

Priscila Costa Estabile

Avaliação das Células L de acordo com extensão da Alça Biliopancreática em pacientes com obesidade grave e Diabetes tipo 2 submetidos à Gastroplastia com Derivação em Y de Roux

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

Programa de Ciências em Gastroenterologia

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurelio Santo

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 01 de novembro de 2011. A
versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo

2023

Priscila Costa Estabile

Avaliação das Células L de acordo com extensão da Alça Biliopancreática em pacientes com obesidade grave e Diabetes tipo 2 submetidos à Gastroplastia com Derivação em Y de Roux

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

Programa de Ciências em Gastroenterologia

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurelio Santo

São Paulo

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Estabile, Priscila Costa

Avaliação das células L de acordo com a extensão da alça biliopancreática em pacientes com obesidade grave e diabetes tipo 2 submetidos à gastroplastia com derivação em Y de Roux / Priscila Costa Estabile. -- São Paulo, 2023.

Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências em Gastroenterologia.
Orientador: Marco Aurelio Santo.

Descritores: 1.Células L 2.Peptídeo 1 semelhante ao glucagon 3.Peptídeo YY 4.Alça biliopancreática 5.Derivação gástrica

USP/FM/DBD-154/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

À minha família de origem, meus amados pais Silvio Antonio Estabile e Maria do Socorro Costa Estabile, pelo apoio e incentivo à formação acadêmica, paciência e amor nessa jornada.

Aos meus amados irmãos Silvo Antonio Estabile Júnior e Daniele Costa Estabile pela paciência e carinho, sorrisos que tornaram essa trajetória mais leve, por nossos passos desde a infância.

Minha querida madrinha Márcia Perezynski pelo apoio e carinho, incentivo à vida acadêmica.

Ao meu querido amigo Marcel Giraldes pelo apoio, boas risadas e incentivo a seguir em frente independente desafio a ser superado.

Aos meus amados avós paternos Augebe Bastos Strada e Maria da Conceição Pereira Strada (*in memoriam*), amados avós maternos Vicente Cleber Pinheiro e Núbia Costa Pinheiro (*in memoriam*), sei que aí de cima estiveram comigo durante esta jornada.

AGRADECIMENTOS

A Deus por minha jornada.

Aos queridos Pacientes pela confiança diária durante a realização pesquisa.

A Faculdade de Medicina da USP pela oportunidade realizar este projeto e me tornar parte dessa instituição.

Ao Prof. Dr. Marco Aurelio Santo, meu orientador e amigo, pelo aprendizado e carinho, por realizarmos esse árduo trabalho.

Ao amigo Dr. Fábio Milleo pelo incentivo e parceria acadêmica.

A Profa. Dra. Márcia Saldanha Kubrusly, amiga e mentora, me ensinou sobre ser pesquisadora, por todos árdusos momentos no desenvolvimento do estudo.

Ao Prof. Dr. Cleva, por ensinar redação científica e muito contribuiu na construção desse trabalho.

Ao Prof. Denis Pajewski, que muito contribuiu na aquisição de pacientes à pesquisa, pelas boas discussões científicas.

A Profa. Dra. Sheila Siqueira, amiga e mentora, sempre solícita na pesquisa.

Ao Prof. Dr. Flávio Galvão, pela oportunidade de realizar parte do estudo no Laboratório de Transplante e Cirurgia do Fígado (LIM-37), na FMUSP.

A Profa. Dra. Suzane Kioko, mentora no PAE, me conduziu na experiência de docência na FMUSP, Sra. Tatiane e amigas que realizaram estágio PAE comigo.

A toda equipe de enfermagem e nutrição do serviço de Cirurgia Bariátrica e Metabólica do HCFMUSP, às Sras. Tatiana e Erica por todo cuidado com os pacientes.

Ao corpo de Residência do serviço de Cirurgia Bariátrica e Metabólica do HCFMUSP, sempre solícito na condução dos pacientes da pesquisa.

A toda equipe do serviço de Endoscopia Gastrointestinal do HCFMUSP, especialmente ao Prof. Dr. Robson Ishida, por sua dedicação ao projeto.

A toda equipe do serviço de Anatomia Clínica e Patológica do HCFMUSP, em especial ao residente Dr. André Hirayama, por sua contribuição no projeto.

A toda equipe do Laboratório de Imuno-histoquímica da FMUSP, especial a Sandra e Ângela por sua contribuição do projeto.

A toda equipe da Pós-Graduação do Programa Ciências em Gastroenterologia, em especial a Sra. Wilma Libério, Sra. Débora, Sra. Taina, Sra. Rosângela e Sra. Fabiana, por todo apoio e suporte.

Aos queridos amigos Alexandre Gadducci, Lilian Cardia, Mariana Fior, Andrea Crespo, Caroline Faria, Priscila Caproni, pelas boas conversas e risadas, tornando essa jornada da pós-graduação leve.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

“Na vida, não existe nada a temer, mas a entender.”

(Marie Curie)

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

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

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

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

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

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de símbolos

Lista de tabela

Lista de gráficos

Lista de figuras

Resumo

Abstract

1.Introdução	23
2. Revisão da literatura.....	32
2.1 Tratamento cirúrgico da obesidade grave por GDYR.....	32
2.2 Célula I e entero-hormônios.....	34
2.3 Relação do ácido biliar e microbiota intestinal e Célula L.....	38
2.4 Genes alvos: GLP-1 e PYY ₃₋₃₆	40
2.5 Extensões das alças biliopancreática GDYR.....	43
3.Hipótese.....	48
4.Objetivo	50
5. Materiais e métodos.....	52
5.1 Local de execução do trabalho.....	52
5.2 Aspectos éticos.....	52
5.3 Casuística.....	52
5.4 Dados antropométricos.....	53
5.5 Critérios de inclusão.....	54
5.6 Critérios de exclusão.....	55
5.7 Técnica cirúrgica.....	55

5.7.1 Técnica de mensuração das alças intestinais.....	56
5.8 Coleta das biópsias	56
5.8.1 Biópsia pré-operatória.....	56
5.8.2 Biópsia transoperatória.....	57
5.8.3 Biópsia pós-operatória.....	57
5.9 Biópsia intestinal.....	58
5.9.1 Preparação das biopsias.....	58
5.9.2 Análise Célula L por imuno-histoquímica.....	59
5.9.3 Análise de expressão de GLP-1 e PYY por RT-qPCR.....	60
5.9.3.1 Extração do RNA e quantificação.....	60
5.9.3.2 Síntese de cDNA.....	61
5.9.3.3 RT-qPCR dos genes alvos GLP-1 e PYY.....	62
5.9.4 Análise estática.....	64
6 Resultados.....	65
6.1.1 Dados antropométricos.....	66
6.1.2 Célula L.....	67
6.1.2.1 Imunomarcção de célula L por PYY.....	67
6.1.2.1 Imunomarcção de célula L por GLP-1.....	71
6.1.2.3 Expressão mRNA pelo gene alvo PYY.....	76
6.1.2.4 Expressão mRNA pelo gene alvo GLP-1.....	79
7 Discussão.....	83
8 Conclusão.....	86
9 Anexos.....	88
9.1 Termo de consentimento livre esclarecimento.....	89
9.2 Parecer consubstanciado do CEP.....	93
10 Referências.....	96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IMC	Índice de massa corpórea
DM2	Diabete Mellitus tipo 2
CBM	Cirurgia bariátrica e metabólica
GIP	<i>Gastric inhibitory polypeptide</i>
GLP1	<i>Glucagon like peptídeo 1</i>
PYY ₃₋₃₆	<i>Peptide YY(3–36)</i>
GDYR	<i>Gastroplastia com Derivação em Y de Roux</i>
NPY	Neuropeptídeo Y
CKK	Colecistocinina
NT	Neurotensina
PP	Polipeptídeo pancreático
IHQ	<i>Imuno-histoquímica</i>
qRT-PCR	<i>Quantitative Real Time polymerase chain reaction</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PNS	Pesquisa Nacional de Saúde
VIGITEL	Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
WHO	World Health Organization
SBCBM	Sociedade Brasileira de Cirurgia Bariátrica e Metabólica

CFM	Conselho Federal de Medicina
STAMPEDE	Surgical Treatment and Medication Potentially Eradicate Diabetes Efficiently
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
STAMPEDE	Surgical Treatment and Medication Potentially Eradicate Diabetes Efficiently
HbA1c	Hemoglobina glicada
TG	Trato Gastrointestinal
ABP	Alça Biliopancreática
AA	Alça alimentar
HOMA-IR	Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance
PCR	proteína C reativa
GPBAR	ácido biliar ligado a proteína G
GPBA – A	receptor de ácido biliar acoplado à proteína A
POMC	Pró-opiomelanocortina
AMPc	adenosina monofosfato cíclico
GLUTag	expressão de glucagon
GRPP	polipeptídeo pancreático
GPR41/43	gene 41/43 acoplado a proteína G
Lgr 5+	receptor 5 acoplado a proteína G
GLP1-R	receptor do GLP-1
Y2R	receptor do PYY

LISTA DE SÍMBOLOS

μg	Micrograma
μL	Microlitro
$2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$	quantificação relativa <i>Threshold cycle</i>
Vs	Versus
M	Metro
Cm	Centímetro
TM	<i>Trademark</i>
P	<i>p-value</i>
TaqMan	Sonda de fluorescência gerada após atividade exonuclease 5'→3' da Taq DNA polimerase
Hs_	Ensaio detecta o transcrito alvo com sensibilidade de 1.000 a 30.000 vezes maior do que o transcrito homólogo mais próximo
_g1	Ensaio pode detectar DNA genômico; os primers e sondas do ensaio podem estar dentro de um único éxon
_m1	Sonda do ensaio abrange uma junção de éxon e não detecta DNA genômico
_s	Primers e sondas do ensaio são projetados dentro de um único éxon; o ensaio detecta DNA genômico

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etiologia multifatorial da obesidade	26
Figura 2. Gastroplastia com Derivação em Y de Roux (GDYR) no tratamento da obesidade.....	34
Figura 3. Resposta pós-prandial do GLP-1 e sua ação neuroendócrina restabelecendo o equilíbrio metabolismo humano.....	35
Figura 4. Esquema de células L liberando GLP-1 para o pâncreas por meio de estímulo após ingesta alimentar, onde GLP-1 é liberado e sinaliza para células β	36
Figura 5. Produtos do processamento de proglucagon em células L e células α	43
Figura 6. Bioimpedância elétrica.....	54
Figura 7. Ilustração esquemática da gastroplastia em derivação em Y de Roux (GDYR).....	56
Figura 8. Ilustração de gel com presença de 6 amostras bandas 28S e 18S.....	61
Figura 9. Termociclador Applied Biosystems StepOnePlus™.....	63
Figura 10. Imunomarcção com anticorpo policlonal PYY. Observe o aumento do número de células L ponto A em relação a C.....	68
Figura 11. Imunomarcção com anticorpo policlonal GLP-1. Observe o aumento do número de células L ponto A em relação a C.....	73

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Gráfico de boxplot do total de Células L nos pontos A, B e C para anti-PYY de T1 e T2 na GDYR.....	67
Gráfico 2. Efeito relativo do total de Células L em relação ao T1 e T2 na GDYR no anti-PYY.....	69
Gráfico 3. Análise estratificada por tamanho da alça 1m e 2m nos pontos A, B e C no T1 e T2 da GDYR para anti-PYY.....	70
Gráfico 4. Gráfico de boxplot do total de Células L nos pontos A, B e C para anti-GLP-1 de T1 e T2 na GDYR.....	72
Gráfico 5. Efeito relativo do total de Células L em relação ao T1 e T2 na GDYR no anti-GLP-1.....	74
Gráfico 6. Análise estratificada por tamanho da alça 1m e 2m nos pontos A, B e C no T1 e T2 da GDYR para anti-GLP-1.....	75
Gráfico 7. Gráfico de boxplot do valor Δ Ct de mRNA para genes alvo de PYY em T1 e T2.....	77
Gráfico 8. Gráfico de boxplot do valor Δ Ct de mRNA para genes alvo de PYY em G1 e G2.....	78
Gráfico 9. Gráfico de boxplot do valor Δ Ct de mRNA para genes alvo de GLP-1 em T1 e T2.....	79
Gráfico 10. Gráfico de boxplot do valor Δ Ct de mRNA para genes alvo de GLP-1 em G1 e G2.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação do IMC e risco de comorbidades.....	23
Tabela 2. Relação dos anticorpos utilizados, indicando o clone, marca, a concentração e o fabricante.....	58
Tabela 3. Relação das sondas com respectivo gene, ensaio, localização no genoma(exon), amplicon.....	62
Tabela 4. Dados antropométricos dos pacientes antes e após GDYR do HCFMUSP.....	65
Tabela 5. Análise descritiva das variáveis: desvio padrão (DP), mediana, percentil	67
Tabela 6 Análise descritiva do número de células L de acordo com a extensão do ABP em T1 e T2.....	70
Tabela 7. Análise descritiva das variáveis: desvio padrão (DP), mediana, percentil	71
Tabela 8. Análise descritiva do número de células L de acordo com a extensão do ABP em T1 e T2.	75
Tabela 9. Valor de ΔC_t do mRNA para genes alvos PYY em T1 e T2.....	77
Tabela 10. Valor de ΔC_t do mRNA para genes alvos GLP-1 em T1 e T2.....	80

RESUMO

Estabile PC. Avaliação das Células L de acordo extensão da Alça Biliopancreática em pacientes com obesidade grave e diabetes tipo 2 submetidos à Gastroplastia com Derivação em Y de Roux[tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

INTRODUÇÃO: As incretinas secretadas pelas células L distribuídas ao longo do trato gastrointestinal auxiliam no controle glicêmico e metabólico. Pacientes com obesidade e diabetes mellitus tipo 2 apresentam secreção reduzida dos peptídeos YY (PYY) e glucagon-like peptídeo 1 (GLP-1), o que poderia ser explicado por uma menor densidade de células L. Alguns estudos sugerem que pode haver aumento da atividade das células L com aumento da extensão da alça biliopancreática (BP). **OBJETIVO:** comparar o efeito da extensão da alça biliopancreática em relação ao número e expressão das células L em pacientes submetidos à GDYR. **MÉTODOS:** estudo prospectivo e randomizado com 13 indivíduos portadores de obesidade grave e diabetes tipo 2 submetidos à GDYR, subdivido em dois grupos: com alça biliopancreática padrão medindo 100 cm (G1=6) e alça biliopancreática longa 200 cm (G2=7), com alça alimentar de 100 cm em ambos. As biópsias intestinais foram realizadas em 3 segmentos e em 2 tempos, pré-operatório (T1) e pós-operatório de 6 meses (T2): na gastro-entero anastomose (ponto A1=100cm/ponto A2=200cm), entero-entero anastomose (ponto B1=100cm/ponto B2= 100cm) e a 10 cm proximal à válvula ileocecal (ponto C1=10cm/ponto C2=10 cm). As análises de imunohistoquímica (IHQ) e qRT-PCR foram realizadas nas biópsias intestinais com anticorpos anti-GLP-1 e anti-PYY produzidos pelas células L. **RESULTADOS:** Foi encontrada maior densidade de células L no ponto C em relação aos pontos A e B em ambos os tempos. Houve aumento significativo ($p < 0,0001$) do número de células L entre os períodos T1 para T2 marcadas tanto pelo PYY (T1: $17 \pm 10,5$; T2: $23,5 \pm 10,7$) quanto pelo GLP1 (T1: $17 \pm 10,5$; T2: $23,5 \pm 10,7$) somente no ponto C. Não houve diferença significativa no número de células L entre os grupos G1 e G2 nos pontos A, B e C em ambos os tempos. Houve diferença significativa na expressão gênica do PYY de T1 para T2, não há diferença entre os grupos G1 e G2 nos pontos A (A1: $17,3 \pm 2,9$; A2: $19,9 \pm 1,9$; $p = 0,09$), B (B1: $13,7 \pm 6,6$; B2: $14,1 \pm 4,9$; $p = 0,89$) e C (C1: $13,2 \pm 2,2$; C2: $11,4 \pm 3,4$; $p = 0,32$) e também ocorre aumento da expressão gênica do GLP1 de T1 para T2, não

ocorre diferença entre os grupos G1 e G2 (A1: $20,8 \pm 4,1$; A2: $23,7 \pm 3,6$; $p=0,2$), B (B1: $14,3 \pm 7,9$; B2: $22,7 \pm 11,8$; $p=0,1$), (C1: $17 \pm 4,1$; C2 : $21,1 \pm 4,8$; $p=0,2$). Dentre os pacientes avaliados 6 meses após a cirurgia 77% apresentaram remissão da diabetes tipo 2. CONCLUSÃO: o número de células L na porção distal do intestino é maior do que na porção proximal. Houve aumento significativo do número de células L e na expressão gênica no período pós-operatório somente na porção distal do intestino delgado independentemente do tamanho da alça biliopancreática.

