²²².

A doença renal crônica diminui PPAR α , o que resulta na alteração de diversas enzimas envolvidas no metabolismo de ácidos graxos²²³. A β e ω oxidação dos ácidos graxos são dependentes de PPAR α ²²² (mecanismo no ANEXO T) e, particularmente, na ω oxidação, PPAR α atua na indução das enzimas CYP4A, da família do citocromo P450^{224,225}. Experimentalmente, a modulação farmacológica de SREBP-1 e PPAR em animais diabéticos atenua a injúria da nefropatia diabética^{226,227} e defeitos na oxidação de ácidos graxos foram revertidos pelo estímulo à PPAR α and PPAR γ , reduzindo a progressão da doença renal²²⁸.

Diante do exposto, considera-se que os efeitos metabólicos da DGYR podem envolver aumento da ativação dos PPAR com FXR em pacientes respondedores, promovendo impacto metabólico positivo, especialmente, sobre os processos de oxidação de ácidos graxos. Em contrapartida, a disfunção renal de pacientes não respondedores pode modificar PPAR, impedindo a ω oxidação como via de degradação de ácidos graxos de

maneira complementar, demonstra-se o impacto metabólico dos PPAR (Figura 42).

Legenda: RXR, *retinoid R receptor*; PPAR, *peroxisome proliferator-activated receptor*; α, alfa; γ, gama.

Figura 42 - Influência do PPAR α e γ na homeostase glicêmica e de lipídios²¹⁶.

11.3.2 Descrição do mecanismo que integra as hipóteses

A DGYR promove mudanças no processo digestivo, diminui a absorção e o volume de nutrientes, modifica o fluxo de bile e da secreção de hormônios intestinais^{229–231}. Além disso, o rearranjo anatômico do trato gastrointestinal impõe a diminuição na solubilização de lipídios por AB, o que reduz ainda mais a absorção de nutrientes. Os AB passam a agir menos diluídos, sendo direcionados diretamente ao jejuno pela circulação entero-hepática aumentada, o que pode favorecer o aumento de suas concentrações plasmáticas e maior potência de ativação de receptores nucleares e de membrana. Assim, é plausível que uma série de eventos metabólicos influenciadores de processos bioquímicos de oxidação de ácidos graxos e utilização de carboidratos sejam desencadeados, e venham favorecer perda de peso, melhora da resistência insulínica e homeostase glicêmica. Nesse sentido, é importante destacar que a circulação entero-hepática de AB serve como rota fisiológica importante para a reciclagem de AB e absorção de nutrientes, e também para a regulação biológica do metabolismo de lipídios²³².

Com base na interpretação biológica atribuída aos metabólitos identificados, são propostas novas hipóteses que podem fornecer uma base metabólica distinta para a compreensão dos mecanismos que geram as respostas gastrointestinais e sistêmicas induzidas pela DGYR. A partir da comparação dos contrastes metabólicos entre grupos de pacientes respondedoras e não respondedoras, foram estabelecidas possíveis relações com a melhora do quadro de DM2. Ao analisar os testes realizados em conjunto com as alterações significativas e seus respectivos *fold changes*, foi possível determinar um conjunto de metabólitos que sofreu as alterações mais profundas. As flutuações destes metabólitos, seus produtos e precursores, foram utilizadas como referência para propor explicações às mudanças encontradas.

Diversas alterações metabolômicas, no plasma e urina, estiveram presentes em todas as pacientes, sendo, portanto, compartilhadas entre

respondedoras e não respondedoras. Assim, em conjunto com as alterações observadas no trato gastrointestinal, foi possível verificar que o remodelamento do metabolismo dos lipídios é um aspecto característico da DGYR.

Existem diferenças metabólicas entre pacientes respondedoras e não respondedoras. Pacientes respondedoras apresentam aumento de AB primários em sua forma conjugada (ácido glicoquenodesoxicólico e ácido tauroquenodesoxicólico), o que potencialmente poderia vir a ser estímulo da ativação do receptor nuclear FXR. Consequentemente, poderia haver influência positiva no metabolismo de lipídios e na utilização de glicose pelo fígado, além da melhora da sensibilidade insulínica no tecido adiposo. Paralelamente, o aumento de ácido succínico observado poderia apontar para o estímulo da via de ω oxidação, uma rota alternativa de oxidação de lipídios que favorece o TCA e melhora a flexibilidade metabólica. Portanto, a melhora do quadro de DM2 após a DGYR poderia resultar de um mecanismo integrado que envolve mudanças importantes no metabolismo de lipídios, colesterol e AB primários conjugados. Em conjunto, estas mudanças parecem impactar profundamente o metabolismo energético e de macronutrientes, e modificar o fluxo e utilização de substratos, ao lado de favorecer a função mitocondrial.

O DM2 caracteriza-se por estresse anaplerótico, no qual a oxidação de ácidos graxos de cadeia longa é incompleta e resulta no acúmulo de acilcarnitinas¹²⁸. Com base nestes resultados, a DGYR parece melhorar esse estresse anaplerótico nas pacientes respondedoras, fator subjacente que exacerba a disfunção metabólica no DM2.

Por outro lado, pacientes não respondedoras apresentaram alterações que parecem remeter a um quadro de disfunção renal subclínica, com potencial retenção de TMAO produzido pela microbiota alterada após DGYR. TMAO modifica o metabolismo do colesterol e AB, o que poderia modificar o perfil de AB de modo a reduzir sua potência na ativação de FXR. Além disso, a mudança da microbiota também pode atuar diretamente na

produção de AB secundários, ao aumentar as taxas de desconjugação. Assim, as pacientes não respondedoras poderiam ser menos beneficiadas pela ação metabólica dos AB e, em consequência, obter menor eficiência no metabolismo de macronutrientes e utilização de energia em órgãos periféricos. Adicionalmente, a potencial existência de uma disfunção renal subclínica poderia impedir a ω oxidação nas pacientes não respondedoras, uma vez que este processo é catalizado por enzimas renais do citocromo P450 localizadas nos rins, que também poderiam estar alteradas.

Apesar de configurarem interação fisiológica indireta, as interdependências entre FXR, PPAR α , citocromo P450, AB e a ω oxidação de ácidos graxos apontam para um circuito de transformações metabólicas que podem compor os mecanismos que levam a melhora do DM2 após a DGYR. Particularmente, a relação entre a microbiota, AB, FXR e metabólitos endógenos já foi anteriormente relacionada ao desenvolvimento de doenças metabólicas²³³ e, nesse sentido, estes fatores parecem desempenhar funções importantes no contexto desta pesquisa.

Estes resultados apontam que existem mudanças importantes no perfil metabólico após DGYR e as interdependências das presentes hipóteses sugerem que os efeitos da cirurgia provêm da ocorrência simultânea de diversas alterações metabólicas. Estas mudanças, cotejadas com as características clínicas, podem proporcionar novas dimensões ao entendimento dos efeitos metabólicos da DGYR. Estes resultados detêm um potencial promissor para o estudo de biomarcadores preditivos da remissão do DM2 e de novas abordagens terapêuticas, abrindo a possibilidade para novas linhas de investigação. Contudo, a validação destes dados em uma coorte com maior número de pacientes e comparações com grupos controle se faz necessária para confirmar ou descartar as hipóteses aventadas. A seguir, a integração das alterações metabólicas e os mecanismos das hipóteses propostas na presente pesquisa são demonstrados, aos pacientes respondedores (Figura 43), não respondedores (Figura 44) e a combinação destes grupos (Figura 45).

Figura 44 – Representação gráfica integrada das alterações metabólicas e mecanismos das hipóteses propostas em pacientes não respondedoras

Legenda: **(a)**, principais características clínicas das pacientes incluídas; **(b)**, DGYR; **(c)**, principais alterações metabólicas compartilhadas entre respondedoras e não respondedoras: mudança na microbiota, metabolismo de AB e ativação de sensores biológicos: receptor nuclear FXR nas pacientes respondedoras e TGR5 nas não respondedoras; **(d)**, impacto global da DGYR compartilhado entre todas as pacientes incluídas; **(e)**, metabólitos alterados no plasma de pacientes respondedoras; **(f)**, metabólitos alterados na urina de pacientes respondedoras; **(g)**, função renal preservada nas pacientes respondedoras; **(h)**, consequências metabólicas de pacientes respondedoras; **(i)**, metabólitos alterados no plasma de pacientes não respondedores; **(j)**, metabólitos alterados na urina de pacientes não respondedores; **(k)**, disfunção renal subclínica em pacientes não respondedores; **(l)**, consequências metabólicas de pacientes não respondedores.

DM2, diabetes mellitus tipo 2; DGYR, derivação gástrica em Y de Roux; R, respondedoras; NR, não respondedoras; TG, triglicerídios; SM, esfingomielinas; PC, fosfatidilcolinas; LPC, lisofosfatidilcolinas; Cer, ceramidas; FXR, *farnesoid X receptor*; TGR5, *membrane Takeda G-protein receptor 5*; %HbA1c, hemoglobina glicada; HOMA-IR, Modelo de Avaliação de homeostase para resistência insulínica; AB, ácidos biliares; TMAO, N-óxido de trimetilamina; TCDCA, ácido tauroquenodesoxicólico; GCDCA, ácido glicodenodesoxicólico; LCA, ácido litocólico; GDCA, ácido glicodesoxicólico; ω, ômega; AG, ácidos graxos; PPAR, *peroxisome proliferator-activated receptor*; *hipótese proposta a partir das alterações metabólicas identificadas.

Figura 45 – Integração de todas as alterações metabólicas e hipóteses propostas

11.4 Comparação com estudos anteriores

Nos últimos anos, diversos estudos vêm contribuindo para a compreensão do papel da DGYR na melhora do DM2 (Tabela 8). No entanto, ainda existem perguntas a serem respondidas. Por isso, na presente pesquisa procedeu-se de forma distinta das investigações clínicas publicadas, em uma nova abordagem científica.

Tabela 8 - Levantamento dos principais estudos envolvendo metabolômica no contexto da DGYR e do DM2.

Referência	Sujeitos	Tipo de amostras	Número de amostras	Desenho do estudo	Método	Pontos fortes	Pontos fracos
Mutch DM et al. PLoS ONE 2009;4(11): e7905	Humanos	Soro	14	Antes, 3M e 6M	Metabolômica; GC e LC-MS; 172 identificados; 83 considerados	3 plataformas; detecção de esteróides	*9 pacientes s/ DM2 *2 pacientes c/ uso de insulina *apenas PLS DA
Li JV et al. Gut. 2011;60(9):1214-23	Ratos	Plasma e Fezes	2 grupos DGYR:14 Sham: 16	24 horas, 2, 4, 6 e 8 semanas após a cirurgia	Metabolômica; NMR (ressonância magnética nuclear) Metagenômica; pirosequenciamento	Analisa ácidos biliares Correlação direta de metabólitos e microbiota	Estudo experimental
Saeidi N et al. Science. 2013. 26; 341(6144): 406–410	Ratos	Biópsias intestinais, fígado e soro	3 grupos de 5-9 animais	Operados X Sham: 1-Obesos 2-modelo 1 DM2 3- modelo 2 DM2; 2M após cirurgia, 1 e 6M PO reproduzido	Metabolômica; HILIC; Genes e proteínas de enzimas do metabolismo da glicose; soro e fígado; GC e LC-MS	Multi ômica; PET CT; Histologia	*Focado apenas no metabolismo da glicose *não pareado *ratos
Arora T, et al. PLoS ONE. 2015; 10(5): e0126401	Humanos	Plasma	16	Antes, 4 e 42d	Metabolômica; GC e Lipidômica; LC CSH; 288 identificados	Respondedores x Não respondedores	*2 não diabéticos *2 c/ uso de insulina * tamanhos de alça ≠ *apenas PLS DA *retrospectivo
Yu H, et al. J Clin Endocrinol Metab. 2015; 100(11): 4222-30	Humanos	Soro	38 Controles; 327 (33 DM2)	Antes e 1A	Metabolômica alvo; LC-MS CSH	mesmo cirurgião; 100-120cm de alça combinado; Respondedores x Não respondedores	*Apenas ácidos biliares *Não especifica uso de insulina *Classificação de remissão do DM2 em *2 anos e aferição de AB em 1 ano
Luo P, et al. J. Proteome Res. 2016; 15: 1288–99	Humanos	Soro	35	Antes, 6M e 12M	Metabolômica LC-MS CSH; 220 identificados; 71 considerados	Respondedores x Não respondedores; Mesmo cirurgião; 100-120cm de alça combinado; Biomarcadores para prever Respondedores em 6M	*retrospectivo
Narath SH, et al. PLoS ONE. 2016. 11(9):1-18	Humanos	Soro	44	Antes, 1-3 semanas e 1A	Metabolômica; HILIC; 36 identificados; 8 considerados	3 tempos; Pareado; Exclusão de pacientes cirróticos e com problemas de tireóide	*Não exclui usuários de insulina *Apenas 24 possuíam DM2 *2 centros diferentes *Identificação limitada *focado apenas em principais alterações (FDR) *Identificou apenas 36 metabólitos

continua

Tabela 8 - Levantamento dos principais estudos envolvendo metabolômica no contexto da DGYR e do DM2 (conclusão)

Referência	Sujeitos	Tipo de amostras	Número de amostras	Desenho do estudo	Método	Pontos fortes	Pontos fracos
Lopes TIB, et al. omicS. 2016;20(7):415-23	Humanos	Plasma	10	Antes e 1A	Metabolômica NMR	NMR	*apenas plasma *N pequeno *apenas NPLS *focados no teste de alimentação *apenas 5 pacientes com DGYR
Sarosiek K, et al. J Diabetes Res. 2016; 2016:3467403	Humanos	Soro	3 grupos de 5	14d antes e 28d depois	Metabolômica LC; GC-MS 476 identificados	3 técnicas cirúrgicas; 2 plataformas	*N pequeno *Sem QC *apenas FDR *coexistência de outras comorbidades
Zhao L, et al. The FASEB J. 2017; 2(31): 1-12	Humanos	Plasma; Tecido adiposo subcutâneo	38 Controles; 381 (76 DM2)	Antes e 1A	Metabolômica alvo; LC-MS C18; Genômica	DGYR 100-120cm combinado; Multi ômica	*alvo AG livres *Genômica do tecido adiposo após a perda de peso (período não especificado)
Hubal MJ, et al. Obesity. 2017; 25:102-10	Humanos	Soro	6	Antes e 1A	microRNA; perfil alvo; Metabolômica	*Multi ômica; isótopos estáveis	*apenas plasma *apenas grupos de aminoácidos alvo *N pequeno
Sridharan GV, et al. Technology. 2017;5(3):139-84.	Ratos	Fígado	6 Sham; 6 DGYR	Antes e 3M	Proteômica; Metabolômica	Multi ômica	*Ratos *Fígado
Seridi L, et al. PLoS ONE. 2018; 13(5): e0198156.	Humanos	Plasma	9 obesos controles; 9 obesos DM2; 7 magros	Antes, 1 semana e 3M	Metabolômica GC e LC	Associação com parâmetros clínicos; 2 plataformas	*Apenas plasma *não classifica a remissão do DM2
Li Q, et al. EBioMedicine. 2018; 28:234-40.	Humanos	Plasma	10 controles; 9 DM2	Antes, 1 semana, 3 meses e 1A	Proteômica; Metabolômica	Multi ômica	*Apenas plasma *não classifica a remissão do DM2

Legenda: DGYR, derivação gástrica em Y de Roux; DM2, diabetes mellitus tipo 2; MS, espectrometria de massas; LC, cromatografia líquida; GC, cromatografia gasosa; HILIC, coluna cromatográfica por interação hidrofílica; CSH, coluna cromatográfica de fase reversa, superfície híbrida carregada; M, meses; A, anos; d, dias; NMR, ressonância magnética nuclear; Sham, cirurgia placebo; FDR, *false discovery rate*; PO, pós-operatório;

Em virtude das diferenças metodológicas como: desenho do estudo, tipo e tempos de coleta de amostras e métodos de avaliação clínica e metabólica, torna-se difícil cotejar todos os resultados do estudo com os disponíveis na literatura. Contudo, sempre que possível, busca-se realizar, respeitando a ordem cronológica, comparações entre estes resultados e a literatura pertinente.

Mutch et al., (2009)⁴⁷ avaliaram o efeito metabólico da DGYR em amostras de soro de pacientes obesos com e sem DM2. A melhora clínica do pós-operatório foi significativa em todos os pacientes (n=14) e dentre os pacientes com DM2 (n=5), três apresentaram normalização dos níveis de hemoglobina glicada, e dois foram tratados com insulina desde o pré-operatório apresentaram melhora discreta, embora insuficiente para suspensão da terapia com insulina. O estudo foi conduzido em três momentos: pré-operatório, 3 e 6 meses pós-operatório. O perfil metabólico apresentou-se alterado após a DGYR, com modificação significativa de 83 metabólitos, em algum ponto da investigação. As alterações mais expressivas aconteceram no período pós-operatório de 3 meses. Houve predominante aumento de esfingolipídios, ácidos graxos insaturados e fosfolipídios; acompanhados de diminuição de Cer, TG e ácidos graxos saturados. Por outro lado, os aminoácidos, especialmente os de cadeia ramificada (BCAA), apresentaram-se diminuídos. Ao cotejar estes resultados com os de Mutch et al., também foram observadas alterações nas classes de lipídios mencionadas, embora distintas, pois percebeu-se que a grande maioria delas diminuiu, especialmente, Cer e TG. Em contrapartida, apesar da associação entre DM2 e o aumento de BCAA ser reconhecida na literatura²³⁴ e outros estudos também terem demonstrado diminuição de BCAA após a DGYR^{235,236} não foram encontradas alterações significantes de BCAA nestes resultados. Isso poderia ser atribuído ao fato de que os critérios de inclusão e classificação do DM2 de Mutch et al. obedeceram a um padrão distinto do aplicado no presente estudo.

Após a DGYR, Mutch et al. também identificaram aumento plasmático de metabólitos associados a quadros de falência renal (p-cresol sulfato,

índole 3 acetato, ácido 3-indoxilsulfúrico e 3 hidroxindole) juntamente com a redução de seus precursores (triptofano, tirosina e fenilalanina). Mas, os autores atribuíram estas mudanças apenas às alterações da microbiota, sem explorar a fundo a possibilidade real de alterações na função renal.

Para avaliar os efeitos da DGYR independentes de qualquer disfunção metabólica preexistente, um estudo experimental realizado por Li et al., (2011)⁴⁴ realizou análises metabolômicas por ressonância magnética nuclear em amostras de fezes e urina de ratos Wistar machos não obesos. Os animais foram divididos em dois grupos, distribuídos de acordo com o tipo de cirurgia: DGYR (n=14) e cirurgia placebo (Sham, n=16). As amostras foram coletadas em 24 horas, 2, 4, 6 e 8 semanas após a cirurgia. Foram identificadas alterações metabólicas relativamente distintas da presente pesquisa, certamente em razão de grandes diferenças no desenho de estudo, plataformas analíticas utilizadas, tipos de amostra e categoria (clínico x experimental). No entanto, as hipóteses levantadas por Li et al. corroboram duas das hipóteses propostas por esta pesquisadora. Primeiramente, os autores também discutiram um possível efeito da DGYR na função renal, associada ao aumento de acidose tubular. Contudo, esta possibilidade foi brevemente considerada e não contou com outras evidências diretas. Além disso, foi cogitada a modulação do metabolismo energético celular pelo aumento da atividade do TCA e a eficiência energética mitocondrial. Ambos desfechos foram sugeridos a partir da diminuição urinária de metabólitos intermediários do TCA (ácido succínico, 2 oxoglutarato, citrato e fumarato).