PALAVRAS-CHAVE: Células L, Peptídeo 1 similar ao glucagon, Peptídeo YY, Alça biliopancreática, Derivação gástrica.

ABSTRACT

Estabile PC. Evaluation of L Cells according to the extension of the Biliopancreatic Loop in patients with severe obesity and type 2 diabetes submitted to Roux-en-Y Gastroplasty[thesis]. São Paulo: Faculty of Medicine, University of São Paulo; 2023.

INTRODUCTION: Incretins secreted by L cells distributed throughout the gastrointestinal tract help in glycemic and metabolic control. Patients with obesity and type 2 diabetes mellitus have reduced secretion of peptides YY (PYY) and glucagon-like peptide 1 (GLP-1), which could be explained by a lower density of L cells. L-cell activity with increased extension of the biliopancreatic loop (BP). **OBJECTIVE:** to compare the effect of biliopancreatic loop extension in relation to the number and expression of L cells in patients undergoing GDYR. **METHODS:** prospective and randomized study with 13 individuals with severe obesity and type 2 diabetes who underwent GDYR, subdivided into two groups: with a standard biliopancreatic loop measuring 100 cm (G1=6) and a long biliopancreatic loop measuring 200 cm (G2=7), a alimentary loop 100 cm on both. Intestinal biopsies were performed in 3 segments and at 2 times, preoperative (T1) and 6 months postoperative (T2): in the gastro-enteral anastomosis (point A1=100cm/point A2=200cm), entero-enteral anastomosis (point B1=100cm/point B2=100cm) and 10 cm proximal to the ileocecal valve (point C1=10cm/point C2=10 cm). Immunohistochemical (IHC) and qRT-PCR analyzes were performed on intestinal biopsies with anti-GLP-1 and anti-PYY antibodies produced by L cells. **RESULTS:** A higher density of L cells was found at point C compared to points A and B at both times. There was a significant increase ($p < 0.0001$) in the number of L cells between periods T1 and T2 marked both by PYY (T1:17+10.5; T2: 23.5 + 10.7) and by GLP1 (T1: 17 + 10.5; T2: 23.5 + 10.7) only at point C. There was no significant difference in the number of L cells between groups G1 and G2 at points A, B and C at both times. There was significant difference in PYY gene expression at T1 and T2 , no difference between groups G1 and G2 at points A (A1: 17.3+2.9; A2: 19.9+ 1.9; $p = 0.09$), B (B1: 13.7 + 6.6; B2: 14.1 + 4.9; $p = 0.89$) and C (C1: 13.2 + 2.2; C2: 11.4 + 3.4; $p = 0.32$) and also on GLP1 difference gene expression in T1 and T2, no difference between groups G1 and G2 (A1: 20.8 + 4, 1; A2: 23.7 + 3.6; $p=0.2$), B (B1:14.3+7.9; B2: 22.7+11.8 $p=0.1$), (C1: 17 + 4.1; C2: 21.1 + 4.8; $p=0.2$). Among the patients evaluated 6 months after surgery, 77% had type 2 diabetes remission.

CONCLUSION: the number of L cells in the distal portion of the intestine is greater than in the proximal portion. There was a significant increase in the number of L cells and in gene expression in the postoperative period only in the distal portion of the small intestine, regardless of the size of the biliopancreatic loop.

KEYWORDS: L cells. Peptideo Glucagon-Like 1. Peptide YY. Biliopancreatic loop.
Gastric bypass.



1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A prevalência crescente da obesidade e sua associação com Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) acomete percentual significativo da população mundial com grande impacto socioeconômico, especialmente para países em desenvolvimento ⁽¹⁾. A obesidade é uma doença metabólica crônica, heterogênea e progressiva, e envolve fatores complexos, como psicossociais, demográfico, ambiental, genético e metabólico ⁽²⁾ (Figura 1). Estima-se que fatores genéticos e metabólicos possam estar relacionados entre 24% e 40% da variação do Índice de Massa Corpórea (IMC) ⁽³⁾. O termo obesidade tem origem no latim ‘*obesitas*’ (significa excesso de gordura) estando associada à comorbidades, tais como: diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares, hipertensão arterial e refluxo esofágico. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que mundialmente, cerca de 2 bilhões de adultos estão acima do peso, com índice de massa corporal (IMC) acima de 30kg/m ⁽⁴⁾. Existe uma relação direta do IMC e risco de surgimento de comorbidades, conforme tabela 1.

Tabela 1. Classificação do IMC e risco de comorbidades

Classificação	IMC	Risco de comorbidades
Baixo peso	< 18,5 kg/m ²	Baixo
Peso normal	18,5 a 24,9 kg/m ²	Médio
Sobrepeso	≥ 25,0 kg/m ²	Aumentado
Pré-obesidade	25,0 a 29,9 kg/m ²	Aumentado
Obesidade I	30,0 a 34,9 kg/m ²	Moderado
Obesidade II	35,0 a 39,9 kg/m ²	Grave
Obesidade III	≥ 40,0 kg/m ²	Muito grave
Superobesidade	≥ 50kg/m ²	Muito grave

Fonte: WHO, 2000.

Segundo a Pesquisa de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico ⁽⁵⁾ realizada no Brasil, dois em cada dez brasileiros apresentam obesidade. A prevalência de adultos com obesidade foi de 22,4%, semelhante entre as mulheres (22,6%) e os homens (22,0%). A frequência de obesidade aumentou com a idade até os 64 anos para mulheres.

Entre as mulheres, a frequência de obesidade diminuiu com o aumento da escolaridade, com seu menor percentual entre aquelas com 12 e mais anos de estudo. ⁽⁵⁾ Esses dados são ainda maiores segundo a Pesquisa Nacional de Saúde (PNS, 2020), que reitera a prevalência da obesidade entre mulheres (29,5%) e homens (21,8%). ^(6,7)

Os tratamentos clínicos tradicionais ⁽⁸⁾ utilizados para auxiliar na perda de peso, combinando abordagem farmacológica, nutricional (restrição na ingestão calórica), exercício físico e terapia comportamental, muitas vezes não promovem redução de peso esperada a longo prazo em indivíduos com IMC > 35kg/m². A cirurgia bariátrica e metabólica (CBM) é considerada o método mais eficaz para a perda de peso substancial e melhora das comorbidades em pacientes não responsivos ao tratamento clínico.^(9,10)

Nova portaria nº 2.172/2017 do Ministério da Saúde é reconhecida pelo Conselho Federal de Medicina (CFM) e autoriza a cirurgia metabólica para o tratamento de pacientes portadores de DM2 e grau I de obesidade, sem resposta ao tratamento clínico convencional, desde que comprovada a presença de outras comorbidades associadas.⁽¹¹⁾

No Brasil, a cirurgia é indicada para pacientes com IMC superior a 35 kg/m², que não obtiveram resultados expressivos com o tratamento convencional por um período mínimo de dois anos e apresentam comorbidades como diabetes mellitus tipo 2 (DM2), hipertensão arterial, dislipidemia, apneia do sono, infertilidade entre outras.^(12,13)

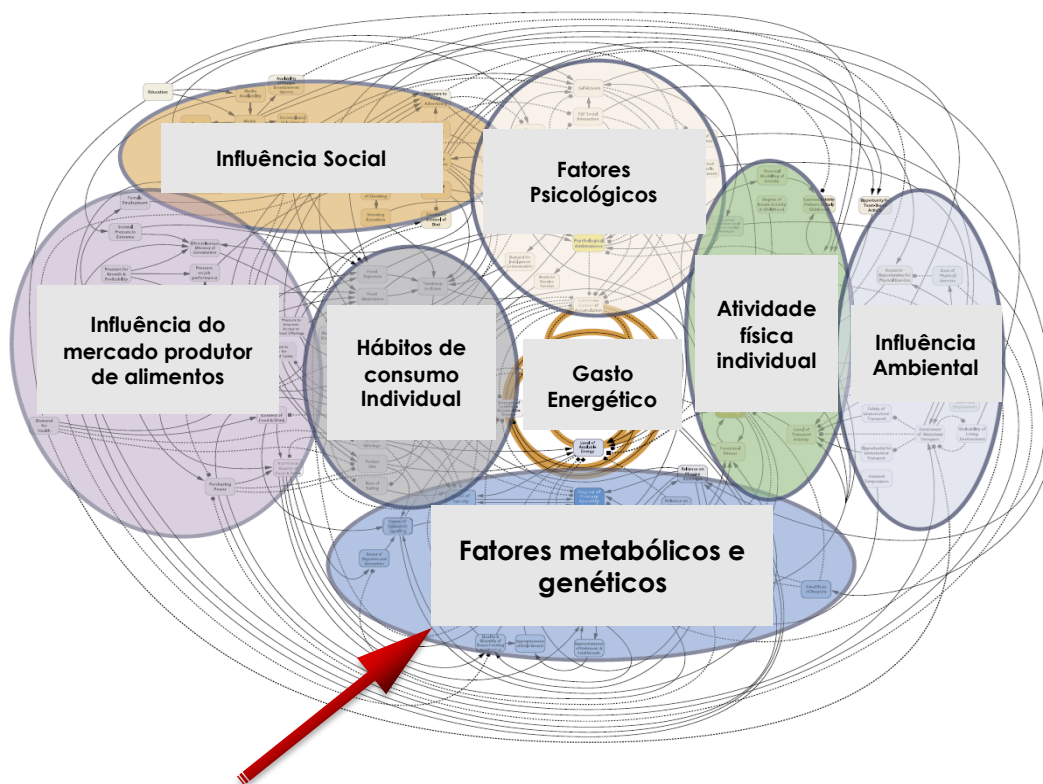
A relação entre obesidade e resistência à insulina pode ser considerada causa e efeito, já que estudos clínicos indicam que a perda/ganho de peso está intimamente relacionada ao aumento/diminuição da sensibilidade à insulina.⁽¹³⁾

O DM2 é caracterizado pela resistência à insulina, causado por obesidade e/ou sedentarismo em indivíduos com predisposição genética. Nesta patologia ocorre desenvolvimento da resistência à insulina nos músculos esqueléticos e no fígado, resultando em uma menor absorção de glicose pelas células musculares e diminuição da capacidade de suprimir a produção hepática de glicose.⁽¹⁴⁾

A cirurgia bariátrica leva à mudança metabólica a partir do peso corporal, integrando um complexo sistema que coordena a ingestão alimentar e o gasto energético. Essa sinalização leva diminuição da lipotoxicidade e inflamação sistêmica, responsáveis pelo

agravamento da resistência à insulina e falência progressiva das células beta com diminuição da secreção de insulina. ⁽¹⁵⁾

Figura1. Etiologia multifatorial da obesidade



Fonte: Adaptado de United Kingdom, 2007⁽²⁾.

Os mecanismos de controle glicêmico propiciados pela intervenção cirúrgica ainda não são totalmente compreendidos. Duas hipóteses são discutidas na literatura: a teoria do intestino proximal e do intestino distal. A primeira sugere que o desvio do duodeno diminui a secreção de hormônio anti-incretínico que permitiria a ação das incretinas intestinais. Propõe-se que esse efeito anti-incretínico ocorra a partir das células K que secretam o polipeptídeo insulínico dependente de glicose (GIP), em maior concentração no duodeno ^(16,17). Esse peptídeo apresenta vários efeitos sobre os

adipócitos, incluindo aumento do transporte da glicose induzida pela insulina, estimula a síntese de ácidos graxos e triglicérides ⁽¹⁷⁾.

A teoria do intestino distal se dá pela maior oferta de nutrientes no intestino delgado mais distalmente, local onde possui uma maior concentração de células L. Isso aumentaria a secreção de peptídeo similar ao glucagon 1 (GLP-1) e o peptídeo YY (PYY), favorecendo o controle glicêmico ⁽¹⁸⁾. O GLP-1 diminui a secreção e esvaziamento gástricos, inibe a secreção de glucagon, estimula a secreção de insulina, aumenta a neogênese das células β pancreáticas e diminui a apoptose. O PYY promove a gastroparesia, aumenta a saciedade, diminui a peristalse ileal, diminui o nível sérico de grelina, e facilita a entrada da glicose nas células musculares e adipócitos ^(18,19).

Estudo que avaliou o mecanismo de controle do DM2 após a cirurgia de Gastroplastia em Derivação em Y de Roux (GDYR) e suas relações com a anatomia gastrointestinal e homeostase da glicose, demonstrou que a GDYR e a derivação biliopancreática são métodos efetivos no controle do DM2 em cerca de 80 a 100% dos casos, resultando em concentrações persistentemente normais da glicose, insulina e hemoglobina glicada (HbA1c). ⁽²⁰⁾

Estudo sobre a HbA1c relata que pacientes com nível maior que 6,5% apresentam melhor resposta metabólica após GDYR e remissão da DM2 a longo prazo. ⁽²¹⁾ O peptídeo C também é forte preditor positivo de remissão parcial ou total do diabetes após o GDYR. O nível de peptídeo C é uma medida da produção de insulina, refletindo indiretamente a massa celular das ilhotas. A idade e/ou tempo do diabetes também estão indiretamente relacionadas ao envolvimento das células das ilhotas no DM2. Entretanto, o nível de peptídeo C igual e/ou maior a 3 reflete a reserva pancreática independentemente da idade, ou da duração do diabetes, sendo assim um preditor positivo para remissão da DM2. ⁽²²⁾

De fato, os dois mecanismos principais parecem ser responsáveis pela melhora precoce do controle glicêmico após GDYR: (1) aumento da sensibilidade hepática à insulina induzida, em parte por restrição energética e (2) melhora da função das células β associada ao aumento da secreção de peptídeo 1 semelhante ao glucagon pós-prandial devido ao trânsito alterado de nutrientes. Observa-se uma melhora induzida pela perda de peso na sensibilidade periférica à insulina. ⁽²³⁾

O cérebro interpreta e integra os sinais neuronais e hormonais para promover uma resposta reguladora coordenada ao sistema central no hipotálamo e tronco cerebral, os quais possuem conexões neuronais recíprocas: neurônios orexígenos, neuropeptídeo Y (estímulo de apetite/NPY) e neurônios anorexígenos pró-opiomelanocortina (saciedade/POMC) ⁽²⁴⁾.

As células enteroendócrinas, como a Célula L, são encontradas ao longo da mucosa do Trato Gastrointestinal (TG), e exercem função primordial no auxílio da homeostase da glicose e regulação do apetite. ⁽²⁵⁾ Devido à função regulatória das Células L, sua densidade e localização contribuem na compreensão do estado disfuncional metabólico da DM2, observando-se queda da secreção incretinas com consequente resistência insulínica e surgimento de outras comorbidades ⁽²⁶⁾

As células L, que secretam GLP-1 e PYY₃₋₃₆, têm se tornado a base de investigação hormonal para tratamento da DM2. No indivíduo saudável o estímulo é mais precoce, enquanto em indivíduos com DM2 e obesidade, a resposta é mais tardia. ⁽²⁷⁾

Células L co-expressam PYY nas porções distais (ileal e colônica), mas não nas proximais, e uma pequena subpopulação de células duodenais podem co-expressar GIP. Estudo forneceu evidências que as células enteroendócrinas expressam um repertório mais amplo de genes de hormônios intestinais do que foi avaliado. No caso das células

L, a porção proximal do intestino delgado expressas transcritos de mRNA para colecistocinina (CCK), GIP, neurotensina (NT) e secretina, além de proglucagon. ⁽²⁸⁾

O epitélio intestinal em contato com o alimento é local em que ocorre o estímulo para secreção das incretinas GLP-1 e PYY₃₋₃₆, ponto central para estimulação da secreção de insulina no pâncreas endócrino, sinalizando saciedade ao nível hipotalâmico e melhora do controle glicêmico. ^(29,30)

O GLP-1 reduz os níveis de glicose pós-prandial, potencializando a secreção de insulina estimulada pela glicose e inibindo a taxa de absorção de glicose pós-prandial. É importante em indivíduos com DM2, pois eles geralmente apresentam níveis inapropriadamente elevados de glucagon apesar da hiperglicemia; a hiper glucagonemia demonstrou contribuir de forma importante para a hiperglicemia (5-10) ⁽³¹⁾.

A GDYR demonstra atuar de forma mais eficiente que o tratamento convencional com fármacos análogos aos entero-hormônios. A mudança anatômica no trato GI atua como gatilho para sensibilização dos entero-hormônios. Estudos que correlacionam níveis hormonais do GLP-1 e PYY₃₋₃₆ antes e após GDYR demonstram que o procedimento determina não somente a perda peso, mas também aumenta níveis séricos de GLP-1 e PYY₃₋₃₆ com supressão da grelina. ^(32,31)

A GDYR não atua apenas por meio da sensibilização alimentar na porção mais distal do intestino, onde existe maior densidade de células L neuroendócrinas, mas também melhora o controle glicêmico por meio da secreção GLP-1 e liberação de insulina pós-prandial, em parte devido ao tamanho da extensão da Alça Biliopancreática (ABP). ⁽³³⁾

Em estudo prévio analisando a densidade de células L nos segmentos do intestino delgado de pacientes obesos graves no pós-operatório tardio de GDYR, com padronização de alça alimentar e biliopancreática com extensão de 60 cm, observou-se maior concentração de

Células L já na porção a 60 cm distalmente à entero-entero anastomose quando comparada aos segmentos proximais, o que pode explicar diferenças na sensibilização no lúmen intestinal e na resposta entero-hormonal. ⁽³⁴⁾

No próximo capítulo apresentaremos o efeito da padronização das AA e ABP, sua relação com a sensibilização das Células L e sua resposta entero-hormonal. Destacando outros fatores que poderiam contribuir na sensibilização da mucosa intestinal e atividade das células L além do estímulo nutricional.

2 REVISÃO LITERATURA

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 TRATAMENTO CIRÚRGICO DA OBESIDADE GRAVE POR GDYR

O tratamento cirúrgico da obesidade iniciou próximo a década de 1950 e com o passar de décadas as técnicas foram aprimoradas; sendo o $IMC \geq 40 \text{ kg/m}^2$ favorável à indicação cirúrgica direta, e se $\geq 35 \text{ kg/m}^2$ com comorbidade associada de importância clínica, também deve ser considerada a aplicação de tratamento cirúrgico adequado ⁽³⁵⁾. Dentre as principais técnicas cirúrgicas temos: gastrectomia vertical (*sleeve*), derivação gastrojejunal em Y de Roux (*bypass* gástrico), derivação biliopancreática tipo duodenal *switch*, Scopinaro e banda gástrica ajustável ⁽³⁵⁾

A abordagem clínica (de hábitos de vida e farmacoterapia) é a primeira opção para o tratamento da obesidade e suas comorbidades, porém devido à baixa eficácia de resposta uma alternativa é a intervenção cirúrgica. Os critérios de indicação cirúrgica incluem: idade de 18 e 65 anos; tempo de obesidade; $IMC > 35 \text{ kg/m}^2$ e comprometimento dos hábitos de vida. A cirurgia bariátrica é o tratamento mais eficaz e está associada à redução das principais comorbidades e do risco de mortalidade ⁽⁶⁾.

Recente estudo randomizado controlado que investigou os efeitos de um programa de treinamento físico nos fatores de risco cardio metabólicos demonstrou que a perda de peso não promoveu diferenças na pontuação de risco cardio metabólico (glicemia de jejum, triglicérides, HbA1c, Avaliação do Modelo de Homeostase - Resistência à Insulina (HOMA-IR) , proteína C reativa (PCR) e da pressão arterial⁽³⁵⁾, sugerindo que a melhora nas condições clínicas destes indivíduos após a cirurgia estaria além da magnitude da perda de peso.

O estudo *The Surgical Treatment and Medications Potentially Eradicate Diabetes Efficiently* (STAMPEDE) demonstrou a efetividade da cirurgia na redução de peso e controle glicêmico com a remissão de casos de DM2 e consequente melhoria da qualidade de vida e redução de riscos cardiovasculares. A perda de excesso de peso ultrapassou 80% em ambas as técnicas cirúrgicas, superior aos 13% da terapia clínica isolada ⁽³⁶⁾

Conforme consenso da Sociedade Brasileira de Cirurgia Bariátrica e Metabólica (SBCBM) e do Conselho Federal de Medicina (CFM), existe indicação de cirurgia bariátrica nos pacientes com obesidade grave (grau III). Nos pacientes com obesidade grau II (IMC \geq 35), devem-se avaliar as comorbidades associadas para indicação cirúrgica. Para indivíduos que não respondem ao tratamento clínico e aos demais, a intervenção por meio de cirurgia bariátrica e metabólica (CBM) é considerada a possibilidade terapêutica mais eficaz para a perda de peso a longo prazo e melhora das comorbidades ⁽³⁷⁾.

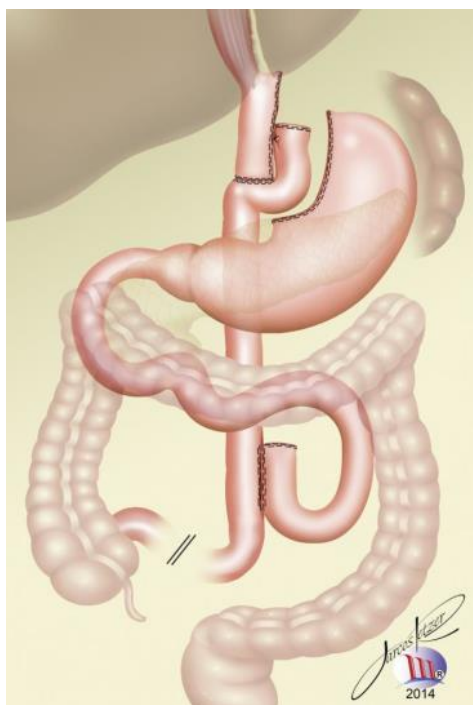
A nova Portaria nº 2.172/2017 do Ministério da Saúde redefine a Diretriz da prevenção e tratamento obesidade e sobrepeso, reconhecida pelo Conselho Federal de Medicina (CFM) reconhece a cirurgia metabólica para o tratamento de pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 2, com IMC entre 30 kg/m² e 34,9 kg/m², seria obesidade grau I e sem resposta ao tratamento clínico convencional, como técnica não experimental de alto risco e complexidade, idade de 30 a 70 anos, comprovada presença de outras comorbidades : hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia entres outras. ⁽¹¹⁾

Em nosso estudo foram utilizados fatores de inclusão pré-operatório (idade, tempo de diabetes, uso de insulina, Hba1c, nível de plasma de C-peptídeo e insulina basal) que serviram para identificar preditores de remissão metabólica de T2DM (glicemia<126

mg/dL e/ou HbA1c<7% e/ou C-peptídeo<7 mg/dL) com expectativa de mudança no pós-operatório em melhora da resposta entero-hormonal.^(38,39)

A GDYR (Figura 2) é considerada o procedimento responsivo para DM2 e representa mais de 30% das cirurgias bariátricas realizadas no mundo e quase 60% na América Latina. No Brasil, correspondem em torno de 70% das cirurgias realizadas em 2016, e resultam em perda de peso e remissão de comorbidades ⁽⁴⁰⁾. Na GDYR é feita modificação anatômica parcial do trato gastrointestinal que contribui na melhora da resposta fisiológica e metabólica, refletindo na retomada da sinalização dos hormônios intestinais e melhora das comorbidades, além da perda de peso mais sustentável ⁽⁴¹⁾

Figura 2. Gastroplastia com Derivação em Y de Roux (GDYR) no tratamento da obesidade. A autoria Marcos Antonio Retzer.



2.2 CÉLULAS L E ENTERO-HORMÔNIOS

Na mucosa intestinal encontramos células neuroendócrinas (Célula L) que atuam na via insulínica e sua biossíntese. Sua morfologia é do tipo aberto com aparência em forma de cone, apoiada na lâmina basal do revestimento epitelial intestinal. As microvilosidades se projetam na superfície extracelular apical para o lúmen intestinal e os grânulos contendo hormônios estão situados no lado basolateral voltado para os capilares ⁽²⁸⁾.

As células L já são encontradas nas porções duodeno e jejuno proximal, havendo aumento progressivo das mesmas à medida que se avança na porção ileal do intestino delgado, secretam os hormônios GLP-1 e PYY ^{3,36}, auxiliam na sinalização de saciedade e fome para cérebro (Figura 3) otimizando controle dessa via metabólica ⁽³²⁾.



Figura 3 – Resposta pós-prandial do GLP-1 e sua ação neuroendócrina restabelecendo o equilíbrio no metabolismo humano. Adaptado de Ehlers (2006) ⁽⁴²⁾.

A resposta do trato gastrintestinal ao contacto com o alimento leva a secreção de enterohormônios (Figura 4), com estímulo para liberação pós-prandial de insulina, e inibição da

secreção de glucagon pelo pâncreas, melhorando a função das células β pancreática (43,44,45).

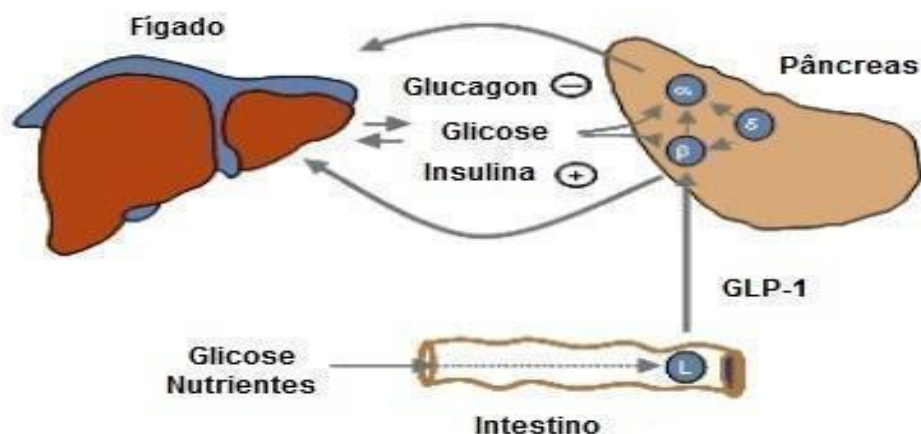


Figura 4 – Células L liberando GLP-1 para o pâncreas por meio de estímulo após ingestão alimentar e sinalização das células β , com liberação de insulina e inibição da liberação de glucagon. Adaptado de Ehlers (2006) ⁽⁴²⁾.

O PYY, outro entero-hormônio dessa via insulínica, age como cofator juntamente ao GLP-1 induzindo a um retardo no trânsito gastrointestinal e promovendo saciedade. Desse modo, o intestino sinaliza ao hipotálamo e ao pâncreas que houve ingestão alimentar dando início à via metabólica ^(46,47,48,49).

Os hormônios incretínicos pertencem à família de peptídeos pancreáticos (PP), da qual faz parte também o neuropeptídeo Y, que são também secretados pelas “células L” da mucosa do intestino delgado ^(50,51) imediatamente após alimentação e relacionada à quantidade de calorias ingeridas, sugerindo controle neural da secreção ⁽⁵²⁾.

O GIP, produzido pela célula K, também contribui para a resposta pós-prandial de insulina ^(53,54). A secreção de GIP é estimulada pela presença de gorduras e carboidratos

no duodeno inicialmente, atuando como potente inibidor da secreção de ácido gástrico e de pepsina, reduzindo a motilidade e a velocidade de esvaziamento gástrico ⁽⁴²⁾.

A expressão desses hormônios é fundamental para o freio ileal, e no caso do PYY e PP, reduzem também a secreção de grelina no estômago, determinando ação anorexígena ⁽⁵⁵⁾.

A CCK produzida pelas células I age gerando contrações da vesícula biliar e relaxando o Esfíncter de Oddi em conjunto a ação da secretina (outro hormônio secretado pelo intestino) que estimula a produção de bile. E a NT é secretada pelas células N intestinais, diminui o peristaltismo e aumenta a circulação no íleo, além de contrair a musculatura lisa intestinal ⁽⁵⁴⁾.

A desregulação do mecanismo de controle metabólico resultará na diminuição da secreção e sinalização hormonal intestinal, resultando em má homeostase TG ^(56,57). A atuação sincrônica desses hormônios contribui para o controle glicêmico e contribui para a perda de peso, além de diminuir complicações cardiovasculares associadas à DM 2 ⁽⁵⁷⁾.

A ausência de sinalização na via insulínica leva a célula L ao processo de exaustão que contribui na progressão da DM2. Entretanto, quando restabelecido o estímulo a mucosa pelo lúmen por oferta nutricional, sensibiliza a retomada da liberação entero-hormonal e de forma progressiva induz a remissão do quadro DM2 ⁽²⁸⁾.