Em um estudo experimental, Saeidi et al., (2013)²³⁷ avaliaram amostras de soro e biópsias gastrintestinais e hepáticas de ratos (n=19), que foram divididos em quatro grupos: obesos; dois modelos de DM2, streptozotocin e Goto-Kakizaki e um grupo controle submetido à cirurgia Sham e avaliados após 1, 2 e 6 meses da DGYR/Sham. O estudo foi direcionado ao metabolismo da glicose, investigado por meio de análises metabolômicas, genômicas e proteômicas, além de testes enzimáticos e de imagem. A melhora do DM2 foi atribuída a alterações metabólicas do trato

gastrointestinal, particularmente da alça alimentar (jejuno), que apresentou mudanças morfológicas de hipertrofia e hiperplasia. Os autores descrevem que houve maior captação de glicose neste segmento e sugerem aumento da glicólise pelo acúmulo de intermediários metabólicos e enzimas glicolíticas. Além disso, os autores consideram o estímulo de vias anabólicas para sustentar as novas demandas energéticas do tecido.

Os autores também propõem estímulo da via pentose fosfato, mas diferente do que foi sugerido que foi a diminuição da atividade do TCA. Divergiu-se, também em relação às alterações das classes lipídicas. Os autores sugerem aumento da captação e biossíntese de colesterol no trato gastrointestinal, mas os achados do presente estudo não demonstram quaisquer alterações nos níveis de colesterol em nenhum dos segmentos estudados. Ademais, observou-se ampla redução de diversas classes lipídicas no presente estudo, sendo estas as alterações mais importantes do trato gastrointestinal. Por outro lado, ao analisar genes e proteínas, foram observadas alterações no citocromo P450 (CYP51A1: família 51, subfamília A, polipeptídeo 1) e SREBP2, o que poderia apoiar as hipóteses sugeridas por esta pesquisadora.

Arora et al., (2015)²³⁸ investigaram amostras de plasma de pacientes obesos com resistência insulínica (n=16, sendo 14 com DM2) e submetidos a DGYR. As amostras analisadas foram coletadas nos pré e no pós-operatórios de 4 e 42 dias, e os pacientes também foram classificados em respondedores e não respondedores, de acordo com os critérios da ADA. Os autores referidos concentraram-se na correlação de metabólitos alterados com variáveis clínicas e na identificação de metabólitos que atuam como biomarcadores preditivos da remissão do DM2. Portanto, o artigo não explora profundamente as alterações metabólicas em si e suas inter-relações, embora forneça ideias sobre os possíveis mecanismos. Corroborando os achados do presente estudo, os autores descrevem o remodelamento do perfil de lipídios, com diminuição de grande parte das classes alteradas, especialmente no pós-operatório de 4 dias. Além disso, o estudo também revela aumento em dois ADC plasmáticos: ácido fumárico e

o ácido málico, sendo o primeiro no pré-operatório e o segundo no pós-operatório de 4 e 42 dias. Embora estes ADC sejam distintos dos alterados na presente pesquisa, é possível que sua alteração esteja associada a padrões alterados de flexibilidade metabólica. Particularmente no pré-operatório, pacientes respondedores apresentaram níveis elevados de metabólitos intermediários do TCA (ácido cítrico, ácido fumárico e ácido acotínico). Os autores associaram isto a falhas nas etapas do TCA, condição tipicamente presente em pacientes com DM2. Isto leva a considerar que talvez o tipo de resistência insulínica dos pacientes respondedores seja relacionada a falhas em etapas do TCA, o que representaria um estresse anaplerótico.

Yu et al. (2015)²³⁹ realizaram análises metabolômicas alvo para investigar AB no soro de pacientes chineses obesos com DM2 submetidos à DGYR (n=38). As amostras foram coletadas nos períodos pré e pós-operatórios de um ano. O maior percentual do ácido quenodesoxicólico sobre o conteúdo total de AB no pré-operatório foi considerado como biomarcador preditivo da remissão do DM2 (critérios ADA). Todavia, os autores não estabeleceram um número exato de referência, que permita avaliar outros pacientes de modo independente. Para confirmar a relação do ácido quenodesoxicólico com o DM2, este AB também foi dosado no soro de pacientes de um estudo transversal independente, que incluiu pacientes eutróficos tolerantes a glicose (n=126), com sobrepeso (n=76), obesos (n=48), sobrepeso com DM2 (n=44) e obesos com DM2 (n=33). O ácido quenodesoxicólico esteve significativamente aumentado em pacientes obesos com DM2 e correlacionou-se positivamente com o IMC, hemoglobina glicada, TG e LDL.

Na presente investigação, também verificou-se aumento do ácido quenodesoxicólico, em suas duas formas conjugadas, no pós-operatório da DGYR e, ao comparar nossos achados com os de Yu et al., foram identificadas divergências. Pela perspectiva da autora deste estudo, a DGYR promove aumento do ácido quenodesoxicólico e esta mudança pode atuar como parte do mecanismo de remissão do DM2. Já na pesquisa de Yu et al.,

este mesmo AB apresenta sua maior concentração no pré-operatório e tende a diminuir conforme a melhora do DM2. Esta inconsistência pode resultar de alguns fatores metodológicos, ao considerar as diferenças no tempo de avaliação, que foi de 3 meses na presente pesquisa e de 1 ano na pesquisa de Yu et al.; da diferença no tratamento estatístico aplicado; bem como o perfil dos pacientes selecionados. Apesar dos autores utilizarem critérios de inclusão similares aos adotados na presente pesquisa e aplicar o mesmo método para classificação da remissão do DM2, não está claro se houve uso de insulina no pré-operatório, o que pode, por si só, representar um viés. Além disso, os autores referidos buscaram identificar biomarcadores preditivos, enquanto o presente estudo visa a compreender os efeitos da cirurgia e seu potencial impacto na melhora do DM2.

Narath et al., (2016)²⁴⁰ investigaram o soro de 44 pacientes obesos (dos quais 24 tinham DM2) submetidos a DGYR nos pré e no pós-operatórios de 1-3 semanas e um ano. Houve remissão de DM2 em nove doentes no pós-operatório. Chama atenção que os autores identificaram apenas 36 dos metabólitos alterados e parte desta identificação foi putativa. Além disso, apesar da proposta de descrever os efeitos da cirurgia em curto e longo prazos, os autores estiveram apenas focados em identificar mudanças em metabólitos previamente associados ao DM2 e doenças cardiovasculares. Dentre as alterações descritas no estudo de Narath et al., os achados do presente estudo apresentam concordância apenas para o aumento de TMAO e variações nos níveis de PC.

Sarosiek et al. (2016)²⁴¹ compararam o perfil metabolômico de amostras de soro de pacientes obesos não diabéticos submetidos à gastrectomia vertical (n=5), com pacientes obesos com DM2 submetidos à gastrectomia vertical (n=5) e obesos com DM2 submetidos à DGYR (n=5). As amostras foram coletadas em três tempos: no pré-operatório, após 14 dias de dieta líquida para emagrecimento (preparatória para cirurgia) e no pós-operatório de 28 dias. Os autores descreveram alteração do heme (fold change 100 vezes aumentado), associado ao aumento de biliverdina no pós-operatório de todos os pacientes. Os autores supõem que estas alterações

observadas atuam para promover a defesa antioxidante e melhoram a sensibilidade insulínica que pode envolver aumento da oxidação do heme. De certa forma, este achado suporta nossa hipótese de hemólise em razão do aumento da urobilina (item 11.3.1.6, subitem 3) e alteração no citocromo P450 (item 11.3.1.7).

Por outro lado, Sarosiek et al. descrevem a diminuição do piruvato e o aumento do ácido fumárico em todos os pacientes com DM2, após as intervenções cirúrgicas bariátricas. A partir destas alterações, os referidos autores sugerem redução da atividade da via glicolítica e maior eficiência mitocondrial. O ácido fumárico é produzido a partir do ácido sucínico e, de maneira indireta, este achado de Sarosiek et al. pode reforçar nossa hipótese da ω oxidação (item 11.3.1.5). Além disso, ao identificar aumento de um produto não fosforilado de um intermediário da via pentose fosfato (xilulose) em todos os grupos após as cirurgias, Sarosiek et al. propõem aumento da via pentose fosfato, anteriormente descrito por Saeidi et al.²³⁷ em seu estudo experimental. Assim, concorda-se com o fato de que as cirurgias parecem afetar o metabolismo da glicose, ao alterar vias glicolíticas e não glicolíticas.

Lopes et al., (2016)²⁴², analisaram amostras de plasma nos pré e pós-operatórios de um ano de 10 pacientes (cinco homens e cinco mulheres) obesos com DM2 submetidos à DGYR. O estudo metabolômico foi realizado por ressonância magnética nuclear e sugere que a melhora do DM2 após a DGYR pode estar relacionada ao aumento do estímulo da secreção dos hormônios GLP-1 e GIP, que levam à diminuição dos níveis de glicose e insulina. Ao realizar aferições para determinar a resposta metabolômica 30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos após o consumo de refeições mistas, os referidos autores consideraram que a chegada de alimentos não digeridos no íleo aumenta o estímulo à secreção desses hormônios, melhorando a glicemia. Os autores descrevem que apesar da absorção de glicose ser mais rápida após DGYR, a quantidade absorvida é menor. Isso pode contribuir para o menor nível de glicose plasmática. De maneira diferente do que se descreveu, Lopes et al. relatam apenas aumento de PC e diminuição de

BCAA e sugerem haver a mobilização de lipídios de tecidos não adiposos, o que levaria à melhora da resistência insulínica. Do ponto de vista metodológico, o desenho do estudo de Lopes et al. é diferente da presente abordagem, ao utilizarem apenas o índice HOMA-IR como critério de remissão de DM2 e a análise metabolômica foi feita por um instrumento de menor sensibilidade.

Luo et al., (2016)²⁴³ analisaram o soro de pacientes obesos com DM2 (n=35) nos pré e pós-operatórios de 6 e 12 meses e classificaram-nos em respondedores e não respondedores, de acordo com os critérios da ADA. Da mesma forma que o presente estudo, os autores observaram alterações em ácidos graxos livres e outras espécies de lipídios, acilcarnitinas, aminoácidos e AB. Estas alterações também foram consideradas discriminatórias entre os grupos após a DGYR. Contudo, as moléculas destas classes de metabólitos não foram exatamente as mesmas encontradas na presente pesquisa. Chama a atenção o comentário de Luo et al. sobre possíveis mudanças no metabolismo do heme em pacientes respondedores, sugeridas a partir do aumento dos níveis de bilirrubina plasmática. Neste caso, também foram identificados indícios de alterações no metabolismo do heme, porém divergiu-se em relação ao grupo de pacientes, ao metabólito alterado e ao desfecho clínico. No presente estudo, o aumento de urobilina plasmática em pacientes não respondedores foi identificado, daí ter sido sugerido um quadro de hemólise.

Em concordância com estas observações, Luo et al. também verificaram mudanças nos níveis de triptofano, GABA, aminoácidos e múltiplas acilcarnitinas. Os autores atribuíram teoricamente estas alterações às mudanças na microbiota intestinal após DGYR, que poderiam influenciar o metabolismo e a sensibilidade insulínica no cérebro, e modular o neurocomportamento.

Zhao L et al., (2017)²⁴⁴ estudaram a razão de produto/precursor de 24 ácidos graxos em uma análise metabolômica-alvo realizada nos pré e pós-operatórios de um ano. Foram utilizadas amostras de plasma de 38

pacientes obesos com DM2 submetidos à DGYR. Destes, 26 pacientes apresentaram remissão do DM2 (critérios ADA). A razão entre os lipídios pré-determinados foi avaliada para identificar alterações na atividade enzimática da elongase, uma enzima que atua no metabolismo endógeno de ácidos graxos que, quando alterada, associa-se ao DM2. Os autores identificaram a razão de ácido esteárico/ácido palmítico ter sido maior no pré-operatório dos pacientes que apresentaram remissão do DM2 e sugeriram esta razão como ferramenta preditiva para avaliação da remissão do DM2. No presente estudo, também foi identificada maior média de concentração destes ácidos graxos no pré-operatório de pacientes respondedores, mas isto não ocorreu de maneira significativa. No pós-operatório de 3 meses, identificou-se que o ácido palmítico esteve discretamente aumentado apenas no grupo respondedor (*fold change* 1,2).

Hubal MJ et al. (2017)²⁴⁵ realizaram análise metabolômica alvo no soro de mulheres obesas (n=6) antes e após um ano do bypass gástrico. Foram investigados metabólitos que se correlacionam com estresse oxidativo e inflamação. Houve aumento de asparagina, citrulina, glutamina, glicina e histidina, e a cisteilglicina, ácido glutâmico, a razão leucina/isoleucina e glicose/glutamina e BCAA apresentaram-se diminuídos. Estas alterações correlacionaram-se positivamente com o índice HOMA-IR. Na presente pesquisa, foram obtidos resultados diferentes e apenas a glicina apresentou-se aumentada no pós-operatório.

Sridharan GV et al., (2017)²⁴⁶ realizaram análises metabolômicas em amostras de fígado de ratos obesos submetidos a DGYR (n=6) e Sham (n=6). As amostras foram coletadas 3 meses após as operações. Foi observado que a DGYR promoveu importante distúrbio no armazenamento e transporte de ferro no fígado, com diminuição dos níveis de ferritina. Os autores associam isto aos quadros de anemia, condição frequentemente decorrente em percentual razoável de pacientes submetidos à DGYR. Pode-se citar que alterações como esta remetem à hipótese de hemólise (item 11.3.1.6, subitem 3 do presente estudo). O metabolismo de AB também esteve alterado, mais especificamente com a redução de subclasses

conjugadas à taurina, alteração que também foi descrita no soro de pacientes submetidos à DGYR⁴⁸. Em contrapartida, os autores discutem que outros estudos demonstraram aumento pós-prandial de classes de AB conjugados à taurina em pacientes submetidos à DGYR⁶⁰ e diferentes modelos de *bypass* gástrico foram associados a alterações no metabolismo de AB, promovendo aumento de subfrações conjugadas²⁴⁷. Na presente pesquisa, foi identificado aumento em subfrações primárias conjugadas a taurina e glicina em pacientes respondedoras. Dado o potencial de ativação dos AB em receptores nucleares e estímulo metabólico em diversos tecidos estas alterações foram consideradas como parte do mecanismo que era a melhora do DM2 (item 11.3.1.4). Contudo, a pesquisa de Sridharan et al. baseia suas conclusões na integração dos dados de metabolômica e proteômica e não discute o potencial metabólico dos AB no contexto da melhora do DM2, após a DGYR.

Serid et al. (2018)²⁴⁸ realizaram análises metabolômicas no plasma de pacientes obesos (n=9) e obesos com DM2 (n=9), ambos submetidos à DGYR. As amostras foram coletadas nos pré e pós-operatórios de 7 e 90 dias. Os dados foram comparados com as análises realizadas em pacientes eutróficos (n=7). De acordo com a análise de componentes principais, as mudanças no perfil metabolômico ocorreram em função da DGYR e foram similares entre obesos com ou sem DM2. A partir do *network* metabólico, os autores relataram a ligação de hexosaminas (manose e glucosamina) com os ADC (ácidos fumárico, sucínico e oxálico). Ao analisar o comportamento destes metabólitos, os autores identificaram a diminuição das hexosaminas nos pacientes com DM2, mas não identificaram alterações significantes nos ADC após a DGYR. Por outro lado, os dados da presente pesquisa revelam aumento significativo de manose, ácido sucínico e ácido oxálico apenas nos pacientes respondedores, enquanto o ácido fumárico esteve aumentado em todas as nossas pacientes. Dado o envolvimento das hexosaminas na resistência insulínica e no desenvolvimento de complicações do DM2, bem como dos ADC no DM2, seria possível supor que Serid et al. não encontraram alterações estatisticamente significantes em razão de suas

comparações não terem envolvido a divisão de pacientes de acordo com a remissão do DM2 e sim comparado com pacientes sem DM2. Ademais, pelo pequeno número de nove pacientes com DM2, esta divisão torna-se inviável. No pós-operatório de 90 dias, os autores também descrevem a possibilidade de alteração na microbiota, ao observarem mudanças em metabólitos produzidos por bactérias intestinais.

Li et al. (2018)²⁴⁹ realizaram análises metabolômicas no plasma de pacientes obesos (n=10) e obesos com DM2 (n=9) submetidos à DGYR. As amostras foram colhidas em quatro momentos: pré e pós-operatórios de 7 dias, 3 meses e 1 ano. Em cada estágio, as amostras foram coletadas em três tempos: em jejum e após 30 e 45 minutos da ingestão de uma dieta líquida-padrão. Os autores sugerem que a melhora do DM2 após a DGYR ocorre por uma via independente da perda de peso, que envolve associações moleculares entre metabólitos e proteínas. Mas, apesar de descreverem um comportamento específico em cada grupo, o formato de apresentação dos dados se dá em gráficos visuais (como a análise de componentes principais) e especificam apenas classes gerais de metabólitos alterados (como aminoácidos por exemplo). Como as alterações moleculares em si não estão especificadas, não foi possível estabelecer relações dos presentes achados com os de Li et al.

Os referidos autores discutem a remissão do DM2, mas não a classificaram adequadamente, ao não considerarem as variáveis clínicas como % de hemoglobina glicada, glicemia de jejum e uso de medicação antidiabética oral, bem como avaliação do grau de resistência insulínica pelo HOMA-IR. Além disso, as conclusões dos autores estão baseadas em comparações com um grupo obeso não diabético e, portanto, não refletem as mudanças da transformação metabólica que poderiam levar à remissão do DM2.

Assim, ao analisar as pesquisas mais relevantes no âmbito da melhora metabólica do DM2 após DGYR, identificou-se que, embora existam

diferenças nos desenhos de estudo, é possível vislumbrar caminhos metabólitos relativamente similares aos descritos no presente estudo.

Isto pode ser descrito de duas formas: pelos metabólitos alterados ou pelas consequências clínicas e metabólicas dessas alterações. Tratando-se de metabólitos, mudanças em ADC, AB, lipídios e metabólitos produzidos pela microbiota foram alvo de investigação, tanto nesta como em outras investigações. Por outro lado, ainda que guiados por outras linhas de evidência, possíveis mudanças no metabolismo do heme, TCA e função mitocondrial também foram brevemente consideradas por outros autores. Apesar disso, estas hipóteses não foram propriamente exploradas e os estudos disponíveis, até onde vai nosso conhecimento, ainda não descrevem um mecanismo que integre todas as alterações observadas. Nesse sentido, o presente estudo propõe uma explicação compreensiva dos mecanismos metabólicos que sublinham os efeitos da DGYR e sua relação com a melhora do DM2.