Devido a padrões de expressão e função dos seus hormônios, as células L parecem variar, não apenas em função da localização anatômica no intestino, mas provavelmente também são influenciadas por seu estado de maturação. Importante salientar que o tempo de renovação das células enteroendócrinas é curto em comparação com outros tipos de células endócrinas, cerca de 7 a 10 dias. As células L não são exceções a esse padrão geral e parecem ser totalmente renovadas em 7 dias, o que poderia elucidar a ocorrência do aumento densidade de células L bem como melhora resposta incretínica por estímulo nutricional intestinal ⁽²⁶⁾.

2.3 RELAÇÃO DO ÁCIDO BILIAR E MICROBIOTA INTESTINAL E CÉLULA L

As células L podem ser estimuladas também pelos ácidos biliares, induzindo a secreção das incretinas GLP-1 e PYY. Ácidos biliares contribuem na regulação da homeostase glicêmica e induz a queda da secreção de grelina, por sua vez correlaciona positivamente com maior liberação de secreção de PYY e GLP-1 ⁽³⁸⁾

O ácido biliar conjugado pós-prandial auxilia na regulação hormônios intestinais ^(38,58) pela estimulação dos receptores de ácido biliar acoplado a proteína-G (GPBAR) em células L distais, podendo explicar os altos níveis de GLP-1 observados após a cirurgia de *bypass*, e fornece suporte para estratégias contínuas onde o GPBAR irá atingir as células L como uma via terapêutica. ⁽⁵⁸⁾

Células L tem função reguladora de nutrientes pós-prandial e co-expressam o gene do proglucagon, que também é expresso em células α pancreáticas. Evidências sugerem que a regulação do balanço energético e da homeostase da glicose por carboidratos fermentáveis induz mudanças específicas na microbiota intestinal. A microbiota intestinal atua na fermentação da fibra dietética e produz grandes quantidades de succinato, que ativa a glicogênese intestinal, funcionando como um precursor da glicose. Esse processo melhora a função intestinal, metabolismo energético e homeostase da glicose. ^(58,59)

No modelo estudado no grupo de pesquisa, demonstrou que a fermentação da microbiota intestinal (ou seja, digestão bacteriana de compostos específicos) de probióticos específicos ou outros carboidratos não digeríveis está associada à secreção de peptídeos enteroendócrinas, como o GLP-1 e o PYY, produzidos por células L. ⁽⁶⁰⁾

Alguns metabólitos bacterianos específicos, como ácidos graxos de cadeia curta, podem estimular a secreção de GLP-1 por mecanismos dependentes de receptores acoplado a proteína-G receptor 41/43 (GPR41/43) expresso nos adipócitos. Além disso, o sistema endocanabinóide ou lipídios bioativos relacionados, modulados pela microbiota intestinal, podem contribuir para a regulação da homeostase da glicose, lipídios e energia ⁽⁶⁰⁾.

É observado que uma rápida modulação do microbioma entérico após RYGB altera a função microbiana intestinal ⁽⁶⁰⁾ com uma mudança resultante na sinalização para células L. Além disso, estudos demonstram consistentemente mudanças profundas mediadas pelo RYGB na concentração e composição do ácido biliar sérico que acredita-se ocorrer devido às adaptações intestinais que levam ao aumento da absorção intestinal de nutrientes.

As células L enteroendócrinas podem ser estimuladas por nutrientes e/ou ácidos biliares para co-secretar PYY e GLP-1 ⁽³⁸⁾. Os ácidos biliares e o GPBA-A aumentaram a secreção de GLP-1 das culturas intestinais, com evidências de sinergia entre os efeitos da glicose e da ativação do GPBAR. A elevação da adenosina de monofosfato cíclico (AMPC) foi observada após a ativação do GPBA-A em células GLUTag (célula que expressa glucagon) individuais. As respostas diretas de cálcio ao GPBAR foram pequenas, mas na presença do agonista, uma subpopulação de células que anteriormente era pouco responsiva à glicose exibiu respostas robustas à glicose. *In vivo*, o aumento da entrega da bile para regiões mais distais do íleo aumentou a estimulação das células L. ⁽⁵⁸⁾

Mudanças complexas que ocorrem dentro da microbiota intestinal e perfis de ácidos biliares entéricos após o DGYR podem levar à modulação da expressão gênica nas células L com um aumento subsequente na produção de GLP-1 e melhora na homeostase da glicose. Além dos aumentos precoces no GLP-1, que serão modulados por mudanças

transcricionais nas células L e, posteriormente, por uma proliferação na quantidade de células L. ⁽⁶¹⁾

A GDYR determina um aumento tardio e substancial na quantidade de células L com alterações associadas nos ácidos biliares que se correlacionaram com mudanças na proporção *Escherichia-Shigella* e *Lactobacillus*. Essa proliferação de células L contribuiu para melhorar a homeostase da glicose. ⁽⁶¹⁾

2.4 GENES ALVOS: GLP-1 E PYY

Pesquisas realizadas com gêmeos monozigóticos (idênticos), não idênticos, e irmãos não gêmeos, fornecem forte evidência para a herdabilidade do peso corporal, mostrando que até mais de 70% da variabilidade do peso corporal pode ser atribuída à variação genética na população a qual esses gêmeos pertencem ⁽⁶²⁾.

Acredita-se que os genes desempenham um papel permissivo no desenvolvimento da obesidade poligênica e que a atuação de fatores ambientais sobre genes de suscetibilidade leva ao fenótipo de obesidade. Diversos estudos apontam que influências genéticas desempenham um papel expressivo nas diferenças individuais de peso corporal e adiposidade. ⁽⁶³⁾

Todas as células epiteliais no intestino, incluindo as células L, originam-se de um único tipo de célula-tronco intestinal posicionada no fundo da cripta. Essas células-tronco que expressam Lgr5+ (receptor 5 acoplado à proteína G rico em repetição rica em leucina) são guiadas por fatores parácrinos de células vizinhas de Paneth para entrar no *pool* de progenitores não especificados (células amplificadoras de trânsito). ⁽²⁸⁾

Já na cripta, algumas dessas células se diferenciam em células L, guiadas por uma série de fatores de transcrição. Os padrões e a função de expressão do hormônio das células L

parecem variar, não apenas em função da localização anatômica das células no intestino, mas também são susceptíveis de serem influenciados pelo seu estado de maturação. ⁽²⁸⁾

As células L são classificadas pela produção do precursor hormonal, o proglucagon um pró-peptídeo de 160 aminoácidos codificado pelo gene proglucagon ⁽⁶²⁾, localizado no cromossomo 37, 2q36 ⁽⁶⁴⁾. Após a tradução, o proglucagon sofre processamento tecidual específico por clivagem local-específica pela pró-hormônio converter 1/3 (intestino e cérebro) ou pró-hormônio converte (ilhotas pancreáticas), clivando em diferentes locais para produzir glicentina, GLP-1 e GLP-2 no intestino e o cérebro, e polipeptídeo pancreático relacionado à glicentina (GRPP), o glucagon é fragmento principal de proglucagon em células α . (Figura 4). ⁽²⁸⁾

Estudos forneceram evidências de que as células enteroendócrinas geralmente expressam um repertório amplo de genes de hormônios intestinais, no caso das células L da parte superior do intestino delgado, que expressam transcritos de mRNA para CCK, GIP, NT e secretina, além de proglucagon. As células L no intestino delgado distal e do cólon mostraram um repertório mais restrito de mRNAs de pró-hormônios, expressando cerca de 40 e 10% de células positivas para GLP-1 e PYY, respectivamente. ⁽²⁸⁾

Os hormônios incretínicos GLP-1 E PYY ₃₋₃₆ agem como forte inibidor na ingestão alimentar quando combinados. Embora não sejam genes homólogos ou compartilhem sequência nucleotídica similar, sua atuação combinada potencializa efeito positivo de dupla ação agonista no metabolismo glicêmico. ⁽⁵⁷⁾

O GLP-1 é um peptídeo derivado do gene do proglucagon, localizado no cromossomo 17 humano, que apresenta seis éxons e cinco íntrons. Quatro destes éxons codificam distintos domínios funcionais.³⁹ A molécula biologicamente ativa do GLP-1₍₇₋₃₆₎ consiste

em 30 aminoácidos inativado *in vivo* pela enzima dipeptidil peptidase-IV em 1 a 3 minutos. ⁽⁶⁵⁾

A função incretinas do GLP-1 depende do reconhecimento pelo seu receptor específico (GLP1R) localizado nas células β pancreáticas. Este por sua vez sensibiliza e estimula a via da Adenil ciclase e resulta na produção e secreção de insulina. ⁽⁶⁶⁾

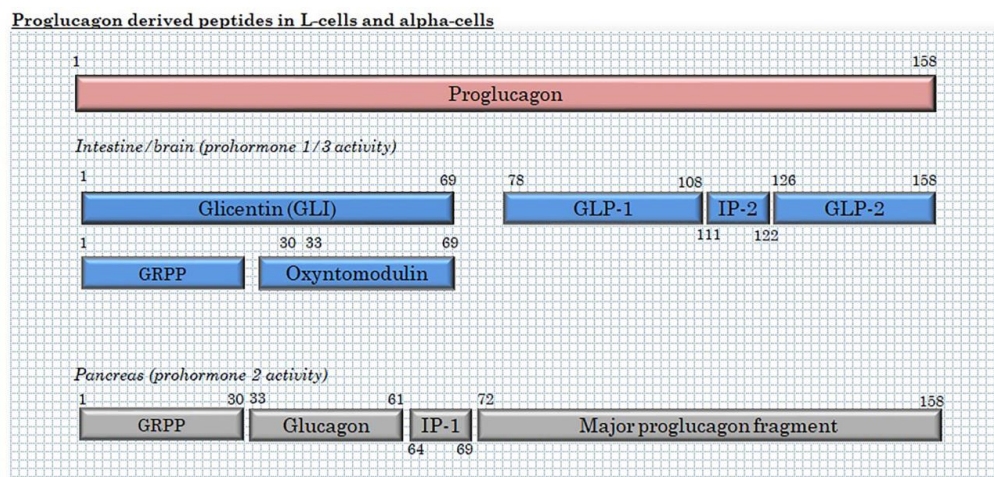
O PYY é produto de um gene localizado também no cromossomo 17 humano, composto por 97 aminoácidos e processamento alternativo para duas isoformas: o PYY₁₋₃₆ e o PYY₃₋₃₆. A forma do PYY predominantemente encontrada na circulação sanguínea é o PYY₃₋₃₆ que se liga ao receptor Y2R. ⁽⁶⁷⁾

O GLP-1 através de seu receptor (GLP-1R) modula atividade neural em algumas regiões dentro cérebro (hipotálamo), este estímulo que inicia na mucosa intestinal irá refletir no fígado onde suprime a secreção de glucagon, no pâncreas promove secreção de insulina e aumenta proliferação de células β . ⁽⁵⁶⁾

O PYY exerce função anorexígena pelo receptor Y2R no núcleo arqueado do hipotálamo, reduzindo consumo de energia e apetite, retardando esvaziamento gástrico, promovendo também secreção de insulina e estimulação vagal. ⁽⁵⁶⁾

Na obesidade o nível circulante desse hormônio cai bruscamente assim como sensibilização por estímulo nutricional as células L. Pois o estímulo não alcança as porções mais distais do intestino delgado, onde densidade de célula L é maior.

O GLP-1 que tem como gene receptor de peptídeo GLP1R, que é liberador de gastrina, e PYY que tem como receptor NPY, mas acredita se que outras variações envolvidas em genes no circuito hipotalâmicos associadas com obesidade interfere na atividade desses genes. ⁽²⁴⁾

Figura 5. Produtos do processamento de proglucagon em células L e Células α 

Adaptado de Kuhre (2021) ⁽²⁸⁾

Células L variam ao longo do intestino, não apenas no que diz respeito à co-expressam de peptídeos derivados de não-proglucagon, mas também no que diz respeito às respostas secretoras provocadas por diferentes estímulos. Assim, as células L duodenais e jejunais são consideradas geralmente mais responsivas a nutrientes do que as células L no cólon, e acredita-se que sejam responsáveis pela resposta imediata do GLP-1 à ingestão de nutrientes que ocorre dentro de 10 minutos após a ingestão de alimentos. Como tal, espera-se que o efeito amplificador do GLP-1 na secreção de insulina (pico de 15-30 minutos após a ingestão de alimentos) seja mediado pelo GLP-1 predominantemente secretado pelo intestino proximal. ⁽²⁸⁾ Essa variação na exposição direta parece ressoar na expressão diferencial de sensores de nutrientes e respostas secretoras entre as células L no intestino delgado e as células L colônicas.

2.5 EXTENSÃO DA ALÇA BILIOPANCREÁTICA NA GDYR

O aumento progressivo da densidade da população de células L ao se caminhar distalmente no intestino delgado, levou a suposição de maior efeito metabólico da DGYR pelo aumento da extensão da alça biliopancreática (ABP). De fato, estudos clínicos têm demonstrado maior benefício da GDYR com ABP longas tanto na perda de peso quanto para resolução de comorbidades, principalmente a DM. ⁽⁶⁸⁾

A extensão das alças alimentar e biliopancreática influencia na remissão do DM2 em pacientes com obesidade grave. Alguns estudos sugerem um mecanismo híbrido na GDYR, atuando como gatilho na melhora da secreção de entero-hormônios associada à pequena má absorção ^(69,70,71).

Em estudo comparando a remissão do DM2 após GDYR com ABP curta e ABP longa, observou-se efeito antidiabético mais intenso com alça longa. ⁽⁷²⁾ Alguns estudos sugerem que o aumento do comprimento das alças alimentares DGYR produz apenas pequena melhora da perda do excesso de peso enquanto outros demonstram a resolução de comorbidades e melhora metabólica. ^(72,73)

Estudos que avaliaram a influência do aumento do comprimento da ABP no equilíbrio metabólico evidenciaram melhora da sinalização neuroendócrina ⁽⁶⁸⁾, avaliando pacientes com obesidade grave em DM2 submetidos a DGYR com diferentes extensões da ABP e alça alimentar (AA), observaram maior perda de peso e melhora dos parâmetros metabólicos naqueles submetidos ao procedimento com ABL. Acredita-se que as células L precisam de uma melhor sinalização para sensibilização alimentar. ⁽⁶⁸⁾

Tanto a obesidade quanto as doenças metabólicas estão diretamente ligadas à disfunção da célula L. O rearranjo anatômico da DGYR e modificação no tamanho das alças

Biliopancreática levam a melhor resposta celular na produção de suas incretinas por sensibilização das mesmas. ⁽³²⁾

Foi observado que indivíduos obesos com DM2 apresentam uma população maior de Células L com atividade somente na porção ileal distal, onde irá proporcionar maior expressão de secreção incretinas após estímulo, enquanto nos indivíduos saudáveis essa resposta é encontrada nas porções proximais do jejuno e íleo. ⁽²⁷⁾

Acredita-se na hipótese que desvio intestinal mais longo potencializa pico de resposta pós-prandial do GLP-1, devido esta localização ter população grande de Células L e assim se obtém quantidade maior de secreção de insulina, sensibilizando melhor resposta à tolerância glicose. ⁽³³⁾

O número de células L ⁽⁷⁴⁾ antes e após GDYR explica os benefícios hormonais e metabólicos de contornar o duodeno e a parte proximal do jejuno, e acelerar a passagem de alimentos não digeridos para o intestino distal, resultando em melhor controle glicêmico. ⁽²⁷⁾ GDYR induz a melhora do desempenho fisiológico e resposta bioquímica, auxiliando na retomada do funcionamento intestinal e sinalização hormonal, levando a uma resposta neural e redução de apetite e perda substancial de peso. ⁽⁷⁴⁾

Na alça biliopancreática, durante a passagem dos ácidos biliares secundários na região intraluminal, ocorre estímulo da célula L que leva a liberação de GLP-1 e PYY e diferenciação de células-tronco em direção a células L promovendo a neogênese da mesma. Nessa porção a ocorrência de células pode estar aumentada ⁽⁷⁷⁾. Já na região da alça alimentar temos ação mais efetiva do estímulo nutricional que também age como estímulo secretor. ⁽²⁸⁾

Autores observaram que pacientes com obesidade e DM2 após cirurgia bariátrica mudança secreção hormonal devido à modificação da extensão da alça biliopancreática.

⁽⁷²⁾ Acreditamos na hipótese que a GDYR com alça biliopancreática longa, irá permitir um contato mais acelerado com porção mais distal do lúmen intestinal onde número maior de células L recebem pouco ou nenhum estímulo. Assim irá contribuir com a sensibilização celular, liberação de hormônios gastrointestinais e retomada via sinalização eixo intestino-cérebro, positivar o feedback para saciedade e levar a melhora metabólica.

3 HIPÓTESE

3 HIPÓTESE

A GDYR com alça biliopancreática longa permite um contato do alimento com porção do intestino delgado distal e com maior população de células L, o que potencializaria os efeitos sobre a sensibilização e liberação de hormônios gastrointestinais.

4 OBJETIVO

4.1 OBJETIVOS

- Analisar as células L ativas imunomarcadas por GLP-1 e PYY conforme a extensão da alça biliopancreática em pacientes com obesidade grave e DM2 submetidos à GDYR
- Analisar a expressão de mRNA das células L pelos genes alvos GLP-1 e PYY conforme a extensão da alça biliopancreática em pacientes com obesidade grave e DM2 submetidos à GDYR.

5.1 LOCAL DE EXECUÇÃO DO TRABALHO

O estudo foi realizado na Unidade de Cirurgia Bariátrica e Metabólica da Disciplina de Cirurgia do Aparelho Digestivo do Departamento de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP). Os exames histoquímicos e moleculares foram realizados no Laboratório de Investigação Médica de Transplante e Cirurgia do Fígado (LIM-37) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP). As biópsias foram realizadas pelo Serviço de Endoscopia Gastrointestinal do HC-FMUSP.

5.2 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo foi realizado conforme as recomendações éticas da Declaração de Helsinki e aprovado pelo Comitê de Ética para Análise de Pesquisa — CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) sob o registro CAAE: 65854317.8.0000.0068 e registrado *Clinical Trial* sob n.º 65854317800000068

Todos os pacientes compreenderam e aceitaram se submeter aos procedimentos propostos no protocolo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

5.3 CASUÍSTICA

Estudo prospectivo, randomizado (pareado) e morfológico, envolve 13 pacientes adultos entre homens e mulheres (18-65 anos) com obesidade grave, índice de massa corporal (IMC) > 35 kg/m² e DM2 submetidos à Gastroplastia com Derivação em Y de Roux

(GDYR) na Unidade de Cirurgia Bariátrica e Metabólica do HC-FMUSP, entre fevereiro de 2020 a dezembro de 2022. Os pacientes foram randomizados (<https://hcbredcap.com.br/>) em dois grupos G1(n=6) e G2(n=7), conforme a extensão da alça biliopancreática medindo 100 cm (G1) ou 200 cm (G2), e alça alimentar de 100 cm em ambos os grupos, na proporção de 1:1 por modelo computadorizado. Os pacientes foram avaliados no período pré-operatório (T1) e 6 meses (T2) após GDYR.

5.4 DADOS ANTROPOMÉTRICOS

As variáveis antropométricas foram obtidas no mesmo dia das internações dos pacientes, sendo incluída como dados pré-operatórios. A aferição de peso corporal (PC, Kg) foi realizada através do equipamento (Figura 6) *In Body 230*, 2.0 (Biospace Seul, Coreia). Durante a aferição, o paciente permaneceu em posição ortostática, de frente para o *display*, no centro da balança, descalço e com roupas leves.

A aferição da altura (m) foi realizada em estadiômetro acoplado à balança W 300. Classe III, com capacidade máxima de 2 m. O paciente era posicionado em pé, com os pés descalços, costas eretas e os braços estendidos ao lado do corpo. Para o cálculo do IMC foi utilizada a fórmula: peso (kg)/altura (m)²

Figura 6 - Bioimpedância elétrica



Fonte: Acervo pessoal da autora, 2022.

5.5 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Idade entre 18 e 65 anos;
- $IMC \geq 35 \text{ kg/m}^2$;
- Peptídeo C $\geq 1,0 \text{ ng/mL}$;
- Presença de DM2 confirmada pelos seguintes critérios diagnósticos:
 - $HbA1c \geq 7,0\%$;

- Glicemia de jejum ≥ 126 mg/dL.

5.6 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Uso de corticoide via oral ou injetável por mais de 14 dias consecutivos nos últimos 3 meses;
- Portadores de hepatites B e C ou HIV;
- Procedimento bariátrico prévio ou cirúrgico abdominal complexa anterior
- Doenças cardiovasculares;
- Insuficiência renal definida por dosagem sérica de creatinina $\geq 1,8$ mg/dL;
- História de hepatopatia crônica;
- Doenças gastrointestinais como doença celíaca, doença inflamatória intestinal ou outras doenças mal absorptivas;
- Distúrbios psiquiátricos incluindo demência, depressão grave, história de tentativa de suicídio, abuso de álcool e drogas nos últimos 12 meses;
- Extensão total das alças de intestino delgado em comprimento que não permita a realização da técnica cirúrgica para o grupo que o paciente foi designado, mantendo-se uma extensão de alça comum maior que 300 cm;

4.7 TÉCNICA CIRÚRGICA

A técnica cirúrgica realizada foi a Gastroplastia com derivação em Y de Roux (GDYR) por videolaparoscopia, com confecção de bolsa gástrica com volume entre 30 e 50ml, com alça biliopancreática medindo 100 cm (G1) ou 200 cm (G2), e alça alimentar de 100 cm em ambos os grupos conforme ilustração (Figura 6). Foi realizada a mensuração do

total da alça intestinal, realizando-se gastro-entero anastomose mecânica com 3 cm de extensão e entero-entero anastomose mecânica latero-lateral de 4 cm.

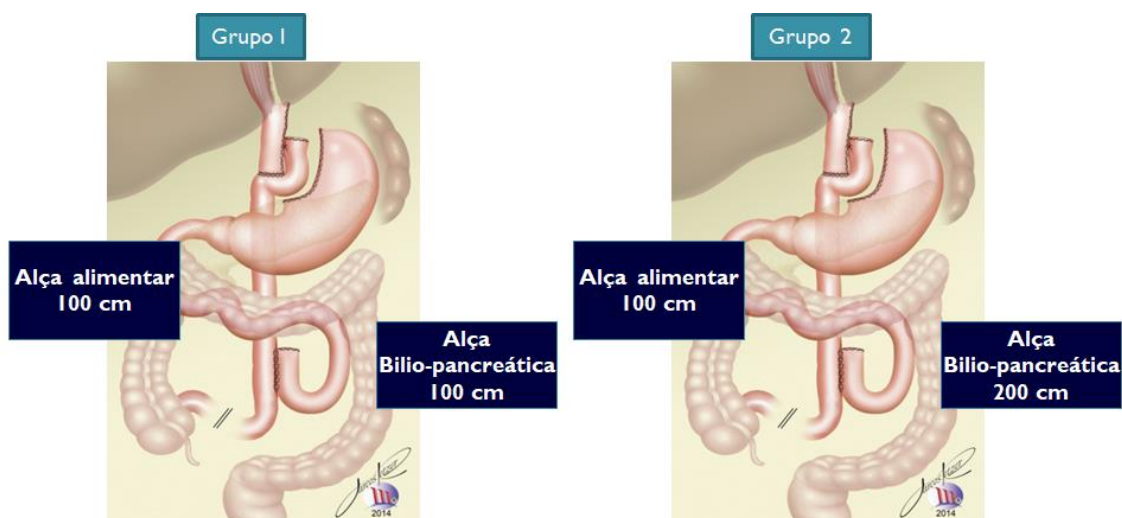


Figura 7 - Ilustração esquemática da Gastroplastia com Derivação em Y de Roux (GDYR). Autoria Marcos Antonio Retzer.

5.7.1 Técnica para mensuração das Alças Intestinais

Foi realizada a mensuração do intestino delgado com pinças laparoscópicas com marcação de 5cm em 5cm de extensão, uma vez que tal método de mensuração se provou equivalente à mensuração realizada em laparotomias.

5.8 COLETA DAS BIÓPSIAS

5.8.1 Biópsia Pré-operatória

- A biópsia pré-operatória foi realizada por Exame de Colonoscopia 1 dia antes da cirurgia pelo Serviço de Endoscopia Gastrointestinal (HC-FMUSP):

Grupo 1 = Ponto C1 = *10 cm válvula ileocecal*

Grupo 2 = Ponto C2 = *10 cm válvula ileocecal*

5.8.2 Biópsia Transoperatória

- A biópsia pré-operatória foi realizada durante o procedimento cirúrgico, coleta de amostra de mucosa do intestino delgado nos seguintes pontos:

- Gastro-entero anastomose

Grupo 1 = Ponto A1 = *correspondendo a 100 cm do ângulo de Treitz*

Grupo 2 = Ponto A2 = *correspondendo a 200 cm do ângulo de Treitz*

- Entero-entero anastomose

Grupo 1 = Ponto B1 = *correspondendo a 200 cm do ângulo de Treitz*

Grupo 2 = ponto B2 = *correspondendo a 300 cm do ângulo de Treitz*

5.8.3 Biópsia pós-operatória

A segunda coleta foi realizada 6 meses após GDYR através de enteroscopia realizada no Serviço de Endoscopia Gastrointestinal (HC-FMUSP). Após atingir-se o nível desejado de anestesia, o enteroscópio de duplo balão (modelo EN-450T5, Fujifilm Corporation TM, Tokyo-Japão) foi inserido por via oral (anterógrada) e introduzido ao longo do TGI. O tubo flexível (overtube modelo TS-13140, Fujifilm Corporation TM, Tokyo-Japão) com dois balões acoplados e sequencialmente insuflados e esvaziados, permitiu que o enteroscópio progredisse ao longo do intestino delgado, com realização das biópsias nas seguintes localizações:

- Gastro-entero anastomose

Grupo 1 = Ponto A1 = *correspondendo a 100 cm do ângulo de Treitz*

Grupo 2 = Ponto A2 = *correspondendo a 200 cm do ângulo de Treitz*

- Entero-entero anastomose

Grupo 1 = Ponto B1 = *correspondendo a 200 cm do ângulo de Treitz*

Grupo 2 = ponto B2 = *correspondendo a 300 cm do ângulo de Treitz*

- 100 cm abaixo da entero-entero anastomose (**ponto D1**)

Grupo 1 = Ponto D1 = *correspondendo a 300 cm do ângulo de Treitz*

Grupo 2 = Ponto D2 = *correspondendo a 400 cm do ângulo de Treitz*

Através do exame de Colonoscopia realizada pelo Serviço de Endoscopia Gastrointestinal (HC-FMUSP) 6 meses após a cirurgia foram realizadas biópsias nos seguintes pontos:

Grupo 1 = Ponto C1 = *10 cm válvula ileocecal*

Grupo 2 = Ponto C2 = *10 cm válvula ileocecal*

5.9 BIÓPSIAS INTESTINAIS

5.9.1 Preparação das biópsias

As amostras de tecido fresco biopsiadas do íleo foram coletadas e devidamente armazenadas de acordo com finalidade individuais das análises propostas no estudo. As biópsias (15-20 mg) para análise imuno-histoquímica foram colocadas em microtubos de 1,5 mL contendo formol a 10% e reservada a temperatura de 6 °C por 24h. No dia seguinte, o material das biópsias são passados para microtubos de 1,5 mL contendo álcool 70% em temperatura ambiente e levados para Patologia para processo de inclusão em parafina.

As biópsias (15-20 mg) para análise Expressão Gênica foram armazenadas em microtubos de 1,5 mL em solução preservadora DNA\RNA Shield™ e preservadas a temperatura de 6 °C por 24h. No dia seguinte as biópsias passadas para microtubos de 1,5 mL criogênico e colocadas em nitrogênio líquido para transporte até freezer -80 °C, onde mostra que fica armazenada até o processo de extração do RNA tecidual.

5.9.2 Análise de Célula L por Imuno-histoquímica

O tecido incluído em parafina foi cortado em secções e as lâminas foram confeccionadas. Os cortes histológicos serão tratados por lavagens seriadas para bloquear a peroxidase endógena e ativar o antígeno específico para cada anticorpo utilizado. A Tabela 1 encontra a lista dos anticorpos e respectivos detalhes técnicos. Os cortes histológicos serão incubados com os anticorpos primários (diluídos em PBS) irão ficar overnight a 4 °C. A diluição dos anticorpos primários utilizada foi de 1:1000.

Tabela 2 - Anticorpos utilizados com respectivo clone, marca, concentração e método de recuperação do antígeno.

Anticorpo	Clone	Marca	Diluição	Recuperação do antígeno
GLP-1	PA579303 (monoclonal)	Thermo Fisher Scientific	1:1000	Tampão com citrato de sódio; Micro-ondas
PYY ₃₋₃₆	PA595608 (policlonal)	Thermo Fisher Scientific	1:1000	Tampão com citrato de sódio; Micro-ondas

No dia seguinte, após o overnight, os cortes foram lavados com PBS e a reação revelada usando o Novo link Polymer Detection System™ (Novo castra, Reino Unido). A incubação foi efetuada com Post Primary Block. A atividade da peroxidase foi desenvolvida com solução de trabalho DAB. As lâminas foram lavadas com água e os cortes contra corados com hematoxilina de Carazzi, montados com bálsamo do Canadá.

Para validação estatística foram realizadas a contagem de células de 10 campos aleatórios para cada lâmina, em cada anticorpo testado. A identificação de antígenos nos tecidos com anticorpos foi feita através da secção corada em células da mucosa intestinal do tecido alvo (íleo), sendo sinalizado com X considerando apenas as células com marcação positiva.

5.9.3 Análise de expressão de GLP-1 e PYY₃₋₃₆ por RT-qPCR

5.9.3.1 Extração do RNA e quantificação

Para extração de cerca de 100 mg de RNA do tecido processado, adicionou-se 500µL de Trizol (Invitrogen™) no microtubo de 1,5 mL e colocados na Tissuelyser (Qiagen™) com microesferas de alumínio de 5mm (Qiagen™) por 15 min a 4°C, para pulverizar o tecido e facilitar rompimento da membrana celular.