11.5 Limitações

Para obter estudo em população homogênea, esta pesquisa incluiu apenas pacientes do sexo feminino, assim selecionadas por serem, entre nós, os pacientes de maior frequência para realização de cirurgias bariátricas.

Em razão da falta de disponibilidade e dificuldades técnicas referentes à coleta por enteroscopia de duplo balão, as análises metabolômicas do tecido gástrico e intestinal foram realizadas em apenas nove pacientes, e, destas, foram obtidas oito e cinco amostras nas regiões do duodeno e ECM (estômago excluído), respectivamente. Após a DGYR, há uma modificação importante da anatomia intestinal, limitando o acesso a estes compartimentos, que foram desviados do trato digestivo e do contato com nutrientes. Portanto, este número de amostras refere-se à quantidade de amostras pareadas submetidas à análise.

Ademais, o acúmulo de líquido gástrico e do refluxo biliar duodenogástrico pode promover declínio do estômago excluso e a ocorrência de estenose, em um certo grau, pode causar aumento de aderência de alças intestinais e restringir o acesso do enteroscópio. Além disso, o próprio quadro de obesidade e o excesso de gordura na região abdominal é fator determinante, pois nos períodos de coleta (pré e pós-operatório de 3 meses) as pacientes ainda apresentam peso corporal elevado. Desta forma, manobras complexas foram necessárias para obtenção do material biológico no pós-operatório e, para respeitar a segurança do paciente, se fez necessário a interrupção de alguns procedimentos.

A presente pesquisa faz parte de um estudo temático (FAPESP 2011/09612-3) e grande parte das biópsias coletadas das pacientes desta pesquisa foi destinada a análises genéticas. Diante destes fatores, o número de amostras teciduais foi reduzido, o que impediu estudá-las em grupos de respondedores e não respondedores. Contudo, foram realizadas análises pareadas entre os pré e pós-operatórios para investigar o impacto da DGYR sobre o perfil metabólico gastrointestinal o que, por si, já representa uma contribuição científica inédita.

Em relação ao desenho do estudo, foi reconhecido que a presente investigação reflete alterações da resposta metabólica de um grupo de pacientes doentes. Nesse sentido, apesar da validade científica do estudo, para melhorar a compreensão sobre os eventos metabólicos descritos, ainda se fazem necessárias comparações com um grupo controle composto por obesos não diabéticos submetidos aos mesmos procedimentos e com um grupo de pacientes eutróficos não diabéticos.

Considerando os desafios científicos, foram identificadas limitações técnicas referentes à análise de dados. Para compreender a natureza das transformações induzidas pela DGYR, testes estatísticos foram aplicados para selecionar um conjunto de metabólitos que desempenhassem papel-chave sobre as transformações metabólicas identificadas no pós-operatório.

Estes conjuntos de metabólitos foram submetidos a testes de enriquecimento de vias metabólicas, considerados *layouts* estáticos de reações metabólicas dinâmicas, sendo utilizadas como referência para representação geral de metabólitos que interagem entre si. Contudo, o número de metabólitos em organismos multicelulares ainda não é conhecido, parcialmente pela ambiguidade de enzimas e, certamente, pelo fato de que a química da vida também envolve relações simbióticas com o microbioma¹⁰¹.

Além disso, em razão da baixa abundância ou pelas restrições químicas ou biológicas, análises metabolômicas não abrangem todos os intermediários conhecidos, o que faz com que diversos metabólitos apareçam em múltiplas vias e, assim, contribuam para o teste de significância estatística múltiplas vezes, distorcendo a interpretação biológica. Ademais, observou-se que nem todos os metabólitos selecionados pela análise VIP apresentaram significância estatística. Isso demonstra que, apesar do poder discriminatório desta análise, é necessário conhecer o comportamento das variáveis em todas amostras, a fim de evitar interpretações biológicas equivocadas.

Diante disso, para otimizar e atender aos objetivos da presente investigação, foi utilizada a estrutura molecular em si e a formação de alterações de agrupamentos de classes, por meio do teste de enriquecimento pela similaridade química. No que diz respeito a enriquecimento estatístico, as ontologias e agrupamentos de classes químicas apresentam duas vantagens principais em relação à definição de vias metabólicas. Primeiramente, quase todo metabólito pode ser identificado como pertencente a uma classe química, mesmo em mapas com base na atividade enzimática. Adicionalmente, as definições de classes podem ser organizadas de modo que todo metabólito pertencerá a apenas uma classe, não havendo sobreposições de definição para enriquecimento por ferramentas computacionais. Esta abordagem destaca classes químicas significativamente alteradas no estudo, permitindo a interpretação dos dados no nível de processos bioquímicos⁹⁸.

Apesar das análises de enriquecimento de vias constituírem recursos muito utilizados em estudos de metabolômica, suas delimitações artificiais entre vias podem não refletir mecanismos biológicos²⁵⁰. Além disso, um amplo número de metabólitos ainda não foi identificado como parte de vias metabólicas e estes testes dependem da extensão da base de dados utilizada, que também é um fator limitante da análise de enriquecimento de vias²⁵¹.

Por outro lado, os pontos fortes da pesquisa consistiram em análises em larga escala realizadas por uma abordagem multicompartimental, cujo espectro dos metabólitos gerados representa metabólitos do metabolismo primário, lipídios complexos e moléculas polares, em uma coorte de pacientes fenotipicamente similares. Estas análises nos deram acesso a informações biológicas clinicamente relevantes e inéditas, que proporcionaram uma visão única dos mecanismos metabólicos induzidos pela DGYR.

12 Conclusão

12 CONCLUSÃO

Nas condições da presente pesquisa, pôde-se concluir que a DGYR promoveu, precocemente, mudanças importantes no perfil metabólico do plasma, urina e do trato gastrointestinal de mulheres obesas portadoras de DM2.

Em nível plasmático, os metabólitos mais alterados foram ADC, ácido hidroxibutírico, urobilina, SM, TG e PC. Na urina, estiveram mais alterados p-tolil-glucuronido, glicose, e ácido aloxanoico. O contraste do perfil metabólico destas amostras sistêmicas permitiu distinguir pacientes respondedoras e não respondedoras à remissão do DM2. Os ácidos sucínico, aloxanoico, glicoquenodesoxicólico, tauroquenodesoxicólico e hidroxibutírico, bem como trans-crotobetaína e TMAO foram moléculas discriminatórias nas pacientes respondedoras; enquanto os ácidos litocólico e úrico, piperidona e urobilina foram moléculas discriminatórias nas pacientes não respondedoras.

No trato gastrointestinal, a DGYR modificou o perfil metabólico em todos os segmentos estudados, exceto ECM. As classes lipídicas TG, SM, PE, PC, LPC e Cer alteraram-se em todas as regiões anatômicas. Ademais, foram observadas alterações de aminoácidos no ECA; ácido linolênico no duodeno; Cer, galactosilglicerol, ribose, adenosina difosfato ribose, 1,5 anidroglicitol e ácido sucínico no jejuno; carnosina, dipeptídeos, galactinol e ácido aminoaléico no íleo. Estas alterações remetem a um remodelamento do metabolismo da mucosa intestinal, embora não possibilitem conclusões relevantes sobre a melhora do DM2 em nível gastrointestinal.

Corolário

Estes dados permitem sugerir que a remissão do DM2 inclui ativação do receptor nuclear FXR por AB e, com isso, ocorre a melhora no metabolismo energético, lipídico e de carboidratos; e que o aumento de ADC resulta da oxidação, que melhora a flexibilidade metabólica e o estresse

anaplerótico do DM2. Por outro lado, a não remissão do DM2 parece estar associada à depressão da função renal, que influencia rotas alternativas de oxidação de lipídios e leva ao acúmulo de toxinas urêmicas, modificando o metabolismo do colesterol e dos AB.

13 Anexos

13 ANEXOS

13.1 ANEXO A – Parecer da comissão de ética e pesquisa

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

Versão: 1

Pesquisador Executante: Priscila Campos Sala

CAAE: 19339913.0.0000.0068

Finalidade Acadêmica: Mestrado

Instituição: HCFMUSP

Departamento: GASTROENTEROLOGIA

NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Outros

Detalhe: Desmembramento de projeto

Justificativa: Solicitamos autorização para que o projeto supracitado, já APROVADO pela CAPPesq, seja desmembrado em subprojeto de nova pesquisa, para fins de tese de doutorado, tendo como orientador responsável: Prof. Dan Linetzky Waitzberg e a pesquisadora executante: Natasha Mendonça Machado. A nova pesquisa será intitulada: "ANÁLISE DO PERFIL METABOLÔMICO DE PACIENTES OBESOS PORTADORES DE DIABETES MELITO TIPO 2 APÓS GASTROPLASTIA REDUTORA A Y DE ROUX". O Termo de Consentimento será mantido como originalmente.

Data do envio: 07/05/2014

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 4241

Número do Parecer: 675.029

Data da Relatoria: 04/06/14

Apresentação da Notificação: Trata-se de projeto envolvendo 20 pacientes obesos e diabéticos, submetidos à gastroplastia. A notificação informa que o subprojeto intitulado "ANÁLISE DO PERFIL METABOLÔMICO DE PACIENTES OBESOS PORTADORES DE DIABETES MELITO TIPO 2 APÓS GASTROPLASTIA REDUTORA A Y-ROUX", será tese de doutorado da aluna Natasha Mendonça Machado tendo como orientador o Prof. Dr. Dan Linetzky Waitzberg.

13.2 ANEXO B – 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 "QUANTIFICAÇÃO CELULAR E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DA MUCOSA GASTROINTESTINAL APÓS GASTROPLASTIA REDUTORA EM Y DE ROUX."

PESQUISADOR: Natasha Mendonça Machado

CARGO/FUNÇÃO: Nutricionista

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº CRN 30.006

UNIDADE DO HCFMUSP: CIRURGIA DO APARELHO DIGESTIVO

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☐ RISCO MÉDIO ☒ X
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 o funcionamento do seu organismo, e se essa possível melhora tem relação com a modificação de células presentes no seu estômago e intestino. A resposta a estas perguntas pode contribuir para o tratamento de pacientes obesos, 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: será realizado um exame de enteroscopias de duplo balão e o período de realização do exame varia de acordo com o grupo que você se encaixa, sendo pré-operatório, 2 anos ou 5 anos após a 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 enteroscopias serão feitas para coleta de pequenos fragmentos (aproximadamente 3 milímetros) de tecido gástrico e intestinal, para análise da composição celular. 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, você terá um acompanhamento nutricional e realizará exames de avaliação nutricional para verificar a sua composição corporal, gasto energético e consumo alimentar. 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 "lufal" para romper as bolhas de ar e "buscopan" para

eventuais cólicas. Durante a enteroscopia, a sedação utilizada será monitorada por um anestesista que utiliza sedativos e anestésicos de curta ação, que 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: Natasha Mendonça Machado – 3061-7459/ 96147-2505 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 "QUANTIFICAÇÃO CELULAR E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DA MUCOSA GASTROINTESTINAL APÓS GASTROPLASTIA REDUTORA EM Y DE 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

13.3 ANEXO C – Protocolo para preparo de amostras

13.3.1 LC-MS

*Extração de metabólitos – Integrado (urina, plasma e tecido gastrintestinal)

1. Descongele a alíquota da amostra no gelo
2. Adicione 225ul de MeOH gelado purificado com N₂ + mix de QC
3. Vortexar 10s
4. Adicionar 750ul de éter metil-tert-butílico (MTBE) gelado com 22:1 éster de colesterol (CE)
5. **APENAS em amostras de tecido: Adicionar 3 esferas de metal (bead de 3mm) esterilizadas e homogeneizar no Genogrinder por 30s**
6. Vortexar 10s
7. Adicionar 200ul de água miliQ
8. Homogeneizar em agitador orbital durante 6min em 4°C
9. Vortexar 20s e centrifugar durante 2min em 1400 rcf
10. Transferir o sobrenadante (fase apolar) para micro eppendorfs (300ul).
11. Transferir o restante do conteúdo (fase polar) para micro eppendorfs (120ul)
12. Secar as amostras com extrações apolares (para CSH) e polares (para HILIC) em *speedvac*
13. Armazenar os tubos remanescentes (*backup*) em -20°C

Reconstrução para LC-MS (CSH):

1. Adicionar 110ul de MeOH:Tol 1:10 + 50mg/ml de 12-
[[cyclohexylamino)carbonyl]amino-dodecanoic acid (CUDA)
2. Vortexar por 20s
3. Sonicar durante 5min em temperatura ambiente
4. Centrifugar durante 2min em 1400 rcf
5. Transferir 100ul para microtubos de vidro âmbar com *microsert*

Reconstrução para HILIC:

1. Adicionar 60ul de ACN:H₂O (80:20) contendo 50mg/ml de ácido glutâmico n-metil
2. Vortexar durante 20s
3. Sonicar durante 5 min em temperatura ambiente
4. Centrifugar durante 2min em 1.400 rcf
5. Transferir 55ul para microtubos de vidro âmbar com *microsert*.

Composição do mix de QC para CSH UPLC/MS:

Nome do analito	Fórmula	MS1 m/z	RT (min)
CE (22:1) [M+Na] ⁺ iSTD	C ₄₉ H ₈₆ O ₂	729.652	11.727
CE (22:1) [M+NH ₄] ⁺ iSTD	C ₄₉ H ₈₆ O ₂	724.6966	11.727
Ceramida C17 [M+H] ⁺ iSTD	C ₃₅ H ₆₉ NO ₃	552.535	5.948
Ceramida C17 [M+H-H ₂ O] ⁺ iSTD	C ₃₅ H ₆₉ NO ₃	534.5245	5.948
Ceramida C17 [M+Na] ⁺ iSTD	C ₃₅ H ₆₉ NO ₃	574.517	5.948
Colesterol d7 [M-H ₂ O+H] ⁺ iSTD	C ₂₇ H ₃₉ D ₇ O	376.3955	4.787
CUDA (pos) iSTD [M+H] ⁺	C ₁₉ H ₃₆ N ₂ O ₃	341.2799	0.774
DG (12:0/12:0/0:0) [M+Na] ⁺ iSTD	C ₂₇ H ₅₂ O ₅	479.3707	4.248
DG (12:0/12:0/0:0) [M+NH ₄] ⁺ iSTD	C ₂₇ H ₅₂ O ₅	474.4153	4.248
DG (18:1/2:0/0:0) [M+Na] ⁺ iSTD	C ₂₃ H ₄₂ O ₅	421.2925	3.162
DG (18:1/2:0/0:0) [M+NH ₄] ⁺ iSTD	C ₂₃ H ₄₂ O ₅	416.3371	3.162
LPC (17:0) [M+H] ⁺ iSTD	C ₂₅ H ₅₂ NO ₇ P	510.3554	1.827
LPE (17:1) [M+H] ⁺ iSTD	C ₂₂ H ₄₄ NO ₇ P	466.2928	1.346
MG (17:0/0:0/0:0) [M+H] ⁺ iSTD	C ₂₀ H ₄₀ O ₄	345.2999	3.038
MG (17:0/0:0/0:0) [M+Na] ⁺ iSTD	C ₂₀ H ₄₀ O ₄	367.2819	3.038
MG (17:0/0:0/0:0) [M+NH ₄] ⁺ iSTD	C ₂₀ H ₄₀ O ₄	362.3265	3.038
PC (12:0/13:0) [M+H] ⁺ iSTD	C ₃₃ H ₆₆ NO ₈ P	636.4596	3.502
PE (17:0/17:0) [M+H] ⁺ iSTD	C ₃₉ H ₇₈ NO ₈ P	720.5538	6.263
SM (17:0) [M+H] ⁺ iSTD	C ₄₀ H ₈₁ N ₂ O ₆ P	717.5915	5.053
Esfingosina (d17:1) [M+H] ⁺ iSTD	C ₁₇ H ₃₅ NO ₂	286.2741	1.04
TG (17:0/17:1/17:0) [M+Na] ⁺ d5 iSTD	C ₅₄ H ₉₇ D ₅ O ₆	874.7877	10.997
TG (17:0/17:1/17:0) [M+NH ₄] ⁺ d5 iSTD	C ₅₄ H ₉₇ D ₅ O ₆	869.8323	11.006

CUDA: (12-[[cyclohexylamino]carbonyl]amino-dodecanoic acid) from Cayman Chemical Item, number 10007923.

13.3.2 GC-MS

*Extração de metabólitos – urina, plasma e tecido gastrintestinal

1. Descongele a amostra em gelo
2. Adicione 1ml de acetonitrila, isopropanol e água (3:3:2)
3. Vortexar as amostras durante 10s e aliquotar as amostras em eppendorfs identificados (manter as amostras em gelo)
14. **APENAS para o tecido:** Adicionar 3 esferas de metal (*bead* de 3mm) esterilizadas e homogeneizar no *Genogrinder* por 30s
4. Vortexar durante 10s
5. Homogeneizar em agitador orbital durante 5 min em 4°C
6. Centrifugar durante 2min em 1400rcf
7. Aliquotar 2x 500ul do sobrenadante (amostra e *back up*) – *back up* deve ser armazenado em -20°C
8. Secar 500ul da amostra em *speedvac*

Reconstituição para GC- MS - Derivatização:

1. Adicionar 10ul de 40mg/dl MeOX nas amostras secas
2. Homogeneizar em agitador orbital em velocidade máxima durante 1:30h em 30°C
3. Adicionar 91ul de MSTFA + FAMES
4. Homogeneizar em agitador orbital durante 30min em 37°C
5. Centrifugar durante 2min em 1400rcf
6. Transferir o conteúdo para microtubo de vidro com *microsert* de GC e vedar imediatamente utilizando lacres de alumínio com septo de borracha (*top crimp cap*)

MSTFA: N-Metil-N- (trimetilsilil) trifluoroacetamida

FAMES: Éster metílico de ácido graxo

Padrões químicos da curva de calibração de seis pontos

Nível 1: 50 ul do mix de QC (10ug/ml) => 5ug/ml

Nível 2: 25 ul do mix de QC (10ug/ml) => 2.5ug/ml

Nível 3: 10 ul do mix de QC (10ug/ml) => 1ug/ml

Nível 4: 5 ul do mix de QC (10ug/ml) => 0.5ug/ml

Nível 5: 2.5 ul do mix de QC (10ug/ml) => 0.25ug/ml

Nível 6: 1ul do mix de QC (10ug/ml) => 0.1 ug/ml

Lista de compostos no mix do Controle de qualidade (QC)

Composto	RT (s)	Solvente	Peso (mg)
Piruvato	6.74	água	10.00
I-alanina	7.53	água	10.00
I-valina	9.16	água	10.00
I-serina	9.74	água	10.00
Ácido nicotínico	10.258	água	10.00
Ácido succínico	10.52	água	10.00
Metionina	11.82	água	20.00
Ácido aspártico	12	água	20.00
4-hidroxiprolina	12.62	água	10.00
Ácido salicílico	13.089	água	10.00
Ácido l-glutâmico	13.37	água	10.00
Creatinina	13.66	água	10.00
Ácido cetoglutárico	13.86	água	10.00
Ácido n-acetil-l-aspártico	14.8	água	10.00
I-asparagina	14.97	água	10.00
Putrescina	15.77	água	10.00
Ácido shikímico	16.493	água	10.00
Ácido cítrico	16.63	água	10.00
I-lisina	16.975	água	10.00
d-(+)-glicose	17.47	água	10.00
Ácido esteárico d35	20.45	clorofórmio	10.00
d-glicose-6-fosfato	21.381	água	10.00
Ácido araquídico	22.364	clorofórmio	10.00
Serotonina	22.51	metanol	10.00
Adenosina	23.862	água	10.00
Sucrose	23.95	água	10.00
Ácido clorogênico	26.39	metanol	10.00
Tocoferol alfa	27.397	clorofórmio	10.00
Colesterol	27.528	clorofórmio	10.00

13.3.3 Preparo de amostras para análise de AB

1. Descongelar 50ul de plasma em gelo
2. Adicionar 200ul de acetonitrila e metanol (1:1)
3. Adicionar 29.2µl de padrões internos de AB, incluindo 7 espécies modificadas com deutério: ácido glicocólico-d4, ácido tauroquenodeoxicolico-d4, ácido cólico-d4, ácido glicoquenodeoxicolico-d4, ácido quenodeoxicolico-d4, ácido deoxicolico e ácido litocólico, todos na concentração de 1000nM
4. Adicionar 5 µl de antioxidantes (0,2 mg/ml de hidroxitolueno butilado/ EDTA) diluído com metanol e água (1:1)
5. Adicionar 25 µl de coquetel de padrões a 1000 nM
6. Centrifugar durante 5min a 1.500 rcf em 6°C
7. Filtrar o sobrenadante em placa de 96 *wells* (*PVDF plate*)

Foram utilizados 25 µl de CUDA e Ácido 1-Phenyl 3 - Hexadecanóico (PHAU) a 100nM como padrões externos.