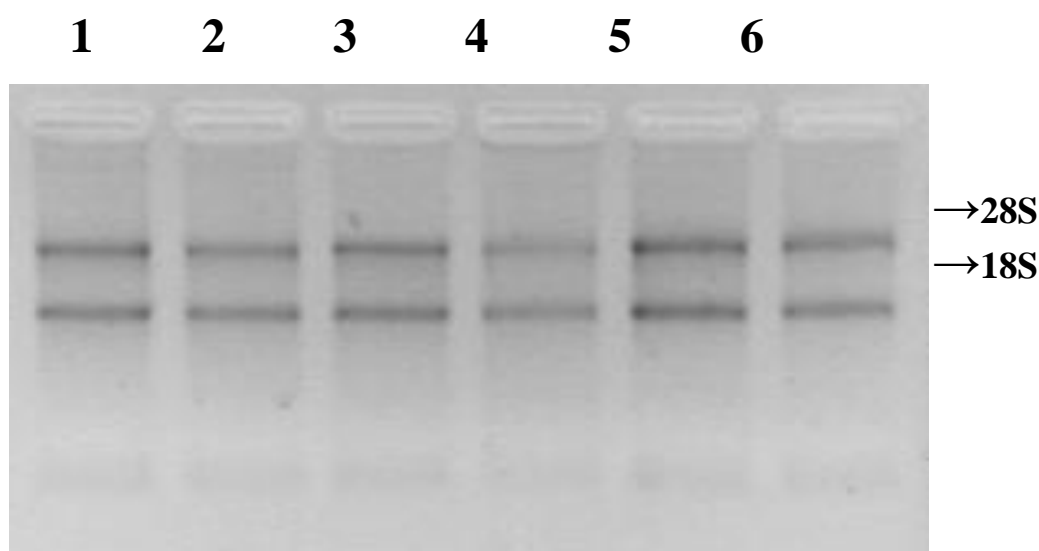
Adicionou-se 200µL de clorofórmio para cada 500µL de Trizol por tubo, levou-se ao vórtex para centrifuga por 15 min a 4 °C por 12.000rpm. Após a centrifugação, formou-se de 3 fases: a inferior fenólica (proteínas), a fase intermediária (DNA) e a superior aquosa (RNA).

Transferiu-se a fase aquosa para um novo microtubo e adicionou-se 0,5 mL de álcool isopropílico gelado. Incubou-se as amostras à temperatura ambiente durante 10 minutos e um ciclo de centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos a 4 °C foi realizado. O sobrenadante foi removido e o precipitado de RNA foi lavado com 1,0 mL de etanol a 75%. Centrifugou-se por 5 minutos a 10.000 rpm a 4 °C. O RNA foi solubilizado em 50 a 100 µL de água ultrapura estéril livre de DNase/RNase.

A concentração do RNA extraído foi determinada em espectrofotômetro NanoDrop (ND-1000™ *Spectrophotometer, Nano Drop Technologies, USA*) a 260 nm e 280 nM,

utilizando-se como valor padrão $1 \text{ OD}_{260}=40 \mu\text{g/mL}$ de RNA. Avaliou-se o grau de pureza do RNA pela relação 260/280 nm, sendo utilizados apenas aqueles cuja relação é $\geq 1,8$. Para checagem da integridade do RNA extraído, realizou-se eletroforese em gel de agarose 1,0% para verificação da presença das bandas correspondentes aos RNAs ribossomais 18S e 28S. Os RNAs foram estocados em freezer -80°C até o uso. (Figura 8)

Figura 8. Ilustração de gel com presença de 6 amostras bandas 28S e 18S.



5.9.3.2 Síntese de cDNA

Para transcrição de cDNA utilizou-se o Kit High Capacity RNA-to-cDNA Kit (50 reações-Thermo Fisher): 2X RT Buffer Mix (50 \times 20- μL reactions) e 20X RT Enzyme Mix (50 \times 20- μL reactions) 500 μg de RNA, com diluição de 1:5, obteve-se 20 μL de cDNA. Na preparação da reação de cada amostras, os seguintes componentes foram colocados em microtubo de 1,5 mL: 10,0 μL (2X RT Buffer Mix), 1,0 μL (20X RT Enzyme Mix) 2 μL (amostra RNA) e 8 μL (Nuclease-free H_2O), volume total 20,0 μL para cada amostra de RNA a ser transcrita.

As reações foram incubadas a 37 °C por 60 min, posteriormente a 95 °C por 5 min em termociclador Applied Biosystems. Os cDNAs foram armazenados a -20 °C até serem utilizados para as reações de qRT-PCR.

5.9.3.3 RT-qPCR dos genes alvos GLP-1 e PYY₃₋₃₆

A análise da expressão gênica foi realizada por qRT-PCR no termociclador StepOnePlus™ (Applied Biosystems, Life Technologies, Foster City, EUA), utilizando-se os ensaios *TaqMan® Gene Expression Assays* (Applied Biosystems). Os ensaios para os genes alvos selecionados GLP 1, PYY₃₋₃₆ e do controle endógeno 18S foram adquiridos da empresa Thermo Fisher Scientific. (Tabela 3)

Os ensaios *TaqMan® Gene Expression Assays* contém *primers* (oligonucleotídeos), que flanqueiam a região de interesse para amplificação por PCR, e uma sonda, com 18 a 22 pares de bases, complementar a uma região interna do produto de PCR. Uma molécula denominada MGB (*Minor Groove Binder*) também está afixada na sonda, tendo a função de elevar a sua temperatura de anelamento, permitindo ligação mais específica, e evitando ligações e amplificações inespecíficas.

A sonda está intacta, a interação ocorre entre o *dye reporter* e o *quencher* impede que a fluorescência seja emitida. Durante a reação de qRT-PCR, ocorre o anelamento da sonda especificamente na sequência complementar, localizada na região delimitada pelos *primers forward* e *reverse*. Esta sonda ligada ao fragmento é clivada devido à atividade exonuclease 5' --> 3' da Taq DNA polimerase, causando a liberação do *dye reporter* e a emissão de fluorescência. Esse processo se repete em cada ciclo e não interfere com o acúmulo de produto da PCR.

Tabela 3 Sondas com respectivo gene, ensaio, localização no genoma (exon), amplicon.

<i>Gene</i>	<i>Ensaio</i>	<i>Locus (exon)</i>	<i>Amplicon (pb)</i>
PYY ₃₋₃₆	Hs 00373890_g1	812(6-7)	150
GLP-1	Hs 00157705_m1	346(3-4)	78
18S	Hs 99999901_s	604(1-1)	187

Para amplificação utilizou-se as seguintes condições de reação: 10,0 µL de TaqMan® *Gene Expression Master Mix* 2X, 1,0 µL de Taqman® *Gene Expression Assay* 20X, 5,0 µL de água RNase-DNase *free* e 4,0 µL cDNA (1 a 100 ng) somando um total de 20 µL para cada reação. Foram utilizados os seguintes parâmetros de ciclagem: 2 min a 50°C, 10 min a 95°C, seguidos por 40 ciclos a 95°C por 15 seg e 60°C por 1 min no termociclador Applied Biosystems StepOnePlus™. (Figura 8)

Os valores da quantificação relativa (RQ) (níveis relativos à expressão de RNA) foram calculados pelo método *Delta-Delta Comparative Threshold* ($\Delta\Delta Ct$)⁽⁷⁴⁾ com controle endógeno para normalizar os dados. O valor de *threshold-cycle* (Ct) para cada gene alvo foi normalizado pela subtração do valor médio de Ct do gene endógeno 18S ($\Delta Ct = Ct$ alvo – Ct gene controle).

Figura 9. Termociclador StepOnePlus™ Applied Biosystems



Fonte: Acervo pessoal da autora, 2022

5.9.4 Análise estatística

O processo de análise de dados da presente pesquisa iniciou-se com uma exploração descritiva resultando em tabelas de frequência para variáveis qualitativas que contaram ainda com a inclusão do intervalo de confiança para a proporção (IC95%). Estatísticas descritivas incluindo média, desvio padrão, mediana, mínimos e máximos foram calculadas para resumir as variáveis quantitativas contínuas e discretas. ⁽⁷⁹⁾.

Para avaliar a diferença na diminuição do IMC foi utilizado o teste de Wilcoxon Pareado.

Para testar a hipótese de não modificação das medidas de contagem de célula nas regiões avaliadas, um modelo de ANOVA de medidas repetidas não paramétrico foi utilizado.

⁽⁸⁰⁾. Todos os testes levarão em consideração um α bidirecional de 0.05 e um intervalo de confiança (IC) de 95% e foram realizados com apoio computacional dos softwares R.

6 RESULTADOS

6.1 RESULTADOS:

Foram avaliados 120 candidatos da lista do Serviço da Cirurgia Bariátrica do HCFMUSP, sendo que 20 indivíduos preenchiam os requisitos do critério de inclusão. O protocolo iniciou-se antes da pandemia com inclusão dos indivíduos aptos, após 1 mês do início ocorreu pausa no protocolo e seguimos apenas monitorando pacientes a distância.

Retomada da pesquisa foi dentro das normas de ética e segurança, sendo possível realizar intervenção cirúrgica e coleta biopsias pré-operatória em apenas 15 candidatos devido aos prazos a serem cumpridos dentro cronograma de pós-graduação, e somente 13 pacientes deste grupo concluíram a etapa de coleta pós-operatória.

6.1.1 Dados antropométricos

Os dados antropométricos pré e pós GDYR encontram-se na tabela 4. Houve redução significativa do IMC (pré: $42,1 \pm 5,5$ Kg/m²; pós : $31,8 \pm 5$ Kg/m²; p=0,008). Pacientes apresentam média total de delgado ($687,9 \pm 53,8$).

Tabela 4. Dados antropométricos dos pacientes pré e pós GDYR do HCFMUSP.

Paciente (n=13)	Idade (anos)	Alça BL (1/2)	Alça T(cm)	IMC PRÉ (kg/m ²)	IMC PÓS (kg/m ²)
1	58	1	630	36,6	28,6
2	54	2	670	50,8	39,0
3	67	2	1000	47,4	37,1
4	42	1	750	41,8	31,2
6	41	2	770	37,8	26,7
9	49	1	690	44,6	36,1
12	41	2	650	48,5	38,7
14	62	2	730	35,1	26,1
15	45	1	660	35,4	27,9
16	50	2	775	44,8	27,8
17	47	1	720	44,5	33,7
18	55	1	630	35,0	34,9
19	60	2	650	45,6	25,5
Média ± DP	51,6 ± 8,5		687,9±53,8	42,1 ± 5,5	31,8 ± 5

6.1.2 - Células L

6.1.2.1 – Imunomarcagem da célula L por PYY

Os resultados de células L imunomarcadas por PYY estão no gráfico 1. Observamos que houve aumento no número de células L marcadas pelo PYY de T1 ($17 \pm 10,5$) para T2 ($23,5 \pm 10,7$) na GDYR. Houve diferença densidade de células entre os pontos A e B em relação a C, sendo aumento significativo ($p < 0,0001$) apenas no ponto C (figura 10). Na análise descritiva pode ser observado o mesmo resultado nas variáveis de desvio padrão (DP), mediana e análise do percentil do total de célula L para anti-PYY, (tabela 5).

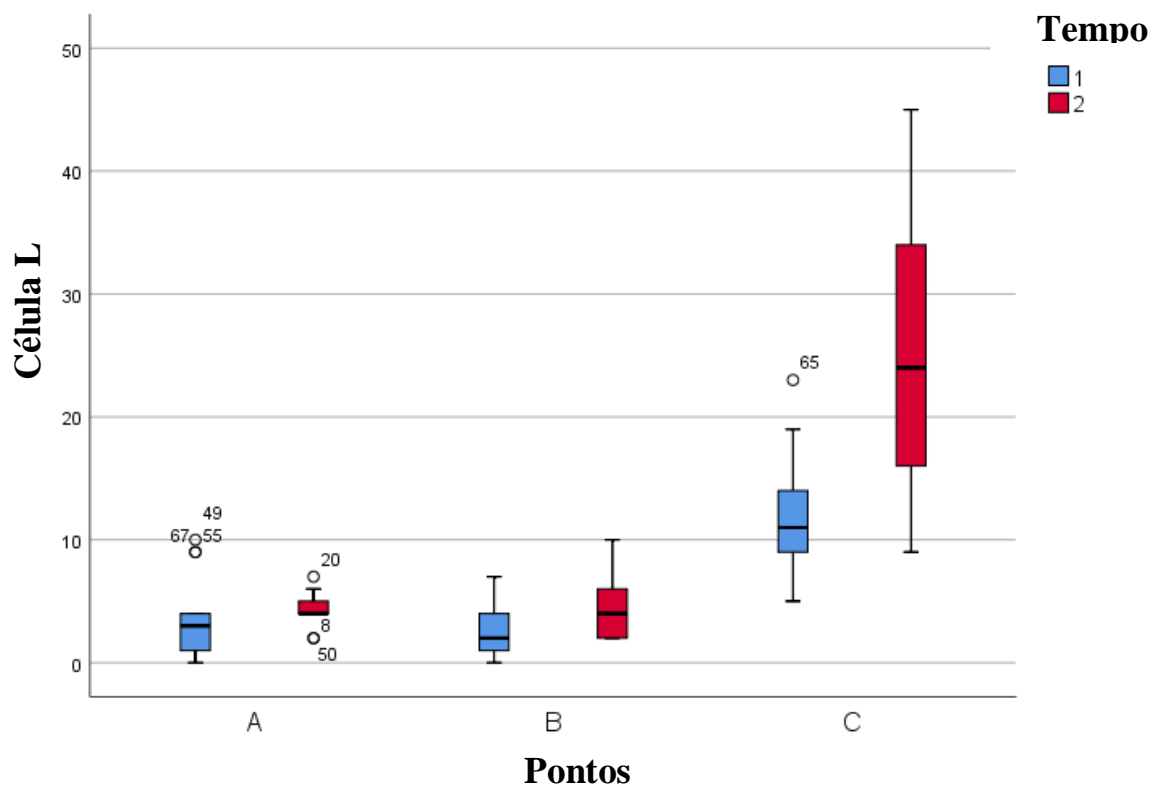


Gráfico1. Gráfico de boxplot do total de Células L nos pontos A, B e C para anti-PYY de T1 e T2 na GDYR.

Tabela 5. Análise descritiva das variáveis: desvio padrão (DP), mediana, percentil.

Ponto	Tempo	Média (\pm DP)	Mediana	Percentil (25% a 75%)
A	1	4 \pm 4	3	1-4
	2	4 \pm 1	4	4-5
B	1	3 \pm 2	2	1-4
	2	4 \pm 2	4	2-6
C	1	12 \pm 6	11	9-14
	2	24 \pm 12	24	16-34

Nas imunomarcações pelo anti-PYY foi visível aumento de células L no ponto C em relação ao ponto A. Refere se a porção superior período T1 e inferior ao T2 na GDYR. (figura 10)

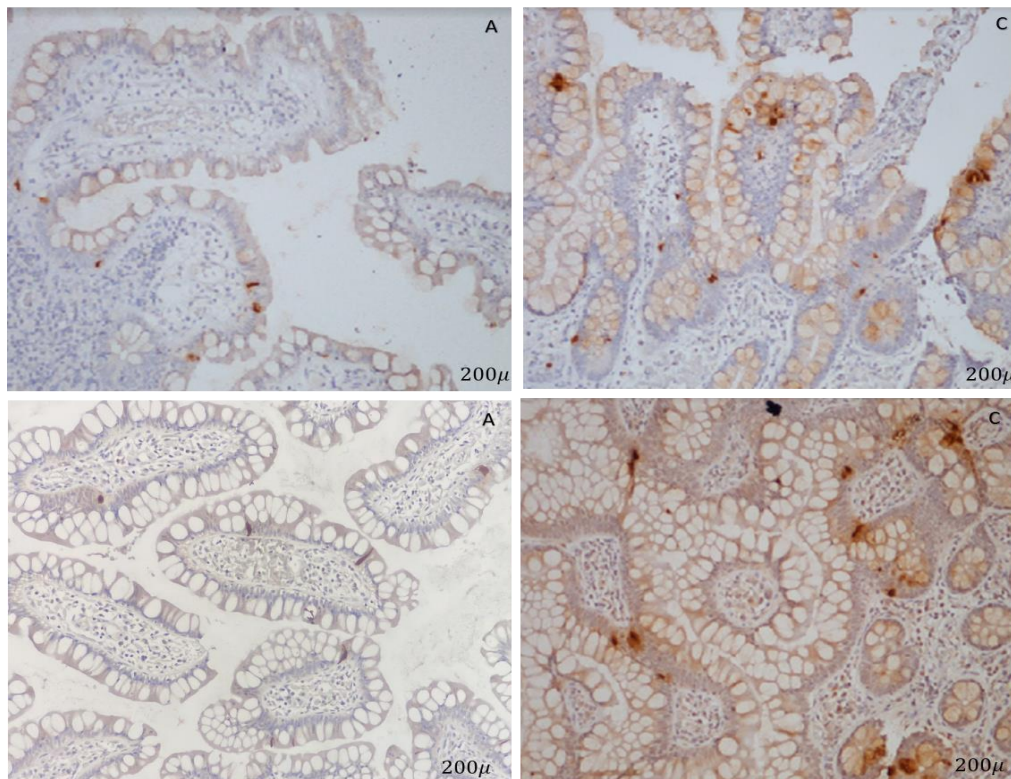


Figura 10. Imunomarcção com anticorpo policlonal PYY. Observe o aumento do número de células L ponto A em relação a C.

No gráfico 2, representa o efeito relativo do T1 e T2 na GDYR, sendo observado aumento linear e contínuo no ponto C em todos os pacientes enquanto os pontos A e B não se alteraram significativamente entre T1 e T2.

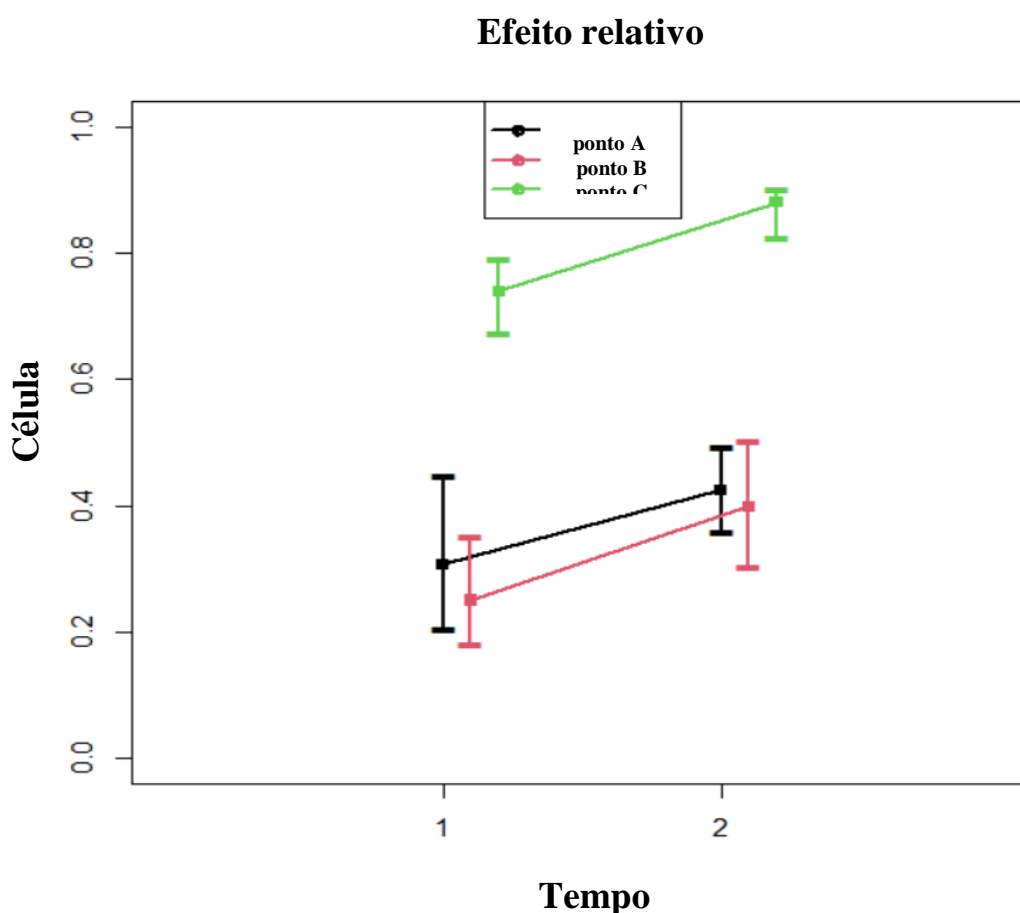


Gráfico 2. Efeito relativo do total de Células L em relação ao T1 e T2 na GDYR no anti-PYY.

Na análise estratificada do G1 para PYY a relação T1($2,6 \pm 1,8$) e T2($4,5 \pm 0,83$) na GDYR nos pontos A e B se manteve em ambos os grupos sem diferença significativa, enquanto no ponto C ocorre aumento significativo ($p=0,002$), ilustrado no gráfico 3.

Na análise do G2 para PYY a relação de $T1(4,7 \pm 2,39)$ e $T2(7,3 \pm 3,93)$ na GDYR nos pontos A e B se mantém em ambos os grupos sem diferença significativa, enquanto no ponto C ocorre aumento significativo ($p=0,001$), gráfico 3.

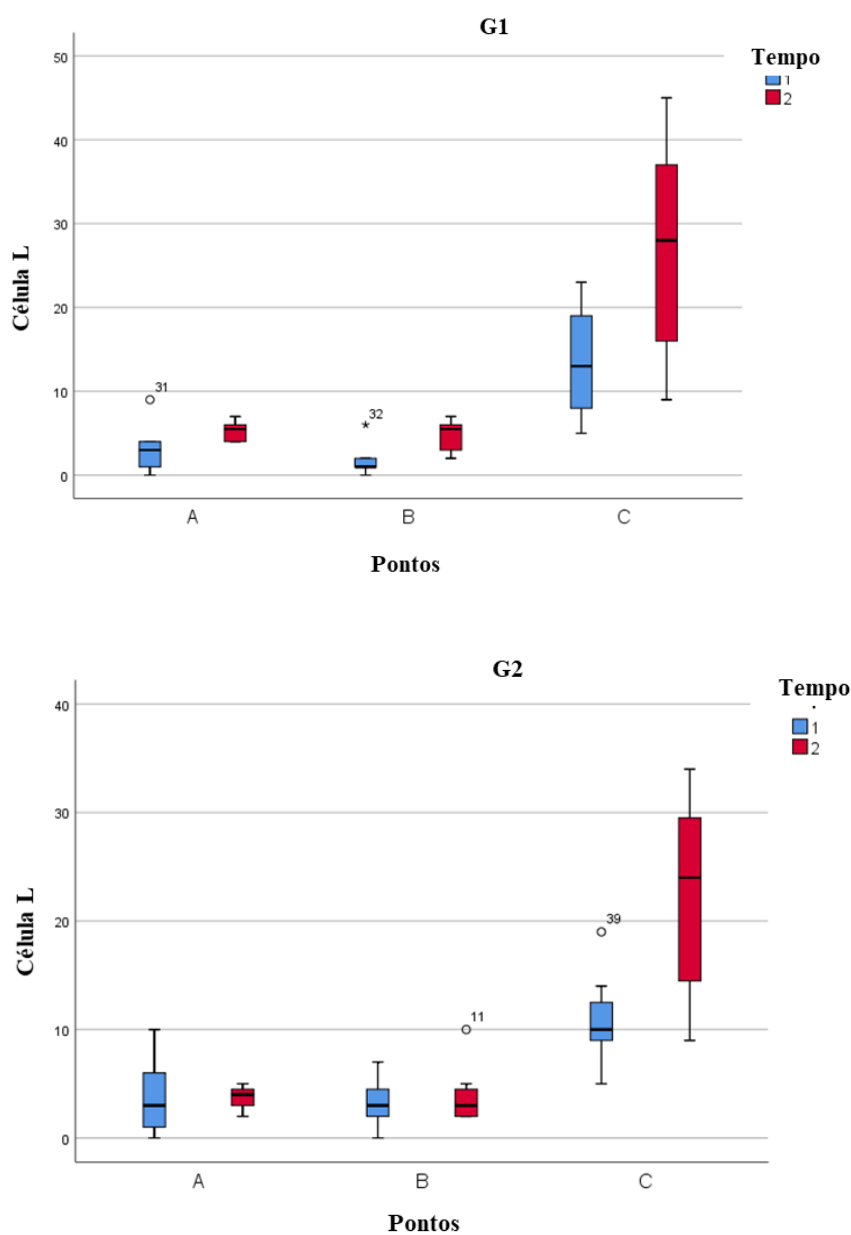


Gráfico 3. Análise estratificada por grupo G1 e G2 nos pontos A, B e C no T1 e T2 da GDYR para anti-PYY.

Na análise descritiva estratificada de G1 e G2 pode ser observado mesmo resultado nas variáveis de desvio padrão (DP) e mediana do total de célula L para anti-PYY, nos tempos T1 e T2 da GDYR. (tabela 6).

Tabela 6. Análise descritiva do número de células L de acordo com a extensão do ABP em T1 e T2.

PYY	G1 (n=6)		G2 (n=7)	
	T1	T2	T1	T2
A	3,3± 3,1	4,5 ±1,4	3,9± 4,4	3,6 + 3,5
B	1,8± 2,1	4,4 ±2,4	3,3± 2,4	2,6 ±2,3
C	13,5± 6,7	24,5 ±11,7	3,3± 2,4	12,2±5,5

6.1.2.2 - Imunomarcção de célula L por GLP-1

O resultado da contagem do total células L para o GLP-1 apresenta-se no gráfico 4. Observamos que houve aumento no número de células L marcadas pelo GLP-1 de T1 para T2 na GDYR. Houve diferença entre os pontos A e B em relação ao ponto C sendo observado aumento significativo ($p < 0,0001$) apenas no ponto C. Na análise descritiva pode ser observado o mesmo resultado nas variáveis de desvio padrão (DP), mediana, percentil do total de célula L para anti-GLP-1 (tabela 7).

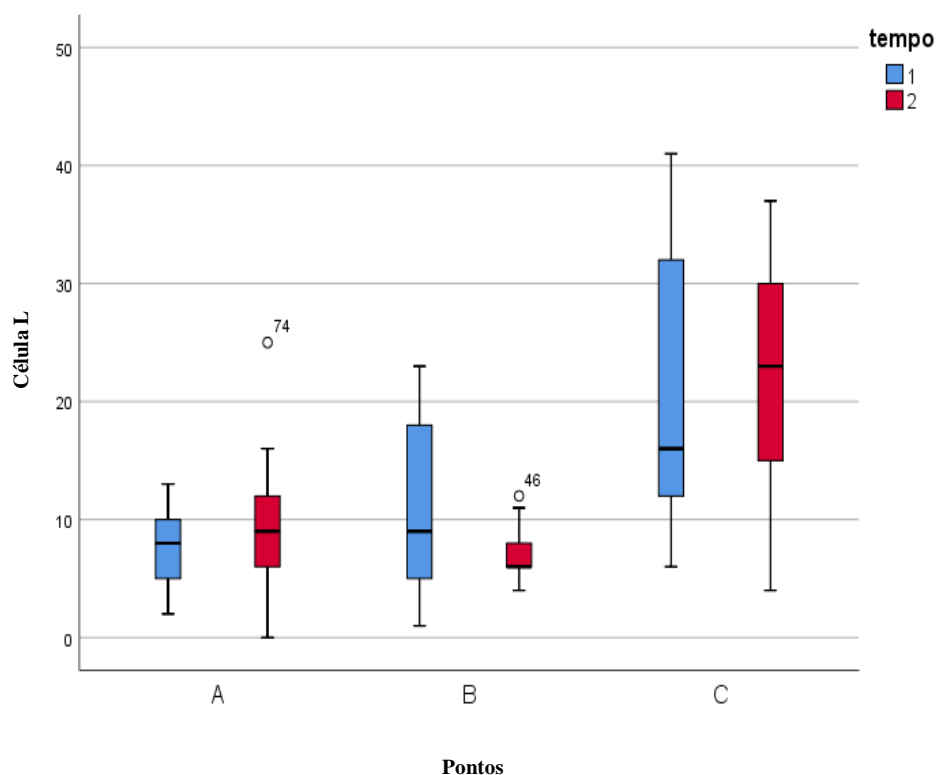


Gráfico 4. Gráfico de boxplot do total de Células L nos pontos A, B e C para anti-GLP-1 no T1 e T2 GDYR.

Tabela 7. Análise descritiva das variáveis: desvio padrão (DP), mediana, percentil.