13.4 ANEXO D – Análise discriminante parcial por mínimos quadrados (PLS DA) do plasma da análise global

Análise discriminante parcial por mínimos quadrados (PLS DA) do plasma da análise global. Score plots baseados nas séries (a) GC-MS; (b) HILIC-MS; (c) CSH-MS modo positivo; and (d) CSH-MS modo negativo. Amostras obtidas no pré-operatório (pre_, círculos vermelhos) e 3 meses após a cirurgia (post_, círculos verdes).

13.5 ANEXO E – Análise discriminante parcial por mínimos quadrados (PLS DA) da urina da análise global

Análise discriminante parcial por mínimos quadrados (PLS DA) de urina da análise global. Score plots baseados nas séries (a) GC-MS; (b) HILIC-MS. Amostras obtidas no pré-operatório (pre_, círculos vermelhos) e 3 meses após a cirurgia (post_, círculos verdes).

13.6 ANEXO F – Análise discriminante parcial por mínimos quadrados (PLS DA) das biópsias do trato gastrointestinal

Análise discriminante parcial por mínimos quadrados (PLS DA) das biópsias do trato gastrointestinal. Score plots baseados nas séries (a) estômago corpo alto (ECA), (b) estômago corpo médio (ECM), (c) duodeno, (d) jejuno e (e) íleo. Conjunto de dados em (1) GC-MS, (2) HILIC-MS, CSH-MS no modo de ionização positivo (3) e negativo (4). Amostras obtidas no pré-operatório (pre_ em círculos vermelhos) e 3 meses após a cirurgia (post_ círculos verdes).

13.7 ANEXO G – Tabela de distribuição de agrupamentos químicos de acordo com o tipo de amostra

Cluster name	Plasma	Urina	ECA	Duodeno	Jejuno	Íleo
Amino Acids	X	X	X	X	X	X
Amino Acids, Basic	X	X	X	X	X	X
Butyrates	X	X	X	X	X	X
Hydroxybutyrates	X	X				
Carnitine	X	X	X	X	X	X
Dicarboxylic Acids	X	X	X	X	X	X
Indoles	X	X	X	X	X	X
Hexoses	X	X	X	X	X	X
Saturated FA	X	X	X	X	X	X
Sugar Alcohols	X	X	X	X	X	X
Glutamates	X	X				
Purinones	X	X				
Ethanolamines	X	X	X	X	X	X
Ceramides	X					
Diglycerides	X					
Imino Acids	X					
Amino Acids, Aromatic	X	X	X	X	X	X
Amino Acids, Branched-Chain	X	X	X	X	X	X
Amino Acids, Sulfur	X	X	X	X	X	X
Disaccharides	X	X	X	X	X	X
Adenine Nucleotides			X	X	X	X
Adenosine		X	X	X	X	X
Amino Acids, Acidic			X	X	X	X
Amino Acids, Cyclic		X	X	X	X	X
Amino Acids, Neutral			X			
Amino Alcohols			X	X	X	X
Azoles			X	X	X	X
Benzene Derivatives			X	X	X	X
Biogenic Monoamines			X	X	X	X
Cinnamates		X				
Cyclohexanes		X				
Dipeptides		X	X	X	X	X
Galactosylceramides	X		X	X	X	X
Glutarates		X				
Glucosephosphates			X	X	X	X
Glycerides			X	X	X	X
Hippurates		X				
Imidazoles		X				
Keto Acids	X					
Malates		X				
Phosphatidylethanolamines	X		X	X	X	X
Piperidines	X					
Pentoses		X				
Phenols		X				
Phosphatidylserines			X	X	X	X
Phenylacetates		X				
Plasmalogens	X		X	X	X	X
Purine Nucleosides		X	X	X	X	X
Pyrimidine Nucleosides			X	X	X	X
Pyrimidinones	X	X				
Lysophosphatidylcholines			X	X	X	X
Oligopeptides			X	X	X	X
Peptides			X	X	X	X
Saturated_Lysophosphatidylcholines	X					
Saturated_Phosphatidylcholines	X		X	X	X	X
Saturated_Phospholipid Ethers	X					
Saturated_Ceramides			X	X	X	X
Saturated_Laurates						X
Saturated_Triglycerides			X	X	X	X
Sphingomyelins	X		X	X	X	X
Sugar Acids	X	X	X	X	X	X
Triglycerides	X					
UnSaturated FA	X		X	X	X	X
Unsaturated_Lysophosphatidylcholines	X					
Unsaturated_Phosphatidylcholines	X		X	X	X	X
Tricarboxylic Acids		X				
Unsaturated_Ceramides			X	X	X	X
Unsaturated_Triglycerides			X	X	X	X
Unsaturated_Laurates						X
Uridine Diphosphate Sugars			X	X	X	X
Xanthines			X	X	X	X
Alkanes			X	X		X

Legenda: A presença do agrupamento químico é representada por X; células preenchidas representam impacto significativo

13.8 ANEXO H – Tabela de descrição de metabólitos com alterações estatisticamente significantes no plasma

Metabólito	p valor	FC	M	Metabólito	p valor	FC	M
Homoserine	0.019	1.3	↓	Benzoic acid	0.000	1.26	↑
Tryptophan	0.014	1.9	↓	Urobilin	0.007	5.28	↑
2-Amino-1-phenylethanol	0.000	1.2	↓	Isothreonic acid	0.000	1.42	↑
4-Nitrobenzylamine	0.001	1.5	↓	Threonic acid	0.000	2.49	↑
AC (C3:0)	0.001	1.4	↓	AC (C18:2)	0.042	1.18	↑
Cer (d18:1/23:0)	0.000	2.4	↓	AC (C16:0)	0.011	1.23	↑
Cer (d42:1)	0.000	1.6	↓	AC (C2:0)	0.000	1.27	↑
1-Stearoyl-2-linoleoyl-sn-glycerol	0.000	1.7	↓	AC (C8:0)	0.046	1.28	↑
Octadecenoic acid	0.000	2.4	↓	AC (C18:1)	0.001	1.32	↑
Choline	0.000	1.3	↓	Cer (d42:2)	0.000	1.73	↑
Creatine	0.000	1.3	↓	CE (18:1)	0.013	1.13	↑
Glucose	0.000	1.6	↓	Citric acid	0.000	1.68	↑
Glucose-1-phosphate	0.000	1.4	↓	Succinic acid	0.029	1.19	↑
2-hydroxybutanoic acid	0.032	1.3	↓	Malic acid	0.002	1.29	↑
Indole-3-lactic acid	0.001	1.2	↓	Oxalic acid	0.002	1.48	↑
Indole-3-lactate	0.032	1.2	↓	Fumaric acid	0.000	1.57	↑
SM (d32:0)	0.019	1.3	↓	Aminomalonate	0.000	2.02	↑
Anthranilic acid	0.002	1.7	↓	Ethanolamine	0.000	1.26	↑
PE (p-36:2)	0.000	2.0	↓	GlcCer (d42:2)	0.000	1.84	↑
PE (p-34:2)	0.000	1.9	↓	4-acetamidobutyric acid	0.019	1.17	↑
Plasmenyl-PE (36:2)	0.001	1.9	↓	n-acetylglutamate	0.000	1.79	↑
PE (36:2)	0.000	1.8	↓	Glycolic acid	0.011	1.39	↑
PE (34:2)	0.006	1.5	↓	Oxamic acid	0.001	1.52	↑
PE (p-40:5)	0.003	1.4	↓	Hexose	0.042	1.13	↑
PE (38:2)	0.000	1.3	↓	Fucose	0.026	1.29	↑
PE (p-36:5)	0.000	2.0	↓	Parabanic acid	0.018	1.49	↑
PE (p-40:6)	0.016	1.2	↓	2-deoxytetronic acid	0.000	1.55	↑
Theophylline	0.005	1.8	↓	3-hydroxybutyric acid	0.000	5.24	↑
LPC (14:0)	0.000	2.3	↓	Alloxanoic acid	0.000	1.70	↑
LPC (15:0)	0.002	1.2	↓	Trans-4-hydroxyproline	0.024	1.61	↑
PC (28:0)	0.000	2.9	↓	Hydroxyproline dipeptide	0.000	2.51	↑
PC (30:0)	0.000	2.4	↓	N-acetyl-5-hydroxytryptamine	0.001	1.34	↑
Acetyl-glycero-phosphocholine	0.001	1.3	↓	Indole-3-acetate	0.002	1.83	↑
SM (d41:1)	0.000	1.9	↓	Isocitric acid	0.007	1.33	↑
SM (d42:2) B	0.000	1.8	↓	Alpha-ketoglutarate	0.010	1.23	↑
SM (d41:2)	0.000	1.7	↓	LPC (p-18:0)	0.003	1.25	↑
SM (d39:1)	0.000	1.7	↓	LPC (p-16:0)	0.000	1.39	↑
SM (d30:1)	0.000	1.6	↓	Trimethylamine N-oxide	0.000	2.49	↑
SM (d42:1)	0.000	1.4	↓	SM (d34:0)	0.009	1.28	↑
SM (d32:1)	0.000	1.4	↓	SM (d36:0)	0.002	1.80	↑
SM (d32:2)	0.000	1.4	↓	Nicotinic acid	0.001	1.56	↑
SM (d40:1)	0.002	1.3	↓	Urea	0.000	1.38	↑
SM (d40:2) B	0.000	1.3	↓	Methanolphosphate	0.016	1.34	↑
SM (d38:1)	0.013	1.2	↓	Xylose	0.000	1.42	↑
Gluconic acid lactone	0.001	1.3	↓	Isoribose	0.001	1.82	↑
Tocopherol gamma	0.018	1.4	↓	Phenol	0.000	1.80	↑

continua

13.8 ANEXO H – Tabela de descrição de metabólitos com alterações estatisticamente significantes no plasma (conclusão)

Metabólito	p valor	FC	M	Metabólito	p valor	FC	M
TG (44:0)	0.000	10.1	↓	PC (p-32:0)	0.000	1.35	↑
TG (46:0)	0.000	7.9	↓	Phosphate	0.000	1.69	↑
TG (44:1)	0.000	6.4	↓	Propane-1,3-diol	0.000	1.39	↑
TG (46:2)	0.000	4.8	↓	hypoxanthine	0.024	1.24	↑
TG (51:1)	0.000	2.7	↓	Uric acid	0.005	1.27	↑
TG (48:3)	0.000	2.6	↓	Pyroglutamic acid	0.000	1.18	↑
TG (50:5)	0.006	2.1	↓	Oxoproline	0.000	1.51	↑
TG (50:4)	0.007	1.7	↓	Tocopherol alpha-	0.003	1.17	↑
TG (50:2)	0.000	1.6	↓	Palmitic acid	0.004	1.18	↑
LPC (18:3)	0.000	2.3	↓	Pelargonic acid	0.000	1.26	↑
LPC (20:5)	0.000	2.2	↓	PC (32:0)	0.035	1.10	↑
LPC (20:3)	0.000	1.7	↓	SM (d38:2)	0.000	1.16	↑
LPC (16:1)	0.000	1.5	↓	SM (d34:1)	0.007	1.24	↑
LPC (18:2)	0.004	1.3	↓	SM (d36:2)	0.024	1.44	↑
LPC (20:2)	0.029	1.2	↓	SM (d42:2) A	0.000	1.61	↑
PC (30:1)	0.000	3.2	↓	SM (d42:3)	0.000	1.69	↑
PC (p-38:2)	0.000	2.6	↓	SM (d43:2) A	0.000	1.80	↑
PC (34:4)	0.000	2.6	↓	SM (41:2)	0.000	3.32	↑
PC (32:2)	0.000	2.4	↓	Glyceric acid	0.000	1.69	↑
PC (38:3)	0.000	2.2	↓	Lyxitol	0.019	1.17	↑
PC (36:6)	0.000	2.1	↓	Arabitol	0.009	1.19	↑
PC (32:1)	0.000	2.0	↓	Xylitol	0.014	1.40	↑
PC (36:5) B	0.000	1.9	↓	Isothreitol	0.001	1.42	↑
PC (37:2)	0.000	1.8	↓	Hexitol	0.000	1.43	↑
PC (p-40:5)	0.001	1.8	↓	Myo-inositol	0.000	1.45	↑
PC (35:3)	0.000	1.7	↓	TG (54:4)	0.016	1.25	↑
PC (38:2)	0.000	1.7	↓	Carnitine	0.002	1.14	↑
PC (33:2)	0.000	1.6	↓	Nervonic acid	0.014	1.26	↑
PC (33:1)	0.000	1.6	↓	Arachidonic acid	0.013	1.33	↑
PC (40:5) B	0.000	1.6	↓	Linoleic acid	0.003	1.40	↑
PC (36:4) A	0.001	1.5	↓	Oleic acid	0.001	1.46	↑
PC (34:3)	0.001	1.4	↓	Docosahexaenoic acid	0.000	1.51	↑
PC (36:2)	0.000	1.4	↓	LPC (20:1)	0.004	1.25	↑
PC (36:1)	0.000	1.4	↓	PC (38:5) A	0.000	1.19	↑
PC (35:1)	0.006	1.3	↓	PC (p-40:4)	0.003	1.22	↑
PC (40:4)	0.001	1.3	↓	PC (38:6)	0.001	1.23	↑
PC (36:3) A	0.001	1.3	↓	PC (p-34:2)	0.000	1.26	↑
PC (p-40:6)	0.018	1.2	↓	PC (p-36:4)	0.000	1.45	↑
PC (40:5) A	0.002	1.2	↓	PC (p-44:4)	0.000	1.48	↑
PC (40:8)	0.011	1.2	↓	PC (p-42:4)	0.000	1.52	↑
PC (35:2)	0.013	1.1	↓	SM (d36:1)	0.000	1.54	↑
PC (35:4)	0.009	1.1	↓	PC (p-38:4)	0.001	1.64	↑
PC (34:2)	0.002	1.1	↓	PC (p-34:1)	0.000	2.00	↑
PC (p-38:3)	0.032	1.1	↓	Pseudo uridine	0.000	1.69	↑
Glycine	0.000	1.77	↑	Hydroxylamine	0.001	1.27	↑
Serine	0.000	1.92	↑	Hydroxycarbamate	0.001	1.32	↑
Arginine	0.004	1.15	↑	FA (22:4)	0.011	1.38	↑
N,N-dimethylarginine	0.000	1.53	↑	2-piperidino benzonitrile	0.032	1.38	↑

Legenda: FC, fold change; M, sentido da mudança: diminuído (↓) ou aumentado (↑)

13.9 ANEXO I – Tabela de descrição de metabólitos com alterações estatisticamente significantes na urina

Metabólito	p valor	FC	M	Metabólito	p valor	FC	M
glucose 2	0.00	27.03	↓	methylmaleic acid	0.03	1.08	↑
Creatine	0.00	3.37	↓	adenine	0.04	1.14	↑
fructose	0.00	2.52	↓	lauric acid	0.05	1.14	↑
L-alanine	0.00	2.26	↓	Urea	0.01	1.14	↑
trehalose	0.00	2.24	↓	lyxitol	0.02	1.17	↑
heptadecanoic acid	0.00	2.08	↓	xanthosine	0.01	1.20	↑
stearic acid	0.01	1.84	↓	erythritol	0.00	1.23	↑
glycerol-3-galactoside	0.02	1.81	↓	xylonic acid	0.02	1.25	↑
hydroxylamine	0.01	1.80	↓	xylitol	0.02	1.26	↑
palmitic acid	0.03	1.74	↓	1-methylinosine NIST	0.01	1.26	↑
glucose-6-phosphate	0.00	1.72	↓	xanthine	0.00	1.27	↑
N-carbamylglutamate	0.04	1.67	↓	lyxose	0.01	1.27	↑
indole-3-lactate	0.00	1.65	↓	2-deoxytetronic acid	0.03	1.29	↑
valine	0.01	1.56	↓	glutamine	0.02	1.30	↑
tryptophan	0.02	1.47	↓	xylose	0.01	1.30	↑
lactic acid	0.01	1.46	↓	isothreonic acid	0.00	1.34	↑
tyrosine	0.00	1.41	↓	hypoxanthine	0.01	1.35	↑
Choline	0.00	1.32	↓	aconitic acid	0.00	1.36	↑
maltose 1	0.02	1.31	↓	hexaric acid	0.00	1.37	↑
citramalic acid	0.02	1.25	↓	4-aminophenol B	0.03	1.38	↑
Acylcarnitine (C6:0)	0.00	1.68	↑	4-methylcatechol	0.03	1.40	↑
tagatose	0.01	1.69	↑	ribose	0.00	1.42	↑
2-hydroxyglutaric acid	0.00	1.76	↑	Acylcarnitine (C8:1)	0.01	1.44	↑
4-hydroxyphenylacetic acid	0.00	1.76	↑	threitol	0.00	1.46	↑
threonic acid	0.00	1.84	↑	Acylcarnitine (C10:1)	0.00	1.47	↑
N-acetyl-L-histidine	0.00	1.84	↑	N-acetylaspartic acid	0.00	1.47	↑
adipic acid	0.00	1.85	↑	fucose 1	0.00	1.48	↑
citric acid	0.00	1.90	↑	hexitol	0.00	1.48	↑
N1,N12-Diacetylspermine	0.00	1.92	↑	3-hydroxy-3-methylglutaric acid	0.00	1.48	↑
3-aminoisobutyric acid	0.01	1.93	↑	Acylcarnitine (C4:0)	0.05	1.49	↑
4-acetamidobutyric acid	0.00	1.94	↑	pseudo uridine	0.00	1.50	↑
4-hydroxyhippuric acid NIST	0.00	1.99	↑	indole-3-acetate	0.01	1.50	↑
Acylcarnitine (C10:0)	0.00	2.00	↑	N,N-dimethylarginine	0.00	1.51	↑
N-.alpha.-Acetyl-L-arginine	0.00	2.09	↑	isoribose	0.03	1.51	↑
glutamic acid	0.00	2.13	↑	1-methyladenosine	0.00	1.52	↑
galactonic acid	0.01	2.18	↑	trans-Crotonobetaine	0.02	1.52	↑
Hippuric acid	0.00	2.25	↑	ornithine	0.00	1.53	↑
benzylalcohol	0.00	2.35	↑	citrulline	0.00	1.54	↑
indoxyl sulfate	0.00	2.43	↑	aminomalonate	0.02	1.56	↑
glycyl-proline	0.01	2.44	↑	urocanic acid	0.00	1.56	↑
beta-gentiobiose	0.01	2.49	↑	isocitric acid	0.00	1.57	↑
biotin	0.00	2.50	↑	Trimethylamine N-oxide	0.00	1.57	↑
succinic acid	0.00	2.53	↑	Acylcarnitine (C8:0)	0.00	1.59	↑
p-tolyl glucuronide	0.00	2.90	↑	4-hydroxybenzoate	0.00	1.59	↑
homocystine	0.00	3.01	↑	oxoproline	0.00	1.60	↑
5-aminovaleric acid	0.00	3.04	↑	digalacturonic acid	0.04	1.61	↑
N-methylglutamic acid	0.00	3.08	↑	N-acetylputrescine	0.01	1.61	↑
hydroxyproline dipeptide NIST	0.00	3.32	↑	7-methylguanine NIST	0.00	1.64	↑
phenol	0.00	4.23	↑	5-hydroxy-3-indoleacetic acid	0.00	1.65	↑
alloxanoic acid NIST	0.00	4.58	↑	orotic acid	0.00	1.67	↑
N-cyclohexylsulfamic acid	0.02	5.33	↑				

Legenda: FC, fold change; M, sentido da mudança: diminuído (↓) ou aumentado (↑)

13.10 ANEXO J – Tabela de descrição de metabólitos com alterações estatisticamente significantes no ECA

Metabólito	P valor	FC	M	Metabólito	P valor	FC	M
PC (35:1)	0.04	1.12	↑	L-Arginine	0.00	8.21	↓
PC (p-36:3)	0.04	1.17	↑	Tyr-Asp-Arg	0.00	7.97	↓
PS (36:1)	0.04	1.20	↑	Tryptophan	0.00	4.17	↓
Pelargonic acid	0.04	1.22	↑	L-methionine sulfoxide	0.00	4.13	↓
PC (34:1)	0.00	1.23	↑	DL-Indole-3-lactic acid	0.00	3.79	↓
PC (38:5) A	0.04	1.23	↑	Leucine	0.00	3.29	↓
PC (36:1)	0.01	1.25	↑	Tyrosine	0.00	3.23	↓
PE (p-40:7)	0.04	1.27	↑	Histidine	0.01	3.03	↓
SM (d42:3)	0.02	1.27	↑	Phenylalanine	0.01	2.93	↓
PC (p-38:4)	0.01	1.28	↑	Palmitoleic acid	0.01	2.93	↓
PC (p-36:4)	0.04	1.28	↑	Linolenic acid	0.00	2.87	↓
SM (d42:2) A	0.02	1.29	↑	2-Amino-1-phenylethanol	0.00	2.81	↓
Eicosapentaenoyl PAF C-16	0.04	1.30	↑	Isoleucine	0.00	2.72	↓
PE (p-36:4)	0.01	1.30	↑	Pro-Gln	0.00	2.70	↓
PC (38:2)	0.01	1.50	↑	Llinoleic acid	0.00	2.69	↓
Phosphate	0.01	1.54	↑	Valine	0.00	2.62	↓
Erythronic acid lactone	0.02	1.54	↑	Methionine	0.01	2.50	↓
PC (38:4) A	0.02	1.55	↑	Homoserine	0.00	2.46	↓
Methanolphosphate	0.00	1.57	↑	Gln-Leu-Lys	0.04	2.45	↓
PC (36:4) B	0.04	1.63	↑	Glu-Leu-Arg	0.04	2.45	↓
(3-Carboxypropyl) trimethylammonium cation	0.04	1.67	↑	Alanine	0.00	2.45	↓
Threonic acid	0.03	1.86	↑	2-monoolein	0.04	2.42	↓
Hexitol	0.00	1.88	↑	5-aminovaleric acid	0.04	2.41	↓
Ascorbic acid	0.00	2.14	↑	Asparagine	0.00	2.29	↓
5-methoxytryptamine	0.04	2.21	↑	Oleic acid	0.00	2.28	↓
Adenosine	0.02	2.58	↑	Lysine	0.02	2.28	↓
TG (48:1)	0.03	1.58	↓	LPE (16:0)	0.01	2.24	↓
LPE (18:0)	0.03	1.53	↓	Ser-Pro-Lys	0.00	2.11	↓
2-hydroxybutanoic acid	0.01	1.52	↓	Lactose	0.03	2.08	↓
Cer (d41:1)	0.03	1.51	↓	Homo-gamma-linolenic acid	0.00	2.05	↓
DHA	0.04	1.41	↓	Ala-Gln	0.00	2.01	↓
PC (32:2)	0.00	1.41	↓	Threonine	0.02	1.95	↓
Ala-Ala-Lys	0.04	1.40	↓	PyroGlu-Lys-Lys	0.01	1.93	↓
SM (d41:2)	0.02	1.40	↓	Proline	0.04	1.88	↓
Arachidic acid	0.02	1.38	↓	L-Methionine, N-acetyl-	0.01	1.88	↓
SM (d41:1)	0.02	1.37	↓	TG (50:1)	0.04	1.87	↓
GlcCer (d40:1)	0.03	1.36	↓	Eicosapentaenoic acid	0.00	1.77	↓
TG (46:0)	0.04	1.35	↓	Thr-Ile-Arg	0.03	1.75	↓
2,6-Di-tert-butyl-4-hydroxymethylphenol	0.01	1.35	↓	Eicosadienoic acid	0.02	1.71	↓
SM (d39:1)	0.04	1.26	↓	L-Serine	0.01	1.64	↓
Cer (d44:1)	0.04	1.22	↓	Maleimide	0.02	1.62	↓
PC (35:2)	0.03	1.19	↓	TG (50:0)	0.04	1.58	↓

Legenda: FC, fold change; M, sentido da mudança: diminuído (↓) ou aumentado (↑)

13.11 ANEXO K – Tabela de descrição de metabólitos com alterações estatisticamente significantes no duodeno

Metabólito	p valor	FC	M	Metabólito	p valor	FC	M
TG (54:7)	0.01	7.04	↓	SM (d40:1)	0.02	1.39	↓
TG (46:3)	0.02	6.49	↓	PC (30:0)	0.02	1.37	↓
TG (50:5)	0.02	5.80	↓	Cer (d40:1)	0.04	1.33	↓
TG (46:2)	0.01	5.30	↓	Cer (d38:1)	0.01	1.33	↓
TG (48:3)	0.01	4.57	↓	PE (p-36:1)	0.02	1.30	↓
TG (44:1)	0.02	4.07	↓	Stearic acid	0.02	1.28	↓
TG (46:1)	0.02	3.93	↓	GlcCer (d40:1)	0.01	1.28	↓
Linolenic acid	0.02	3.63	↓	Arg-Glu	0.01	1.27	↓
TG (50:4)	0.02	3.62	↓	PC (o-32:0)	0.01	1.26	↓
TG (54:1)	0.02	3.55	↓	SM (d42:1)	0.04	1.24	↓
TG (56:1)	0.02	2.47	↓	Cer (d36:1)	0.02	1.20	↓
PE (p-34:2)	0.01	2.19	↓	PC (40:5) A	0.04	1.23	↑
PE (p-36:2)	0.01	2.07	↓	PC (p-38:4)	0.02	1.25	↑
PE (p-38:3)	0.01	2.00	↓	PC (p-36:3)	0.04	1.25	↑
Glycerol-3-galactoside	0.04	1.89	↓	SM (d42:3)	0.02	1.26	↑
GABA	0.02	1.87	↓	SM (d42:2) A	0.01	1.34	↑
PE (36:2)	0.02	1.87	↓	2,5-dihydroxypyrazine	0.04	1.37	↑
PE (36:3)	0.01	1.81	↓	PE (p-40:4)	0.04	1.39	↑
Tyr-Arg	0.04	1.69	↓	PC (40:6) B	0.04	1.47	↑
PC (32:2)	0.01	1.65	↓	Hexitol	0.02	1.47	↑
PE (36:3)	0.01	1.62	↓	Glutamine	0.04	1.50	↑
Adenylyl(3'-5')cytidine	0.04	1.59	↓	Betaine	0.01	1.50	↑
Pro-Leu-Lys	0.02	1.57	↓	GlcCer (d42:2)	0.02	1.51	↑
Glucose	0.01	1.56	↓	PC (38:5) A	0.01	1.56	↑
PE (p-40:5)	0.02	1.56	↓	PC (38:4) A	0.01	1.62	↑
SM (d40:2) B	0.02	1.54	↓	PC (38:6)	0.01	1.66	↑
PC (p-34:1)	0.01	1.50	↓	PC (37:4)	0.01	1.68	↑
Arachidic acid	0.02	1.44	↓	PC (40:7)	0.01	1.74	↑
SM (d41:1)	0.02	1.41	↓	PC (36:4) B	0.02	1.78	↑
PE (36:1)	0.02	1.41	↓	Ascorbic acid	0.01	2.65	↑

Legenda: FC, fold change; M, sentido da mudança: diminuído (↓) ou aumentado (↑)

13.12 ANEXO L – Tabela de descrição de metabólitos com alterações estatisticamente significantes no jejuno

Metabólito	p valor	FC	M	Metabólito	p valor	FC	M
TG (48:2)	0.00	15.9	↓	AICAR	0.02	1.9	↓
TG (50:1)	0.00	15.5	↓	TG (58:10)	0.02	1.9	↓
TG (48:1)	0.00	15.4	↓	Xylitol	0.02	1.9	↓
TG (46:2)	0.01	14.3	↓	2'-deoxyguanosine	0.04	1.8	↓
TG (50:2)	0.00	14.2	↓	TG (58:8)	0.01	1.8	↓
TG (52:1)	0.00	13.8	↓	SM (d41:1)	0.01	1.8	↓
TG (54:4)	0.00	13.6	↓	Guanosine	0.01	1.8	↓
TG (48:3)	0.00	13.6	↓	SM (d39:1)	0.00	1.7	↓
TG (52:3)	0.00	12.0	↓	Oleic acid	0.00	1.7	↓
TG (46:1)	0.01	12.0	↓	SM (d40:1)	0.02	1.7	↓
TG (46:3)	0.03	11.9	↓	TG (58:9)	0.00	1.7	↓
TG (50:4)	0.00	11.5	↓	TG (56:8)	0.01	1.7	↓
TG (50:3)	0.00	11.2	↓	SM (d40:2) B	0.02	1.7	↓
TG (52:4)	0.00	10.5	↓	Glucose	0.02	1.7	↓
TG (54:6) A	0.00	9.8	↓	Eicosapentaenoic acid	0.02	1.6	↓
TG (50:5)	0.00	9.6	↓	5-methoxytryptamine	0.03	1.6	↓
TG (54:1)	0.00	9.0	↓	2-hydroxybutanoic acid	0.01	1.6	↓
TG (48:0)	0.00	8.6	↓	Cytosine	0.01	1.6	↓
TG (51:2)	0.00	7.4	↓	Cer (d36:1)	0.02	1.6	↓
TG (51:4)	0.01	7.1	↓	Valine	0.01	1.6	↓
TG (51:1)	0.01	7.0	↓	Cer (d42:1)	0.02	1.5	↓
TG (46:0)	0.01	6.7	↓	GlcCer (d40:1)	0.02	1.5	↓
TG (54:7)	0.00	6.6	↓	PC (p-38:3)	0.01	1.5	↓
TG (49:1)	0.01	6.6	↓	PC (p-34:1)	0.01	1.5	↓
TG (56:4)	0.00	6.5	↓	Cer (d44:1)	0.03	1.5	↓
TG (50:0)	0.00	6.3	↓	SM (d42:1)	0.03	1.5	↓
TG (53:4)	0.00	6.3	↓	Glu-Ser-Lys	0.02	1.4	↓
TG (51:3)	0.00	6.2	↓	Palmitoleic acid	0.03	1.4	↓
TG (49:2)	0.00	6.1	↓	Tyr-Arg	0.03	1.4	↓
TG (53:3)	0.00	5.9	↓	SM (d38:1)	0.04	1.3	↓
TG (44:1)	0.03	5.8	↓	Succinic acid	0.03	1.3	↓
TG (53:2)	0.00	5.5	↓	PE (p-38:4)	0.01	1.3	↓
TG (58:3)	0.00	5.0	↓	Pro-Leu-Lys	0.04	1.3	↓
TG (56:1)	0.00	4.8	↓	PC (36:2)	0.02	1.2	↓
TG (14:0/14:0/14:0)	0.00	3.4	↓	Creatine	0.01	1.1	↑
TG (56:6)	0.00	3.3	↓	SM (d34:1)	0.01	1.2	↑
TG (58:2)	0.01	3.3	↓	PE (p-40:7)	0.01	1.2	↑
TG (56:7)	0.00	3.2	↓	PC (32:1)	0.02	1.3	↑

continua

13.12 ANEXO L – Tabela de descrição de metabólitos com alterações estatisticamente significantes no jejuno (conclusão)

Metabólito	p valor	FC	M	Metabólito	p valor	FC	M
Glycerol-3-galactoside	0.00	3.0	↓	PC (36:3) A	0.01	1.3	↑
TG (56:5)	0.00	2.9	↓	Guanine	0.04	1.3	↑
Cer (d39:1)	0.00	2.8	↓	PC (34:1)	0.01	1.3	↑
Ribose	0.00	2.7	↓	Betaine	0.02	1.3	↑
TG (58:4) A	0.01	2.6	↓	PC (38:5) A	0.00	1.4	↑
Pro-Gln	0.00	2.5	↓	PE (p-34:1)	0.00	1.4	↑
Putrescine	0.02	2.5	↓	Hexitol	0.02	1.4	↑
Glu-Gly-Arg	0.02	2.4	↓	SM (d42:3)	0.00	1.4	↑
Cer (d40:0)	0.00	2.4	↓	PC (40:7)	0.01	1.4	↑
2'-deoxycytidine	0.00	2.4	↓	PC (33:1)	0.00	1.5	↑
SM (d41:2)	0.00	2.2	↓	Cer (d42:2) A	0.00	1.5	↑
Linolenic acid	0.01	2.1	↓	Oxalic acid	0.01	1.5	↑
Cer (d41:1)	0.00	2.1	↓	4-Methyl-1H-pyrazole	0.03	1.8	↑
Ethanolamine	0.01	2.1	↓	SM (d42:2) A	0.00	1.8	↑
Cer (d40:1)	0.01	2.1	↓	PC (38:2)	0.00	1.9	↑
TG (54:5) B	0.01	2.1	↓	1,5-anhydroglucitol	0.03	1.9	↑
Cytidine	0.00	2.1	↓	Glutamine	0.01	1.9	↑
Cer (d38:1)	0.00	2.1	↓	PyroGlu-Cys	0.04	2.0	↑
Adenylyl(3'-5')cytidine	0.01	2.0	↓	SM (d44:2)	0.00	2.0	↑
Proline	0.02	1.9	↓	GlcCer (d42:2)	0.00	2.1	↑
Linoleic acid	0.02	1.9	↓	Adenosine 5'-diphosphoribose	0.01	3.4	↑
Pyridoxamine	0.00	1.9	↓				

Legenda: FC, fold change; M, sentido da mudança: diminuído (↓) ou aumentado (↑)

13.13 ANEXO M – Tabela de descrição de metabólitos com alterações estatisticamente significantes no óleo

Metabólito	p valor	FC	M	Metabólito	p valor	FC	M
Carnosine	0.04	3.58	↓	Isomaltose	0.01	1.64	↓
TG (46:2)	0.04	3.43	↓	Valine	0.02	1.64	↓
Galactinol	0.02	3.41	↓	PE (p-38:3) or PE (o-38:4)	0.02	1.62	↓
TG (44:1)	0.04	2.91	↓	L-Serine	0.02	1.61	↓
Hexuronic acid	0.01	2.86	↓	Adenylyl(3'-5')cytidine	0.02	1.61	↓
AC (C9:1)	0.03	2.84	↓	Tyr-Arg	0.01	1.61	↓
Ala-Gln	0.02	2.65	↓	PC (p-34:1) or PC (o-34:2) A	0.04	1.59	↓
Glu-Gly-Arg	0.01	2.54	↓	Maleimide	0.02	1.56	↓
AC (C5:0)	0.02	2.51	↓	Cer (d42:0)	0.03	1.55	↓
Phe-Arg	0.00	2.46	↓	Glucose	0.01	1.52	↓
Thr-Ile-Arg	0.00	2.40	↓	Pyridoxamine	0.00	1.51	↓
TG (14:0/14:0/14:0)	0.02	2.24	↓	L-methionine sulfoxide	0.04	1.51	↓
Glycerol-3-galactoside	0.00	2.14	↓	Arginine	0.03	1.48	↓
Myristic acid	0.01	1.94	↓	Pro-Leu-Lys	0.00	1.46	↓
Homo-gamma-linolenic acid	0.03	1.92	↓	Lactose	0.00	1.43	↓
Homoserine	0.00	1.88	↓	Cer (d40:1)	0.04	1.35	↓
Pro-Gln	0.02	1.87	↓	Alpha-aminoadipic acid	0.04	1.35	↓
1-monoolein	0.04	1.86	↓	SM (d41:1)	0.03	1.34	↓
L-Methionine, N-acetyl-	0.00	1.85	↓	PE (36:1)	0.02	1.26	↓
Ile-Gln-Lys	0.04	1.85	↓	SM (d39:1)	0.02	1.26	↓
Linolenic acid	0.03	1.83	↓	Betaine	0.01	0.75	↓
2-Amino-1-phenylethanol	0.01	1.77	↓	4-acetamidobutyric acid	0.01	1.50	↑
PC (37:2)	0.04	1.73	↓	PC (36:4) B	0.03	1.60	↑
Asn-Ile-Lys	0.04	1.70	↓	5-aminovaleric acid	0.03	4.39	↑
Oleic acid	0.04	1.64	↓				

Legenda: FC, fold change; M, sentido da mudança: diminuído (↓) ou aumentado (↑)

13.14 ANEXO N – Análise discriminante parcial por mínimos quadrados (PLS DA) do plasma de pacientes respondedores

Análise discriminante parcial por mínimos quadrados (PLS DA) do plasma de pacientes respondedores. *Score plots* baseados nas séries (a) GC-MS; (b) HILIC-MS; (c) CSH-MS modo positivo; and (d) CSH-MS modo negativo. Amostras obtidas no pré-operatório (pre_, círculos vermelhos) e 3 meses após a cirurgia (post_, círculos verdes).

13.15 ANEXO O – Análise discriminante parcial por mínimos quadrados (PLS DA) do plasma de pacientes não respondedores

Análise discriminante parcial por mínimos quadrados (PLS DA) do plasma de pacientes não respondedores. Score plots baseados nas séries (a) GC-MS; (b) HILIC-MS; (c) CSH-MS modo positivo; and (d) CSH-MS modo negativo. Amostras obtidas no pré-operatório (pre_, círculos vermelhos) e 3 meses após a cirurgia (post_, círculos verdes).

13.16 ANEXO P – Análise discriminante parcial por mínimos quadrados (PLS DA) da urina de pacientes respondedores

Análise discriminante parcial por mínimos quadrados (PLS DA) de urina de pacientes respondedores. *Score plots* baseados nas séries (a) GC-MS; (b) HILIC-MS. Amostras obtidas no pré-operatório (pre_, círculos vermelhos) e 3 meses após a cirurgia (post_, círculos verdes).

13.17 ANEXO Q – Análise discriminante parcial por mínimos quadrados (PLS DA) da urina de pacientes não respondedores

Análise discriminante parcial por mínimos quadrados (PLS DA) de urina de pacientes não respondedores. *Score plots* baseados nas séries (a) GC-MS; (b) HILIC-MS. Amostras obtidas no pré-operatório (pre_, círculos vermelhos) e 3 meses após a cirurgia (post_, círculos verdes).

13.18 ANEXO R – Alterações de AB plasmáticos de acordo com a melhora do DM2 após DGYR.

Metabólito	Respondedores			Não respondedores		
	p valor	FC	M	p valor	FC	M
Ácido quenodeoxicólico	0.735	1.04	↑	0.742	7.04	↑
Ácido cólico	0.787	1.03	↓	0.312	8.35	↑
Ácido deoxicólico	0.735	1.09	↑	0.742	1.32	↑
Ácido glicoquenodeoxicólico	0.008	1.51	↑	0.742	1.21	↓
Ácido glicocólico	0.375	1.44	↓	0.382	1.56	↓
Ácido glicodeoxicólico	0.080	1.2	↑	0.039	1.33	↑
Ácido glicoiodeoxicólico	ND	ND	ND	0.546	2.6	↓
Ácido glicolítico	0.684	1.6	↑	0.109	4.28	↓
Ácido glicoursodeoxicólico	0.497	1.24	↓	0.312	6.24	↓
Ácido litocólico	0.094	1.82	↓	0.039	3.95	↓
Ácido tauroquenodeoxycólico	0.003	1.44	↑	0.945	1.39	↑
Ácido taurocólico	0.839	2.06	↓	0.25	1.15	↓
Ácido taurodeoxicólico	0.142	1.1	↑	0.078	1.85	↑
Ácido taurolítocólico	0.190	2.22	↑	0.148	9.34	↓
Ácido tauroursodeoxicólico	0.216	1.47	↑	0.25	5.44	↓
Ácido ursodeoxicólico	0.946	1.35	↓	0.25	1.56	↑

Legenda: FC, *fold change*; M, sentido da mudança: diminuído (↓) ou aumentado (↑); ND, não detectado

13.20 ANEXO T – Relação entre os sistemas de oxidação dos ácidos graxos e o papel regulatório do PPAR α na oxidação e metabolismo energético.

Legenda: A ω oxidação no retículo endoplasmático liso gera ácidos dicarboxílicos, que são posteriormente degradados pela β oxidação nos peroxissomos. São produzidos ácidos acil-CoA de cadeia encurtada são desviados para a β oxidação mitocondrial, na qual o processo de oxidação é completado. Os substratos para o sistema clássico de β oxidação peroxissomal atuam como ligantes de PPAR α e aumentam a transcrição de genes alvo de PPAR α dos sistemas de oxidação do retículo endoplasmático liso, peroxissomos e mitocôndria. Na ausência da β oxidação peroxissomal, os substratos não metabolizados causam hiperestimulação de genes regulados por PPAR α .

PPAR α , receptor ativado por proliferador de peroxissoma; REL, retículo endoplasmático liso; PUFA, ácidos graxos poli-insaturados; DHA, ácido docosaenóico; EPA, ácido eicosapentaenóico;

Adaptado de Reddy JK, et al. 2001¹⁵³.

14 Referências

14 REFERÊNCIAS

1. Bertoldi AD, Kanavos P, França GVA, Carraro A, Tejada CA, Hallal PC, et al. Epidemiology, management, complications and costs associated with type 2 diabetes in Brazil: a comprehensive literature review. *Global Health*. 2013;9(1):62.
2. McNaughton D. “Diabesity” down under: Overweight and obesity as cultural signifiers for type 2 diabetes mellitus. *Crit Public Health*. 2013;23(3):274-88.
3. Olshansky J, Passaro D, Hershow R, Layden J, Cames B, Brody J, et al. A potential decline in life expectancy in the united states in teh 21st century. *New Eng J Med*. 2005;352:1138-45.
4. 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;238(4):467-84.
5. Cummings DE. Endocrine mechanisms mediating remission of diabetes after gastric bypass surgery. *Int J Obes*. 2009;33(S1):S33-40.
6. Laferrère B. Do we really know why diabetes remits after gastric bypass surgery? *Endocrine*. 2011;40(2):162-7.
7. Cummings DE. Metabolic surgery for type 2 diabetes. *Nat Med*. 2012;18(5):656-8.
8. Fiehn O. Metabolomics - The link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol*. 2002;48(1-2):155-71.
9. Ismail-Beigi F. Glycemic management of type 2 diabetes mellitus. *New Engl J Med*. 2012;366(14):1319-27.

10. Tahrani AA, Bailey CJ, Del Prato S, Barnett AH. Management of type 2 diabetes: new and future developments in treatment. *Lancet*. 2011;378(9786):182-97.
11. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas Sixth Edition. Brussels: International Diabetes Federation; 2013. p. 1-1636.
12. Brasil. Vigitel Brazil 2016: surveillance of risk and protective factors for chronic diseases by telephone survey: estimates of sociodemographic frequency and distribution of risk and protective factors for chronic diseases in the capitals of the 26 Brazilian states. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção da Saúde. 2017. 160p.:il. Available from: www.saude.gov.br/svs
13. Cavaghan MK, Ehrmann DA, Polonsky KS. Interactions between insulin resistance and insulin secretion in the development of glucose intolerance. *J Clin Invest*. 2000;106(3):329-33.
14. Aronoff SL, Berkowitz K, Shreiner B, Want L. Glucose metabolism and regulation: beyond insulin and glucagon. *Diabetes Spectr*. 2004;17(3):183-90.
15. Colagiuri S, Davies D. The value of early detection of type 2 diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2009;16(2):95-9.
16. Ross JS, Russo SB, Chavis GC, Cowart LA. Sphingolipid regulators of cellular dysfunction in Type 2 diabetes mellitus: A systems overview. *Clin Lipidol*. 2014;9(5):553-69.
17. Russo SB, Ross JS, Cowart LA. Sphingolipids in obesity, type 2 diabetes, and metabolic disease. In: *Sphingolipids in disease. Handbook of Experimental Pharmacology*; 2013. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-7091-1511-4_19#citeas

18. Boden G. Fatty acid-induced inflammation and insulin resistance in skeletal muscle and liver. *Curr Diab Rep.* 2006;6(3):177-81.
19. Zorzano A, Liesa M, Palacín M. Role of mitochondrial dynamics proteins in the pathophysiology of obesity and type 2 diabetes. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41(10):1846-54.
20. Storlien L, Oakes ND, Kelley DE. Metabolic flexibility. *Proc Nutr Soc.* 2004;63(02):363-8.
21. Chen X, Wei S, Yang F. Mitochondria in the pathogenesis of diabetes: A proteomic view. *Protein Cell.* 2012;3(9):648-60.
22. McGarry JD. Banting Lecture 2001. Diabetes. 2001;51(June):7-18.
23. Rousset S, Alves-Guerra MC, Mozo J, Miroux B, Cassard-Doulcier AM, Bouillaud F, et al. The biology of mitochondrial uncoupling proteins. *Diabetes.* 2004;53 Suppl 1(February):S130-5.
24. Lamson DW, Plaza SM. Mitochondrial factors in the pathogenesis of diabetes: A hypothesis for treatment. *Altern Med Rev.* 2002;7(2):94-111.
25. Rolfe DF, Brown GC. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol Rev.* 1997;77(3):731–58.
26. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications. *Diabetes.* 2005;54(6):1615 LP-1625.
27. Mingrone G, Castagneto-Gissey L, Macé K. Use of dicarboxylic acids in type 2 diabetes. *Br J Clin Pharmacol.* 2013;75(3):671-6.
28. Rubino F, R'bibo SL, del Genio F, Mazumdar M, McGraw TE. Metabolic surgery: the role of the gastrointestinal tract in diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol.* 2010 Feb;6(2):102-9.

29. Wang Y, Holmes E, Comelli EM, Fotopoulos G, Dorta G, Tang H, et al. Topographical variation in metabolic signatures of human gastrointestinal biopsies revealed by high-resolution magic-angle spinning ¹H NMR Spectroscopy research articles. 2007;3944-51.
30. Rindi G, Leiter AB, Kopin AS, Bordi C, Solcia E. The “normal” endocrine cell of the gut: Changing concepts and new evidences. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1014:1-12.
31. Drucker DJ. The biology of incretin hormones. *Cell Metab.* 2006;3(3):153-65.
32. Drucker DJ. Review series The role of gut hormones in glucose homeostasis. *Pancreas.* 2007;117(1):24-32.
33. Rodrigues SS, Fonseca CC NM. células endócrinas do sistema gastroenteropancreático : conceitos, distribuição, secreções, ação e controle. *Arq Ciênc vet zool.* 2005;8(2):171-80. Available from: <http://revistas.unipar.br/index.php/veterinaria/article/view/56>
34. Baggio LL, Drucker DJ. Biology of Incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology.* 2007;132(6):2131-57.
35. Adam TCM, Jochan J, Westerterp-Plantenga MS. Decreased glucagon-like peptide 1 release after weight loss in overweight/obese subjects. *Obes Res.* 2005;13(4):710-6.
36. Verdich C, Toubro S, Buemann B, Lysgård Madsen J, Juul Holst J, Astrup A. The role of postprandial releases of insulin and incretin hormones in meal-induced satiety - Effect of obesity and weight reduction. *Int J Obes.* 2001;25(8):1206-14.
37. Ranganath LR, Beety JM, Morgan LM, Wright JW, Howland R, Marks V. Attenuated GLP-1 secretion in obesity: Cause or consequence? *Gut.* 1996;38(6):916-9.

38. Kelley D, Mitrakou A, Marsh H, Schwenk F, Benn J, Sonnenberg G, et al. Skeletal muscle glycolysis, oxidation, and storage of an oral glucose load. *J Clin Invest*. 1988;81(5):1563-71.
39. Holst JJ, Gromada J. Role of incretin hormones in the regulation of insulin secretion in diabetic and nondiabetic humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004;287(2):E199-206.
40. Fraser RJ, Horowitz M, Maddox AF, Harding PE, Chatterton BE, Dent J. Hyperglycaemia slows gastric emptying in Type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*. 1990;33(11):675-80.
41. Rayner CK, Samsom M, Jones KL HM. Relationships of upper gastrointestinal motor and sensory function with glycemic control. *Diabetes Care*. 2001;24:371-81.
42. Dumas M-E, Barton RH, Toye A, Cloarec O, Blancher C, Rothwell A, et al. Metabolic profiling reveals a contribution of gut microbiota to fatty liver phenotype in insulin-resistant mice. *Proc Natl Acad Sci*. 2006 Aug 15;103(33):12511-6.
43. Angrisani L, Santonicola A, Iovino P, Vitiello A, Zundel N, Buchwald H, et al. Bariatric surgery and endoluminal procedures: IFSO Worldwide Survey 2014. *Obes Surg*. 2017;27(9):2279-89.
44. Li J V., Ashrafian H, Bueter M, Kinross J, Sands C, Le Roux CW, et al. Metabolic surgery profoundly influences gut microbial - Host metabolic cross-talk. *Gut*. 2011;60(9):1214-23.
45. Koliaki C, Liatis S, Le Roux CW, Kokkinos A. The role of bariatric surgery to treat diabetes: current challenges and perspectives. *BMC Endocr Disord*. 2017;17(1):50.
46. Bradley D, Conte C, Mittendorfer B, Eagon JC, Varela JE, Fabbrini E, et al. Gastric bypass and banding equally improve insulin sensitivity and β cell function. *J Clin Invest*. 2012;122(12):4667-74.

47. Mutch DM, Fuhrmann JC, Rein D, Wiemer JC, Bouillot JL, Poitou C, et al. Metabolite profiling identifies candidate markers reflecting the clinical adaptations associated with Roux-en-Y gastric bypass surgery. *PLoS One*. 2009;4(11).
48. Simonen M, Dali-Youcef N, Kaminska D, Venesmaa S, Käkälä P, Pääkkönen M, et al. Conjugated bile acids associate with altered rates of glucose and lipid oxidation after Roux-en-Y gastric bypass. *Obes Surg*. 2012 Sep 26;22(9):1473–80.
49. Ashrafian H, Li J V., Spagou K, Harling L, Masson P, Darzi A, et al. Bariatric surgery modulates circulating and cardiac metabolites. *J Proteome Res*. 2014;13(2):570–80.
50. Li J. Experimental bariatric surgery in rats generates a cytotoxic chemical environment in the gut contents. *Front Microbiol*. 2011;2. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2011.00183/abstract>
51. Dailey MJ. Nutrient-induced intestinal adaption and its effect in obesity. *Physiol Behav*. 2014;136:74–8.
52. Cognard E, Dargaville CG, Hay DL, Shepherd PR. Identification of a pathway by which glucose regulates β -catenin signalling via the cAMP/protein kinase A pathway in β -cell models. *Biochem J*. 2013 Feb 1;449(3):803–11.
53. Chocarro-Calvo A, García-Martínez JM, Ardila-González S, De la Vieja A, García-Jiménez C. Glucose-Induced β -catenin acetylation enhances Wnt signaling in cancer. *Mol Cell*. 2013 Feb;49(3):474–86.
54. Nannipieri M, Baldi S, Mari A, Colligiani D, Guarino D, Camastra S, et al. Roux-en-Y gastric bypass and sleeve gastrectomy: mechanisms of diabetes remission and role of gut hormones. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013 Nov;98(11):4391–9.

55. Dixon JB, Chuang L-M, Chong K, Chen S-C, Lambert GW, Straznicky NE, et al. Predicting the glycemic response to gastric bypass surgery in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2013 Jan 1;36(1):20–6.
56. Lutz TA, Bueter M. The physiology underlying Roux-en-Y gastric bypass: a status report. *AJP Regul Integr Comp Physiol*. 2014;307(11):R1275–91.
57. Kalarchian MA, Marcus MD, Courcoulas AP, Cheng Y, Levine MD. Self-report of gastrointestinal side effects after bariatric surgery. *Surg Obes Relat Dis*. 2014 Nov;10(6):1202-7.
58. Karra E, Yousseif A, Batterham RL. Mechanisms facilitating weight loss and resolution of type 2 diabetes following bariatric surgery. *Trends Endocrinol Metab*. 2010 Jun;21(6):337-44.
59. 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 Nov;244(5):741-9.
60. Ahmad NN, Pfalzer A, Kaplan LM. Roux-en-Y gastric bypass normalizes the blunted postprandial bile acid excursion associated with obesity. *Int J Obes*. 2013;37(12):1553–9.
61. Kuipers F, Bloks VW, Groen AK. Beyond intestinal soap - Bile acids in metabolic control. *Nat Rev Endocrinol*. 2014;10(8):488–98.
62. Thomas C, Pellicciari R, Pruzanski M, Auwerx J, Schoonjans K. Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2008 Aug 1;7(8):678–93.
63. Ma K. Farnesoid X receptor is essential for normal glucose homeostasis. *J Clin Invest*. 2006 Mar 23;116(4):1102–9.

64. Watanabe M, Houten SM, Matakai C, Christoffolete MA, Kim BW, Sato H, et al. Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature*. 2006 Jan 8;439(7075):484–9.
65. Han SI, Studer E, Gupta S, Fang Y, Qiao L, Li W, et al. Bile acids enhance the activity of the insulin receptor and glycogen synthase in primary rodent hepatocytes. *Hepatology*. 2004 Feb;39(2):456–63.
66. Tomlinson E, Fu L, John L, Hultgren B, Huang X, Renz M, et al. Transgenic mice expressing human fibroblast growth factor-19 display increased metabolic rate and decreased adiposity. *Endocrinology*. 2002 May;143(5):1741–7.
67. Kir S, Beddow SA, Samuel VT, Miller P, Previs SF, Suino-Powell K, et al. FGF19 as a Postprandial, insulin-independent activator of hepatic protein and glycogen synthesis. *Science* (80-). 2011 Mar 25;331(6024):1621–4.
68. Mráz M, Lacinová Z, Kaváľková P, Haluzíková D, Trachta P, Drápalová J, et al. Serum concentrations of fibroblast growth factor 19 in patients with obesity and type 2 diabetes mellitus: The influence of acute hyperinsulinemia, very-low calorie diet and PPAR- α agonist treatment. *Physiol Res*. 2011;60(4):627–36.
69. Patti ME, Houten SM, Bianco AC, Bernier R, Larsen PR, Holst JJ, et al. Serum bile acids are higher in humans with prior gastric bypass: Potential contribution to improved glucose and lipid metabolism. *Obesity*. 2009;17(9):1671–7.
70. Pournaras DJ, Glicksman C, Vincent RP, Kuganlipava S, Alaghband-Zadeh J, Mahon D, et al. The role of bile after Roux-en-Y gastric bypass in promoting weight loss and improving glycaemic control. *Endocrinology*. 2012 Aug;153(8):3613–9.

71. Jansen PLM, van Werven J, Aarts E, Berends F, Janssen I, Stoker J, et al. Alterations of hormonally active fibroblast growth factors after Roux-en-Y gastric bypass surgery. *Dig Dis*. 2011;29(1):48-51.
72. Glomset J. The plasma lecithin: cholesterol acyltransferase reaction. *J Lipid Res*. 1968;9:155-67.
73. Kong L-C, Tap J, Aron-Wisnewsky J, Pelloux V, Basdevant A, Bouilliot J-L, 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 Jul 1;98(1):16-24.
74. Snedeker SM, Hay AG. Do Interactions between gut ecology and environmental chemicals contribute to obesity and diabetes? *Environ Health Perspect*. 2012 Mar;120(3):332-9.
75. Jones B V., Begley M, Hill C, Gahan CGM, Marchesi JR. Functional and comparative metagenomic analysis of bile salt hydrolase activity in the human gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci*. 2008 Sep 9;105(36):13580-5.
76. Patti GJ, Yanes O, Siuzdak G. Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012 Apr 1;13(4):263-9.
77. Suhre K, Gieger C. Genetic variation in metabolic phenotypes: study designs and applications. *Nat Rev Genet*. 2012 Nov 3;13(11):759-69.
78. Boccard J, Veuthey J-L, Rudaz S. Knowledge discovery in metabolomics: An overview of MS data handling. *J Sep Sci*. 2010 Feb;33(3):290-304.
79. Boja ES, Rodriguez H. The path to clinical proteomics research: integration of proteomics, genomics, clinical laboratory and regulatory science. *Korean J Lab Med*. 2011;31(2):61.

80. Meigs JB, Muller DC, Nathan DM, Blake DR, Andres R. The natural history of progression from normal glucose tolerance to type 2 diabetes in the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Diabetes*. 2003 Jun 1;52(6):1475-84.
81. Colagiuri S, Davies D. The value of early detection of type 2 diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2009 Apr;16(2):95-9.
82. DeBerardinis RJ, Thompson CB. Cellular metabolism and disease: what do metabolic outliers Teach Us? *Cell*. 2012 Mar;148(6):1132-44.
83. Horgan RP, Kenny LC. 'Omic' technologies: genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics. *Obstet Gynaecol*. 2011 Jul;13(3):189–95.
84. Biesecker LG. Hypothesis-generating research and predictive medicine. *Genome Res*. 2013 Jul 1;23(7):1051-3.
85. Walsh MC, Nugent A, Brennan L, Gibney MJ. Understanding the metabolome - Challenges for metabolomics. *Nutr Bull*. 2008;33(4):316-23.
86. 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 11;44(6):1359-75.
87. Zeisel SH, Freake HC, Bauman DE, Bier DM, Burrin DG, German JB, et al. The nutritional phenotype in the age of metabolomics. *J Nutr*. 2005 Jul 1;135(7):1613-6.
88. IBGE IB de G e E—. Pesquisa Nacional de Saúde. 2013. Available from: <https://www.pns.iciict.fiocruz.br/arquivos/Novos/Manual de Antropometria PDF.pdf>
89. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski a S, Naylor B a, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell

function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28(7):412-9.

90. Mello MT de, Dâmaso AR, Antunes HKM, Siqueira KO, Castro ML, Bertolino S V., et al. Avaliação da composição corporal em adolescentes obesos: o uso de dois diferentes métodos. *Rev Bras Med do Esporte*. 2005 Oct;11(5):267-70.

91. 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 Nov 1;32(11):2133-5.

92. Tsugawa H, Cajka T, Kind T, Ma Y, Higgins B, Ikeda K, et al. MS-DIAL: Data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis. *Nat Methods*. 2015;12(6):523-6.

93. Dunn WB, Broadhurst D, Begley P, Zelena E, Francis-Mcintyre S, Anderson N, et al. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nat Protoc*. 2011;6(7):1060-83.

94. Temmerman L. Cross-Platform Urine Metabolomics of Experimental Hyperglycemia in Type 2 Diabetes. *J Diabetes Metab*. 2013;01(S6).

95. IT J. *Principal component Analysis*. second. Springer; 2002.

96. Musumarra G, Barresi V, Condorelli DF, Fortuna CG, Scirè S. Potentialities of multivariate approaches in genome-based cancer research: identification of candidate genes for new diagnostics by PLS discriminant analysis. *J Chemom*. 2004 Mar;18(34):125-32.

97. Xia J, Wishart DS. Using MetaboAnalyst 3.0 for Comprehensive Metabolomics Data Analysis. *Curr Protoc Bioinforma*. 2016 Sep;55(1):14.10.1-14.10.91.

98. Barupal DK, Haldiya PK, Wohlgemuth G, Kind T, Kothari SL, Pinkerton KE, et al. MetaMapp: mapping and visualizing metabolomic data by integrating information from biochemical pathways and chemical and mass spectral similarity. *BMC Bioinformatics*. 2012;13(1):99.
99. Smoot ME, Ono K, Ruscheinski J, Wang PL, Ideker T. Cytoscape 2.8: New features for data integration and network visualization. *Bioinformatics*. 2011;27(3):431-2.
100. Barupal DK, Fiehn O. Chemical Similarity Enrichment Analysis (ChemRICH) as alternative to biochemical pathway mapping for metabolomic datasets. *Sci Rep*. 2017;7(1):1-11.
101. Barupal DK, Fan S, Fiehn O. Integrating bioinformatics approaches for a comprehensive interpretation of metabolomics datasets. *Curr Opin Biotechnol*. 2018;54:1–9.
102. Ridlon JM, Kang D-J, Hylemon PB. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J Lipid Res*. 2006 Feb;47(2):241–59.
103. Park S, Sadanala KC, Kim E-K. A metabolomic approach to understanding the metabolic link between obesity and diabetes. *Mol Cells*. 2015;38(7):587–96.
104. Holland WL, Summers SA. Sphingolipids, insulin resistance, and metabolic disease: New insights from in vivo manipulation of sphingolipid metabolism. *Endocr Rev*. 2008;29(4):381–402.
105. Bartke N, Hannun YA. Bioactive sphingolipids: metabolism and function. *J Lipid Res*. 2009 Apr;50(Supplement):S91–6.
106. Ohanian J, Ohanian V. Sphingolipids in mammalian cell signalling. *Cell Mol Life Sci*. 2001 Dec;58(14):2053–68.

107. Galadari S, Rahman A, Pallichankandy S, Galadari A, Thayyullathil F. Role of ceramide in diabetes mellitus: evidence and mechanisms. *Lipids Health Dis.* 2013;12(1):98.
108. Wright SD, Kolesnick RN. Does endotoxin stimulate cells by mimicking ceramide? *Immunol Today.* 1995 Jun;16(6):297–302.
109. Wang C, Kong H, Guan Y, Yang J, Gu J, Yang S, et al. Plasma phospholipid metabolic profiling and biomarkers of type 2 diabetes mellitus based on high-performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry and multivariate statistical analysis. *Anal Chem.* 2005 Jul;77(13):4108–16.
110. Saeidi N, Meoli L, Nestoridi E, Gupta NK, Kvas S, Kucharczyk J, et al. Reprogramming of intestinal glucose metabolism and glycemic control in rats after gastric bypass. *Science (80-).* 2013;341(6144):406–10.
111. Beilstein F, Carrière V, Leturque A, Demignot S. Characteristics and functions of lipid droplets and associated proteins in enterocytes. *Exp Cell Res.* 2016;340(2):172–9.
112. Walther TC, Farese R V. The life of lipid droplets. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids.* 2009 Jun;1791(6):459–66.
113. Pol A, Gross SP, Parton RG. Biogenesis of the multifunctional lipid droplet: Lipids, proteins, and sites. *J Cell Biol.* 2014 Mar 3;204(5):635–46.
114. Barbosa AD, Savage DB, Siniossoglou S. Lipid droplet–organelle interactions: emerging roles in lipid metabolism. *Curr Opin Cell Biol.* 2015 Aug;35:91–7.
115. Zechner R, Zimmermann R, Eichmann TO, Kohlwein SD, Haemmerle G, Lass A, et al. FAT SIGNALS - lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. *Cell Metab.* 2012 Mar;15(3):279–91.

116. Welte MA. Expanding roles for lipid droplets. *Curr Biol*. 2015 Jun;25(11):R470–81.
117. Ogden CL, Yanovski SZ, Carroll MD, Flegal KM. The epidemiology of obesity. *Gastroenterology*. 2007 May;132(6):2087–102.
118. Demignot S, Beilstein F, Morel E. Triglyceride-rich lipoproteins and cytosolic lipid droplets in enterocytes: Key players in intestinal physiology and metabolic disorders. *Biochimie*. 2014;96(1):48–55.
119. Lodhi IJ, Semenkovich CF. Peroxisomes: A nexus for lipid metabolism and cellular signaling. *Cell Metab*. 2014 Mar;19(3):380–92.
120. Veilleux A, Grenier É, Marceau P, Carpentier AC, Richard D, Levy E. Intestinal lipid handling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014 Mar;34(3):644–53.
121. Adeli K, Lewis GF. Intestinal lipoprotein overproduction in insulin-resistant states. *Curr Opin Lipidol*. 2008;19(3):221–8.
122. Xiao C, Lewis GF. Regulation of chylomicron production in humans. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*. 2012 May;1821(5):736–46.
123. Sasase T, Morinaga H, Yamamoto H, Ogawa N, Matsui K, Miyajima K, et al. Increased fat absorption and impaired fat clearance cause postprandial hypertriglyceridemia in Spontaneously Diabetic Torii rat. *Diabetes Res Clin Pract*. 2007 Oct;78(1):8–15.
124. Boden G, Shulman GI. Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction. *Eur J Clin Invest*. 2002 Jun;32 Suppl 3:14–23.
125. Krssak M, Falk Petersen K, Dresner A, DiPietro L, Vogel SM, Rothman DL, et al. Intramyocellular lipid concentrations are correlated with insulin sensitivity in humans: a ^1H NMR spectroscopy study. *Diabetologia*. 1999 Jan 11;42(1):113–6.

126. Ruderman NB, Saha AK, Vavvas D, Witters LA. Malonyl-CoA, fuel sensing, and insulin resistance. *Am J Physiol*. 1999 Jan;276(1 Pt 1):E1–18.
127. Eaton S. Control of mitochondrial beta-oxidation flux. *Prog Lipid Res*. 2002 May;41(3):197–239.
128. Fiehn O, Garvey WT, Newman JW, Lok KH, Hoppel CL, Adams SH. Plasma Metabolomic Profiles Reflective of Glucose Homeostasis in Non-Diabetic and Type 2 Diabetic Obese African-American Women. Gimble JM, editor. *PLoS One*. 2010 Dec 10;5(12):e15234.
129. Medina DA, Pedreros JP, Turiel D, Quezada N, Pimentel F, Escalona A, et al. Distinct patterns in the gut microbiota after surgical or medical therapy in obese patients. *PeerJ*. 2017 Jun 20;5:e3443.
130. Gibson SAW, McFarlan C, Hay S, Macfarlane GT. Significance of microflora in proteolysis in the colon. *Appl Environ Microbiol*. 1989;55(3):679–83.
131. Ramezani A, Raj DS. The Gut Microbiome, Kidney Disease, and Targeted Interventions. *J Am Soc Nephrol*. 2014 Apr 1;25(4):657–70.
132. Wu GD, Compher C, Chen EZ, Smith SA, Shah RD, Bittinger K, et al. Comparative metabolomics in vegans and omnivores reveal constraints on diet-dependent gut microbiota metabolite production. *Gut*. 2016 Jan;65(1):63–72.
133. Nicholson JK, Holmes E, Kinross J, Burcelin R, Gibson G, Jia W, et al. Host-Gut Microbiota Metabolic Interactions. *Science* (80-). 2012 Jun 8;336(6086):1262–7.
134. Al Assal K. Análise da microbiota fecal em pacientes obesas graves portadoras de diabetes mellitus tipo 2 submetidas à derivação gástrica em Y de Roux. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2018.

135. Prawitt J, Caron S, Staels B. Bile acid metabolism and the pathogenesis of type 2 diabetes. *Curr Diab Rep*. 2011;11(3):160–6.
136. Gerhard GS, Styer AM, Wood GC, Roesch SL, Petrick AT, Gabrielsen J, et al. A Role for Fibroblast Growth Factor 19 and Bile Acids in Diabetes Remission After Roux-en-Y Gastric Bypass. *Diabetes Care*. 2013 Jul 1;36(7):1859–64.
137. Forman BM, Goode E, Chen J, Oro AE, Bradley DJ, Perlmann T, et al. Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites. *Cell*. 1995;81(5):687–93.
138. Sipka S, Bruckner G. The Immunomodulatory Role of Bile Acids. *Int Arch Allergy Immunol*. 2014;165(1):1–8.
139. Calmus Y, Guehot J, Podevin P, Bonnefis M-T, Giboudeau J, Poupon R. Differential effects of chenodeoxycholic and ursodeoxycholic acids on interleukin 1, interleukin 6 and tumor necrosis factor- α production by monocytes. *Hepatology*. 1992 Sep;16(3):719–23.
140. Podevin P, Rosmorduc O, Conti F, Calmus Y, Meier PJ, Poupon R. Bile acids modulate the interferon signalling pathway. *Hepatology*. 1999 Jun;29(6):1840–7.
141. Duboc H, Taché Y, Hofmann AF. The bile acid TGR5 membrane receptor: From basic research to clinical application. *Dig Liver Dis*. 2014;46(4):302–12.
142. Wammers M, Schupp A-K, Bode JG, Ehling C, Wolf S, Deenen R, et al. Reprogramming of pro-inflammatory human macrophages to an anti-inflammatory phenotype by bile acids. *Sci Rep*. 2018 Dec 10;8(1):255.
143. Velasquez M, Ramezani A, Manal A, Raj D. Trimethylamine N-Oxide: The Good, the Bad and the Unknown. *Toxins (Basel)*. 2016 Nov 8;8(11):326.

144. Koeth RA, Wang Z, Levison BS, Buffa JA, Org E, Sheehy BT, et al. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat Med*. 2013 Apr 7;19(5):576–85.
145. Li Y, Jadhav K, Zhang Y. Bile acid receptors in non-alcoholic fatty liver disease. *Biochem Pharmacol*. 2013 Dec;86(11):1517–24.
146. Maruyama T, Miyamoto Y, Nakamura T, Tamai Y, Okada H, Sugiyama E, et al. Identification of membrane-type receptor for bile acids (M-BAR). *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;298(5):714–9.
147. Kawamata Y, Fujii R, Hosoya M, Harada M, Yoshida H, Miwa M, et al. A G protein-coupled receptor responsive to bile acids. *J Biol Chem*. 2003;278(11):9435–40.
148. Cha YS. Effects of L-carnitine on obesity, diabetes, and as an ergogenic aid. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2008;17(SUPPL. 1):306–8.
149. Mingrone G. Carnitine in Type 2 Diabetes. *Ann N Y Acad Sci*. 2004 Nov;1033(1):99–107.
150. Randle PJ. Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years. *Diabetes / Metab Rev*. 1998 Dec;14(4):263–83.
151. Koves TR, Ussher JR, Noland RC, Slentz D, Mosedale M, Ilkayeva O, et al. Mitochondrial Overload and Incomplete Fatty Acid Oxidation Contribute to Skeletal Muscle Insulin Resistance. *Cell Metab*. 2008 Jan;7(1):45–56.
152. Miura Y. The biological significance of ω -oxidation of fatty acids. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2013;89(8):370–82.
153. Reddy JK, Hashimoto T. β -oxidation and peroxisome proliferator activated receptor α : An Adaptive Metabolic System. *Annu Rev Nutr*. 2001 Jul;21(1):193–230.

154. Ariza AC, Deen PMT, Robben JH. The Succinate Receptor as a Novel Therapeutic Target for Oxidative and Metabolic Stress-Related Conditions. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2012;3.
155. Duca FA, Yue JTY. Fatty acid sensing in the gut and the hypothalamus: In vivo and in vitro perspectives. *Mol Cell Endocrinol*. 2014 Nov;397(1–2):23–33.
156. Chavez JA, Summers SA. A Ceramide-Centric View of Insulin Resistance. *Cell Metab*. 2012 May;15(5):585–94.
157. Björkhem I. On the mechanism of regulation of omega oxidation of fatty acids. *J Biol Chem*. 1976;251(17):5259–66.
158. Patsouris D, Reddy JK, Müller M, Kersten S. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α Mediates the Effects of High-Fat Diet on Hepatic Gene Expression. *Endocrinology*. 2006 Mar;147(3):1508–16.
159. Ribel-Madsen A, Ribel-Madsen R, Bräms C, Newgard CB, Vaag AA, Hellgren LI. Plasma acylcarnitine profiling indicates increased fatty acid oxidation relative to tricarboxylic acid cycle capacity in young, healthy low birth weight men. *Physiol Rep*. 2016;4(19):1–18.
160. Dröse S. Differential effects of complex II on mitochondrial ROS production and their relation to cardioprotective pre- and postconditioning. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg*. 2013 May;1827(5):578–87.
161. Missailidis C, Hällqvist J, Qureshi AR, Barany P, Heimbürger O, Lindholm B, et al. Serum Trimethylamine-N-Oxide Is Strongly Related to Renal Function and Predicts Outcome in Chronic Kidney Disease. Burdmann EA, editor. *PLoS One*. 2016 Jan 11;11(1):e0141738.
162. Seldin MM, Meng Y, Qi H, Zhu W, Wang Z, Hazen SL, et al. Trimethylamine N-Oxide Promotes Vascular Inflammation Through Signaling of Mitogen-Activated Protein Kinase and Nuclear Factor- κ B. *J Am Heart Assoc*. 2016 Feb 23;5(2).

163. Ramezani A, Massy ZA, Meijers B, Evenepoel P, Vanholder R, Raj DS. Role of the Gut Microbiome in Uremia: A Potential Therapeutic Target. *Am J Kidney Dis*. 2016 Mar;67(3):483–98.
164. Motojima M, Hosokawa A, Yamato H, Muraki T, Yoshioka T. Uremic toxins of organic anions up-regulate PAI-1 expression by induction of NF- κ B and free radical in proximal tubular cells. *Kidney Int*. 2003 May;63(5):1671–80.
165. Johnson RJ, Nakagawa T, Jalal D, Sanchez-Lozada LG, Kang D-H, Ritz E. Uric acid and chronic kidney disease: which is chasing which? *Nephrol Dial Transplant*. 2013 Sep 1;28(9):2221–8.
166. Kotsis V, Stabouli S, Bouldin M, Low A, Toumanidis S, Zakopoulos N. Impact of Obesity on 24-Hour Ambulatory Blood Pressure and Hypertension. *Hypertension*. 2005 Apr;45(4):602–7.
167. Nakagawa T, Tuttle KR, Short RA, Johnson RJ. Hypothesis: fructose-induced hyperuricemia as a causal mechanism for the epidemic of the metabolic syndrome. *Nat Clin Pract Nephrol*. 2005 Dec 1;1(2):80–6.
168. Khosla UM, Zharikov S, Finch JL, Nakagawa T, Roncal C, Mu W, et al. Hyperuricemia induces endothelial dysfunction. *Kidney Int*. 2005 May;67(5):1739–42.
169. Song R, Peng W, Zhang Y, Lv F, Wu H-K, Guo J, et al. Central role of E3 ubiquitin ligase MG53 in insulin resistance and metabolic disorders. *Nature*. 2013 Feb 27;494(7437):375–9.
170. Bhole V, Choi JWJ, Woo Kim S, de Vera M, Choi H. Serum Uric Acid Levels and the Risk of Type 2 Diabetes: A Prospective Study. *Am J Med*. 2010 Oct;123(10):957–61.
171. Sui X, Church TS, Meriwether RA, Lobelo F, Blair SN. Uric acid and the development of metabolic syndrome in women and men. *Metabolism*. 2008 Jun;57(6):845–52.

172. Choi HK, Ford ES. Prevalence of the metabolic syndrome in individuals with hyperuricemia. *Am J Med.* 2007 May;120(5):442–7.
173. Lu W, Xu Y, Shao X, Gao F, Li Y, Hu J, et al. Uric acid produces an inflammatory response through activation of NF- κ B in the hypothalamus: implications for the pathogenesis of metabolic disorders. *Sci Rep.* 2015 Jul 16;5:12144.
174. Thaler JP, Yi C-X, Schur EA, Guyenet SJ, Hwang BH, Dietrich MO, et al. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *J Clin Invest.* 2012 Jan 3;122(1):153–62.
175. Seligson D SH. The conversion of alloxan to alloxanic acid in plasma. *J Biol Chem.* 1951;190(2):647–57.
176. J L. Lectures on organic chemistry: delivered during the winter session. *Lancet.* 2013;305–7.
177. Soberon G, Cohen PP. Peroxidatic formation of alloxan from uric acid by leucocytes. *Arch Biochem Biophys.* 1963 Dec;103(3):331–7.
178. Elsner M, Tiedge M, Lenzen S. Mechanism underlying resistance of human pancreatic beta cells against toxicity of streptozotocin and alloxan. *Diabetologia.* 2003 Dec 1;46(12):1713–4.
179. Nelson L, Boquist L. Effects of alloxan and streptozotocin on calcium transport in isolated mouse liver mitochondria. *Cell Calcium.* 1982 May;3(2):191–8.
180. Zarychanski R, Houston DS. Anemia of chronic disease: A harmful disorder or an adaptive, beneficial response? (Canadian Medical Association Journal (2008) 179 (333-337)). *Cmaj.* 2008;179(5):449.
181. Modesitt SC, Hallowell PT, Slack-Davis JK, Michalek RD, Atkins KA, Kelley SL, et al. Women at extreme risk for obesity-related carcinogenesis: Baseline endometrial pathology and impact of bariatric

surgery on weight, metabolic profiles and quality of life. *Gynecol Oncol*. 2015;138(2):238–45.

182. Wang Z, Hall SD, Maya JF, Li L, Asghar A, Gorski JC. Diabetes mellitus increases the in vivo activity of cytochrome P450 2E1 in humans. *Br J Clin Pharmacol*. 2003;55(1):77–85.

183. Chen M, Krishnamurthy A, Mohamed AR, Green R. Hematological Disorders following Gastric Bypass Surgery: Emerging Concepts of the Interplay between Nutritional Deficiency and Inflammation. *Biomed Res Int*. 2013;2013:1–8.

184. Jasiewicz B, Mrówczyńska L, Malczewska-Jaskóła K. Synthesis and haemolytic activity of novel salts made of nicotine alkaloids and bile acids. *Bioorg Med Chem Lett*. 2014 Feb;24(4):1104–7.

185. Lichtman SS. A new procedure for the estimation of bile salts in body fluids based on bile salt hemolysis. *J Biol Chem*. 1934;107:717–30.

186. Nath KA. Heme, Iron, and the Kidney. *Blood*. 2010;116(21):SCI-26.

187. Abraham NG, Lavrovsky Y, Schwartzman ML, Stoltz RA, Levere RD, Gerritsen ME, et al. Transfection of the human heme oxygenase gene into rabbit coronary microvessel endothelial cells: protective effect against heme and hemoglobin toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Jul 18;92(15):6798–802.

188. Wang XX, Jiang T, Shen Y, Caldas Y, Miyazaki-Anzai S, Santamaria H, et al. Diabetic Nephropathy Is Accelerated by Farnesoid X Receptor Deficiency and Inhibited by Farnesoid X Receptor Activation in a Type 1 Diabetes Model. *Diabetes*. 2010 Nov 1;59(11):2916–27.

189. Watanabe M, Houten SM, Wang L, Moschetta A, Mangelsdorf DJ, Heyman RA, et al. Bile acids lower triglyceride levels via a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c. *J Clin Invest*. 2004 May 15;113(10):1408–18.

190. Zhang Y. Peroxisome proliferator-activated receptor- coactivator 1 (PGC-1) regulates triglyceride metabolism by activation of the nuclear receptor FXR. *Genes Dev.* 2004 Jan 15;18(2):157–69.
191. Sun L, Halaihel N, Zhang W, Rogers T, Levi M. Role of Sterol Regulatory Element-binding Protein 1 in Regulation of Renal Lipid Metabolism and Glomerulosclerosis in Diabetes Mellitus. *J Biol Chem.* 2002 May 24;277(21):18919–27.
192. Jiang T, Wang XX, Scherzer P, Wilson P, Tallman J, Takahashi H, et al. Farnesoid X Receptor Modulates Renal Lipid Metabolism, Fibrosis, and Diabetic Nephropathy. *Diabetes.* 2007 Oct 1;56(10):2485–93.
193. Ishigaki N, Yamamoto T, Shimizu Y, Kobayashi K, Yatoh S, Sone H, et al. Involvement of glomerular SREBP-1c in diabetic nephropathy. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Dec;364(3):502–8.
194. Simpson AECM. The cytochrome P450 4 (CYP4) family. *Gen Pharmacol Vasc Syst.* 1997 Mar;28(3):351–9.
195. Fer M, Corcos L, Dréano Y, Plée-Gautier E, Salaün J-P, Berthou F, et al. Cytochromes P450 from family 4 are the main omega hydroxylating enzymes in humans: CYP4F3B is the prominent player in PUFA metabolism. *J Lipid Res.* 2008 Nov;49(11):2379–89.
196. Stadler K, Goldberg IJ, Susztak K. The evolving understanding of the contribution of lipid metabolism to diabetic kidney disease. *Curr Diab Rep.* 2015 Jul 10;15(7):40.
197. Hardwick JP. Cytochrome P450 omega hydroxylase (CYP4) function in fatty acid metabolism and metabolic diseases. *Biochem Pharmacol.* 2008 Jun;75(12):2263–75.
198. Kimmelstiel P, Wilson C. Intercapillary lesions in the glomeruli of the kidney. *Am J Pathol.* 1936 Jan;12(1):83–98.7.

199. Lee HS, Lee JS, Koh HI, Ko KW. Intraglomerular lipid deposition in routine biopsies. *Clin Nephrol.* 1991 Aug;36(2):67–75.
200. Kume S, Uzu T, Araki S -i., Sugimoto T, Isshiki K, Chin-Kanasaki M, et al. Role of altered renal lipid metabolism in the development of renal injury induced by a high-fat diet. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(10):2715-23.
201. Wang Z, Jiang T, Li J, Proctor G, McManaman JL, Lucia S, et al. Regulation of renal lipid metabolism, lipid accumulation, and glomerulosclerosis in FVBdb/db mice with type 2 diabetes. *Diabetes.* 2005;54(8):2328-35.
202. Hsu C, McCulloch CE, Iribarren C, Darbinian J, Go AS. Body mass index and risk for end-stage renal disease. *Ann Intern Med.* 2006;144(1):21-8.
203. Caligiuri SPB, Blydt-Hansen T, Love K, Grégoire M, Taylor CG, Zahradka P, et al. Evidence for the use of glomerulomegaly as a surrogate marker of glomerular damage and for alpha-linolenic acid-rich oils in the treatment of early obesity-related glomerulopathy in a diet-induced rodent model of obesity. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2014;39(8):951-9.
204. Kovesdy C, Furth S, Zoccali C, World Kidney Day. Obesity and kidney disease: Hidden consequences of the epidemic. *Indian J Nephrol.* 2017;27(2):85.
205. Wu M-J, Chang C-S, Cheng C-H, Chen C-H, Lee W-C, Hsu Y-H, et al. Colonic transit time in long-term dialysis patients. *Am J Kidney Dis.* 2004;44(2):322-7.
206. Bammens B, Verbeke K, Vanrenterghem Y, Evenepoel P. Evidence for impaired assimilation of protein in chronic renal failure. *Kidney Int.* 2003;64(6):2196-203.
207. Sorensen LB. Role of the intestinal tract in the elimination of uric acid. *Arthritis Rheum.* 1965;8(5):694-706.

208. Raj Krishnamurthy VM, Wei G, Baird BC, Murtaugh M, Chonchol MB, Raphael KL, et al. High dietary fiber intake is associated with decreased inflammation and all-cause mortality in patients with chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2012;81(3):300-6.
209. Wandersman C, Delepelaire P. Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annu Rev Microbiol.* 2004;58(1):611-47.
210. Lazarus B, Chen Y, Wilson FP, Sang Y, Chang AR, Coresh J, et al. Proton pump inhibitor use and the risk of chronic kidney disease. *JAMA Intern Med.* 2016;176(2):238.
211. Fernandez-Prado R, Esteras R, Peres-Gomes MV, Garcia-Iguacel C, Gonzalez-Parra E, Sanz AB, Ortiz A, Sanchez-Nino MD. Nutrients turned into toxins: microbiota modulation of nutrient properties in chronic kidney disease. *Nutrients.* 2017;9(5):pii:E489489.
212. Cheng J, Chen C, Kristopher KW, Manna SK, Scerba M, Friedman FK, et al. Identification of 2-piperidone as a biomarker of CYP2E1 activity through metabolomic phenotyping. *Toxicol Sci.* 2013;135(1):37-47.
213. Schäfer A, Galuppo P, Fraccarollo D, Vogt C, Widder JD, Pfrang J, et al. Increased cytochrome P4502E1 expression and altered hydroxyeicosatetraenoic acid formation mediate diabetic vascular dysfunction. *Diabetes.* 2010;59(8):2001-9.
214. Krattinger R, Boström A, Lee SML, Thasler WE, Schiöth HB, Kullak-Ublick GA, et al. Chenodeoxycholic acid significantly impacts the expression of miRNAs and genes involved in lipid, bile acid and drug metabolism in human hepatocytes. *Life Sci.* 2016;156:47-56.
215. Hankir MK, Seyfried F, Hintschich CA, Diep T-A, Kleberg K, Kranz M, et al. Gastric bypass surgery recruits a gut PPAR- α -Striatal D1R pathway to reduce fat appetite in obese rats. *Cell Metab.* 2017;25(2):335-44.

216. Ament Z, Masoodi M, Griffin JL. Applications of metabolomics for understanding the action of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in diabetes, obesity and cancer. *Genome Med.* 2012;4(4):32.
217. Cheng X, Klaassen CD. Critical role of PPAR- α in perfluorooctanoic acid- and perfluorodecanoic acid-induced downregulation of Oatp uptake transporters in mouse livers. *Toxicol Sci.* 2008;106(1):37-45.
218. Jung D, Fried M, Kullak-Ublick GA. Human apical sodium-dependent bile salt transporter gene (SLC10A2) is regulated by the peroxisome proliferator-activated receptor α . *J Biol Chem.* 2002;277(34):30559-66.
219. Tavares V, Hirata MH, Hirata RDC. Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (Ppargama): estudo molecular na homeostase da glicose, metabolismo de lipídeos e abordagem terapêutica. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2007 Jun;51(4):526–33.
220. Pineda Torra I, Claudel T, Duval C, Kosykh V, Fruchart J-C, Staels B. Bile Acids Induce the Expression of the Human Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α Gene via Activation of the Farnesoid X Receptor. *Mol Endocrinol.* 2003 Feb;17(2):259–72.
221. Colin S, Briand O, Touche V, Wouters K, Baron M, Pattou F, et al. Activation of intestinal peroxisome proliferator-activated receptor- increases high-density lipoprotein production. *Eur Heart J.* 2013 Aug 2;34(32):2566–74.
222. Jay MA, Ren J. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. *Curr Diabetes Rev.* 2007 Feb;3(1):33–9.
223. Son N-H, Yu S, Tuinei J, Arai K, Hamai H, Homma S, et al. PPAR γ -induced cardioplipotoxicity in mice is ameliorated by PPAR α deficiency despite increases in fatty acid oxidation. *J Clin Invest.* 2010 Oct 1;120(10):3443–54.

224. Waxman DJ. P450 Gene Induction by Structurally Diverse Xenochemicals: Central Role of Nuclear Receptors CAR, PXR, and PPAR. *Arch Biochem Biophys*. 1999 Sep;369(1):11–23.
225. Honkakoski P, Negishi M. Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors. *Biochem J*. 2000 Apr 15;347(Pt 2):321–37.
226. Park CW, Kim HW, Ko SH, Chung HW, Lim SW, Yang CW, et al. Accelerated diabetic nephropathy in mice lacking the peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Diabetes*. 2006 Apr;55(4):885–93.
227. Li L, Emmett N, Mann D, Zhao X. Fenofibrate attenuates tubulointerstitial fibrosis and inflammation through suppression of nuclear factor- κ B and transforming growth factor- β 1/Smad3 in diabetic nephropathy. *Exp Biol Med*. 2010 Mar;235(3):383–91.
228. Portilla D, Mandel LJ, Bar-Sagi D, Millington DS. Anoxia induces phospholipase A2 activation in rabbit renal proximal tubules. *Am J Physiol Physiol*. 1992 Mar;262(3):F354–60.
229. Wabitsch M. Gastrointestinal Endocrinology in Bariatric Surgery. *Endocr Dev*. 2017;32:124–38.
230. Lutz TA, Bueter M. The physiology underlying Roux-en-Y gastric bypass: a status report. *Am J Physiol Integr Comp Physiol*. 2014 Dec;307(11):R1275–91.
231. Abdeen G, le Roux C. Mechanism Underlying the Weight Loss and Complications of Roux-en-Y Gastric Bypass. Review. *Obes Surg*. 2016 Feb 3;26(2):410–21.
232. Chiang JYL. Bile acids: regulation of synthesis. *J Lipid Res*. 2009 Oct;50(10):1955–66.

233. Wahlström A, Sayin SI, Marschall H-U, Bäckhed F. Intestinal Crosstalk between Bile Acids and Microbiota and Its Impact on Host Metabolism. *Cell Metab.* 2016 Jul;24(1):41–50.
234. Bloomgarden Z. Diabetes and branched-chain amino acids: What is the link? *J Diabetes.* 2018 May;10(5):350–2.
235. Wijayatunga NN, Sams VG, Dawson JA, Mancini ML, Mancini GJ, Moustaid-Moussa N. Roux-en-Y gastric bypass surgery alters serum metabolites and fatty acids in patients with morbid obesity. *Diabetes Metab Res Rev.* 2018 Sep 19;e3045.
236. Lips MA, Van Klinken JB, Van Harmelen V, Dharuri HK, 'T Hoen PAC, Laros JFJ, et al. Roux-en-Y gastric bypass surgery, but not calorie restriction, reduces plasma branched-chain amino acids in obese women independent of weight loss or the presence of type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2014;37(12):3150–6.
237. Saeidi N, Meoli L, Nestoridi E, Gupta NK, Stephanie K, Kucharczyk J, et al. Reprogramming of Intestinal Glucose Metabolism and Glycemic Control in Rats After Gastric Bypass. *Natl Inst Heal Public Access.* 2013;2(1):13–25.
238. Arora T, Velagapudi V, Pournaras DJ, Welbourn R, Le Roux CW, Orešič M, et al. Roux-en-Y gastric bypass surgery induces early plasma metabolomic and lipidomic alterations in humans associated with diabetes remission. *PLoS One.* 2015;10(5):1–10.
239. Yu H, Ni Y, Bao Y, Zhang P, Zhao A, Chen T, et al. Chenodeoxycholic Acid as a Potential Prognostic Marker for Roux-en-Y Gastric Bypass in Chinese Obese Patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(11):4222–30.
240. Narath SH, Mautner SI, Svehlikova E, Schultes B, Pieber TR, Sinner FM, et al. An untargeted metabolomics approach to characterize

short-term and long-term metabolic changes after bariatric surgery. *PLoS One*. 2016;11(9):1–18.

241. Sarosiek K, Pappan KL, Gandhi A V., Saxena S, Kang CY, McMahon H, et al. Conserved Metabolic Changes in Nondiabetic and Type 2 Diabetic Bariatric Surgery Patients: Global Metabolomic Pilot Study. *J Diabetes Res*. 2016;2016:9–11.

242. Lopes TIB, Geloneze B, Pareja JC, Calixto AR, Ferreira MMC, Marsaioli AJ. “Omics” Prospective Monitoring of Bariatric Surgery: Roux-En-Y Gastric Bypass Outcomes Using Mixed-Meal Tolerance Test and Time-Resolved 1 H NMR-Based Metabolomics. *Omi A J Integr Biol*. 2016;20(7):415–23.

243. Luo P, Yu H, Zhao X, Bao Y, Hong CS, Zhang P, et al. Metabolomics Study of Roux-en-Y Gastric Bypass Surgery (RYGB) to Treat Type 2 Diabetes Patients Based on Ultraperformance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *J Proteome Res*. 2016;15(4):1288–99.

244. Zhao L, Ni Y, Yu H, Zhang P, Zhao A, Bao Y, et al. Serum stearic acid/palmitic acid ratio as a potential predictor of diabetes remission after Roux-en-Y gastric bypass in obesity. *FASEB J*. 2017 Apr;31(4):1449–60.

245. Hubal MJ, Nadler EP, Ferrante SC, Barberio MD, Suh JH, Wang J, et al. Circulating adipocyte-derived exosomal MicroRNAs associated with decreased insulin resistance after gastric bypass. *Obesity*. 2017;25(1):102–10.

246. Sridharan GV, D'Alessandro M, Bale SS, Bhagat V, Gagnon H, Asara JM, et al. Multi-omic network-based interrogation of rat liver metabolism following gastric bypass surgery featuring SWATH proteomics. *Technology*. 2017;05(03):139–84.

247. Wu Q, Zhang X, Zhong M, Han H, Liu S, Liu T, et al. Effects of Bariatric Surgery on Serum Bile Acid Composition and Conjugation in a Diabetic Rat Model. *Obes Surg*. 2016 Oct 3;26(10):2384–92.
248. Seridi L, Leo GC, Dohm GL, Pories WJ, Lenhard J. Time course metabolome of Roux-en-Y gastric bypass confirms correlation between leptin, body weight and the microbiome. Hu C, editor. *PLoS One*. 2018 May 31;13(5):e0198156.
249. Li Q-R, Wang Z-M, Wewer Albrechtsen NJ, Wang D-D, Su Z-D, Gao X-F, et al. Systems Signatures Reveal Unique Remission-path of Type 2 Diabetes Following Roux-en-Y Gastric Bypass Surgery. *EBioMedicine*. 2018 Feb;28:234–40.
250. Picart-Armada S, Fernández-Albert F, Vinaixa M, Rodríguez MA, Aivio S, Stracker TH, et al. Null diffusion-based enrichment for metabolomics data. *PLoS One*. 2017;12(12):1–21.
251. Barupal DK, Fiehn O. Chemical Similarity Enrichment Analysis (ChemRICH) as alternative to biochemical pathway mapping for metabolomic datasets. *Sci Rep*. 2017;7(1):14567.