Ponto	Tempo	Média (\pm DP)	Mediana	Percentil (25% a 75%)
A	1	8 ± 4	8	5-10
	2	10 ± 7	9	6-12
B	1	11 ± 8	9	5-18
	2	7 ± 3	6	6-8
C	1	21 ± 12	16	12-32
	2	22 ± 10	23	15-30

Nas imunomarcações pelo anti-GLP-1 foi visível o aumento significativo ($p=0,009$) de células L no ponto C em relação ao ponto A conforme observado e confirmado por análise

imuno-histoquímica. Refere-se a porção superior período T1 e inferior ao T2 na GDYR. (figura 11)

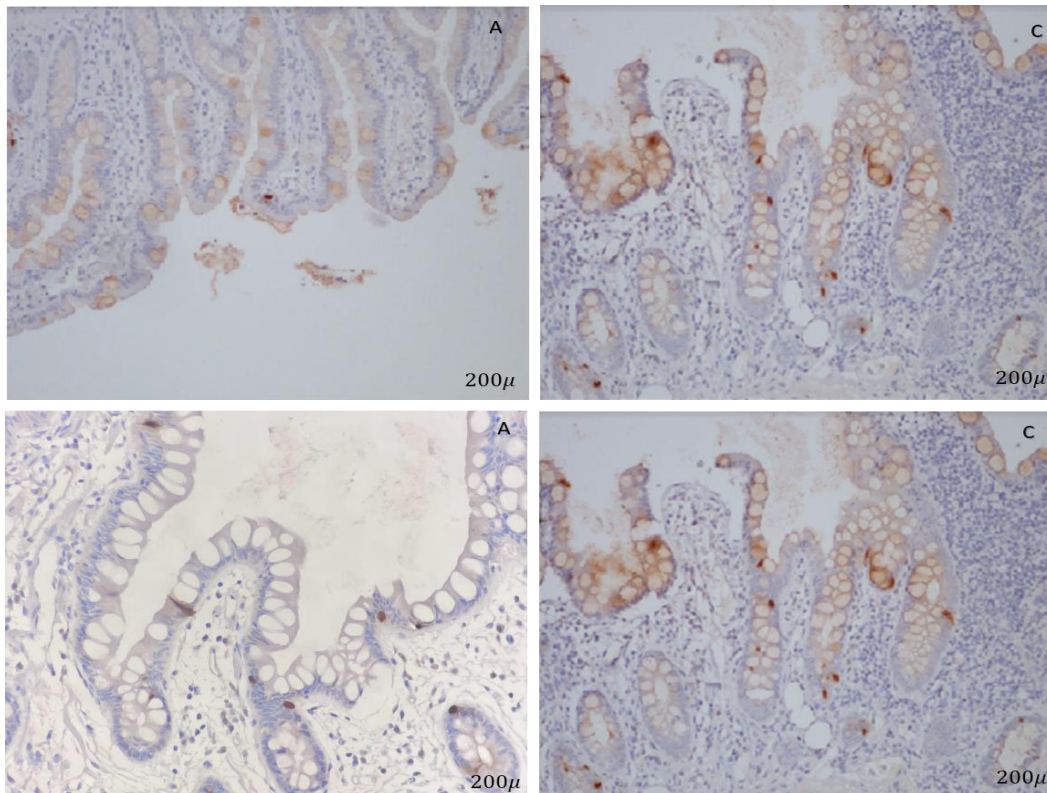


Figura 11. Imunomarcção com anticorpo monoclonal GLP-1. Observe o aumento do número de células L ponto A em relação a C.

No gráfico 5, que representa o efeito relativo do T1 e T2 na GDYR, é observado aumento linear e contínuo no ponto C em todos os pacientes, enquanto pontos A e B se mantêm do T1 e T2, apesar de sobrepor não há diferença significativa ($p=0,009$).

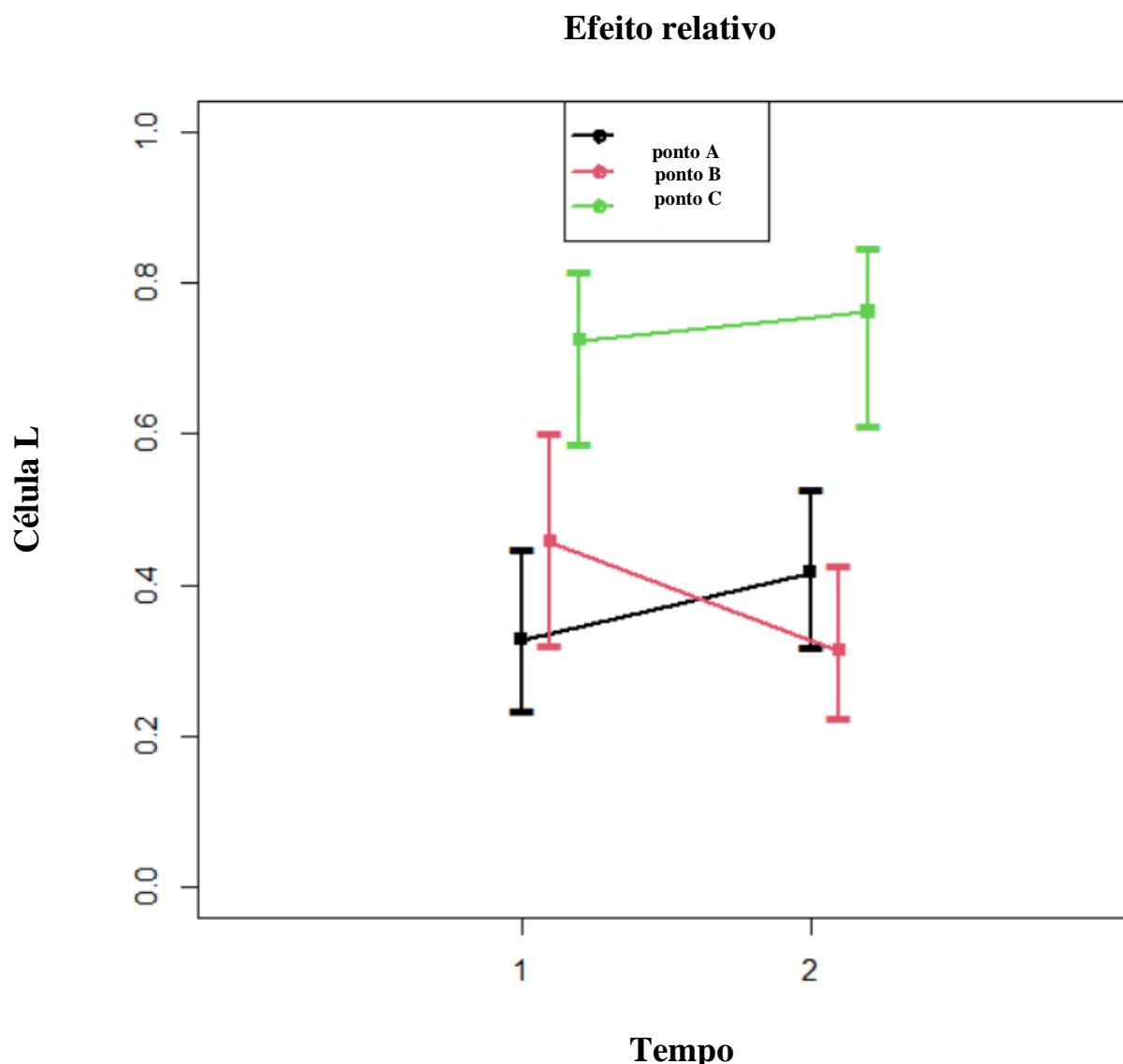


Gráfico 5. Efeito relativo do total de Células L em relação ao T1 e T2 na GDYR no anti-GLP-1.

Na análise estratificada pelo grupo G1 para GLP-1 a relação T1($9,5 \pm 3,5$) e T2($8 \pm 3,5$) na GDYR nos pontos A e B se mantém em ambos os grupos sem diferença significativa, enquanto no ponto C ocorre aumento significativo ($p=0,002$), ilustrado no gráfico 6

Na análise do grupo G2 para GLP-1 a relação de T1($11,6 \pm 6,23$) e T2($10,5 \pm 4,6$) na GDYR nos pontos A e B se mantém similar em ambos os grupos sem diferença significativa, enquanto no ponto C ocorre aumento significativo ($p=0,001$), ilustrado no gráfico 6.

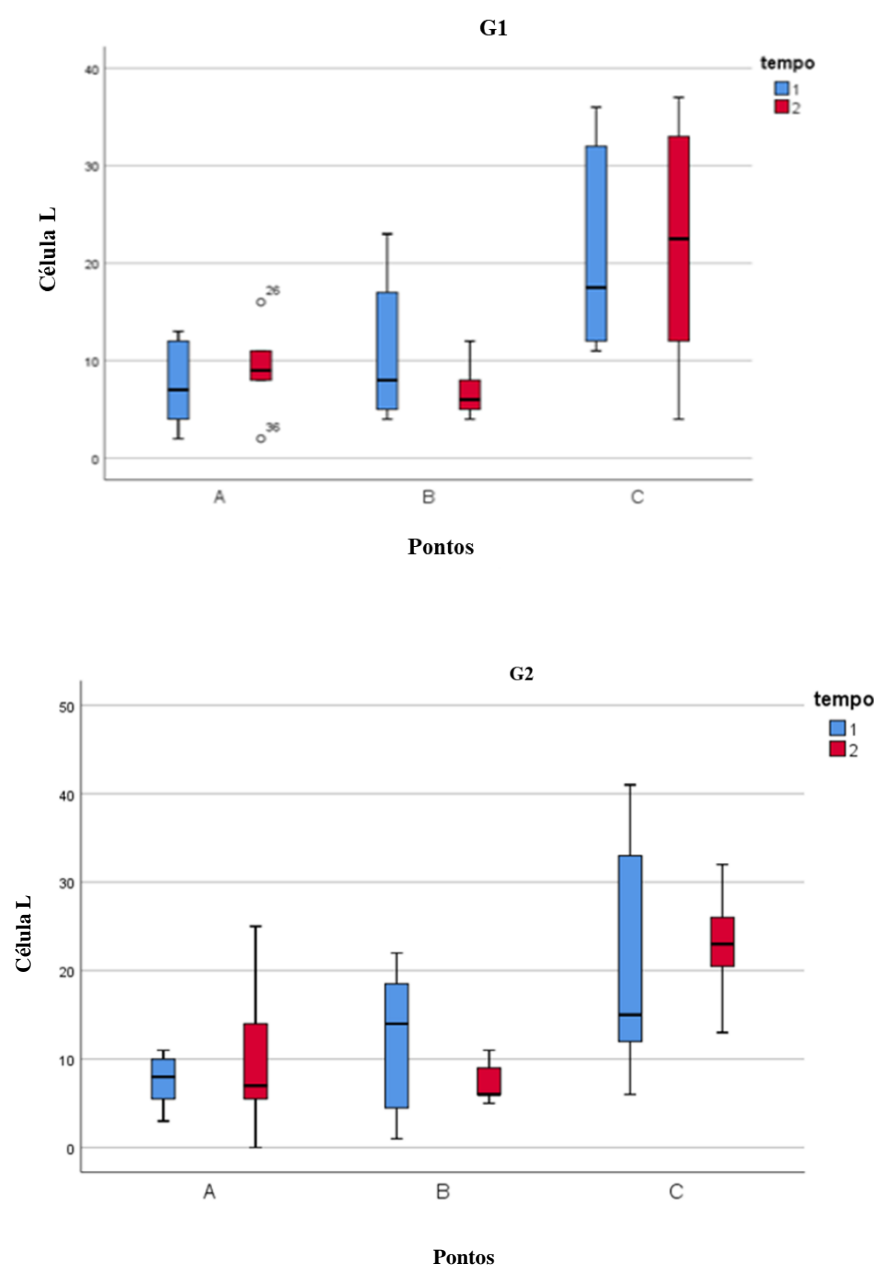


Gráfico 6. Análise estratificada por grupo G1 e G2 nos pontos A, B e C no T1 e T2 da GDYR para anti-GLP-1.

Na análise descritiva estratificada por grupo G1 e G2 pode ser observado mesmo resultado nas variáveis de desvio padrão (DP) e mediana do total de célula L para anti-GLP-1, nos tempos T1 e T2 da GDYR. (tabela 8)

Tabela 8. Análise descritiva do número de células L de acordo com a extensão do ABP em T1 e T2

GLP-1	G1 (n=6)		G2 (n=7)	
	T1	T2	T1	T2
A	7,5±4,5	9,7±6,6	7,6 ±3,0	7,5±3,6
B	10,8 ±7,8	7,2±2,6	11,9±8,5	11,4±7,2
C	21 ±10,5	22,5 ±9,6	23,1±13,3	22,1±11,7

Observou-se um aumento significativo ($p=0,003$) de células L no ponto C do período pré-operatório para o pós-operatório apenas no ponto C. Conforme observado em pacientes e confirmado por resultados de análise expressão mRNA para GLP-1 e PYY no capítulo a seguir.

6.1.2.3 - Expressão de mRNA pelo gene alvo PYY

Houve aumento na expressão mRNA de T1 ($17,3 \pm 0,3$) em relação a T2 ($16,6 \pm 1$) na GDYR. Não houve diferença significativa entre os pontos A, B, e C ambas expressaram de forma similar, notamos aumento significativo ($p < 0,0001$) em T2 nos pontos A, B e C. (gráfico 7).

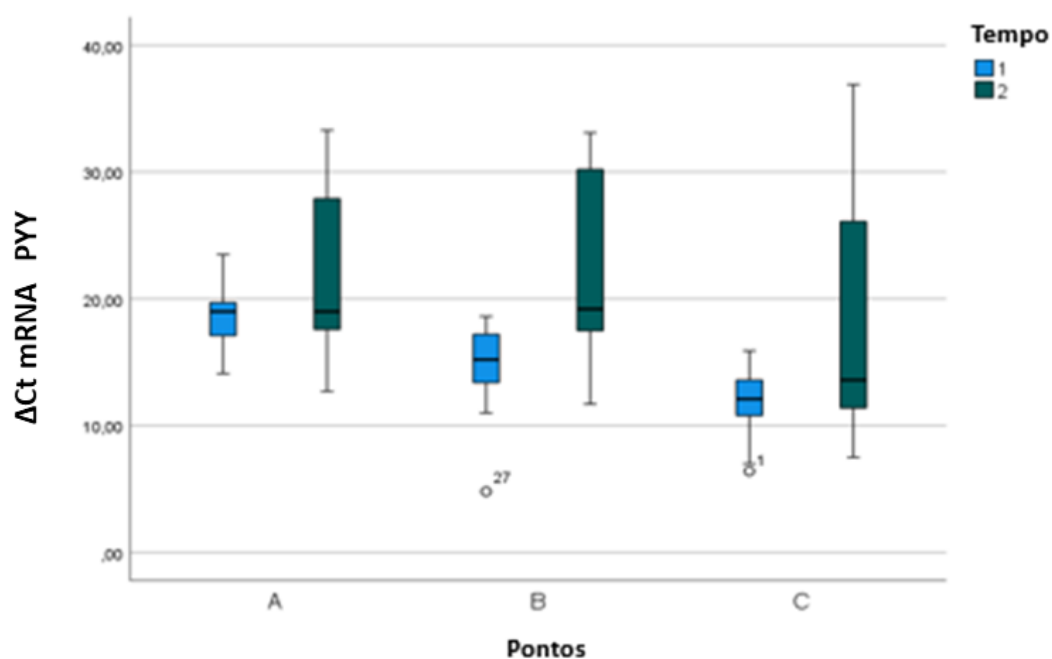


Gráfico 7. Gráfico de boxplot do valor ΔC_t de mRNA para genes alvo de PYY em T1 e T2.

Na análise descritiva estratificada por grupo G1 e G2 pode ser observado mesmo resultado nas variáveis de desvio padrão (DP) e mediana do total de célula L para anti-GLP-1, nos tempos T1 e T2 da GDYR. (tabela 9). É visível aumento expressivo dos pontos A,B e C em T2 tanto para grupo G1 como G2, não havendo diferença na expressão entres mesmo e sim similaridade no comportamento dos grupos.(figura 8)

Tabela 09. Valor de ΔC_t do mRNA para genes alvos PYY em T1 e T2.

Ponto	G1(n=6)		G2(n=7)	
	T1	T2	T1	T2
A	17,2 ± 2,8	22 ± 6,9	19,8 ± 1,7	20,5 ± 7,1
B	15,3 ± 2,7	21,6 ± 9,8	14,2 ± 4,5	22,1 ± 6,4
C	13,1 ± 2,2	19,5 ± 11,1	10,7 ± 3,5	17,1 ± 9,3

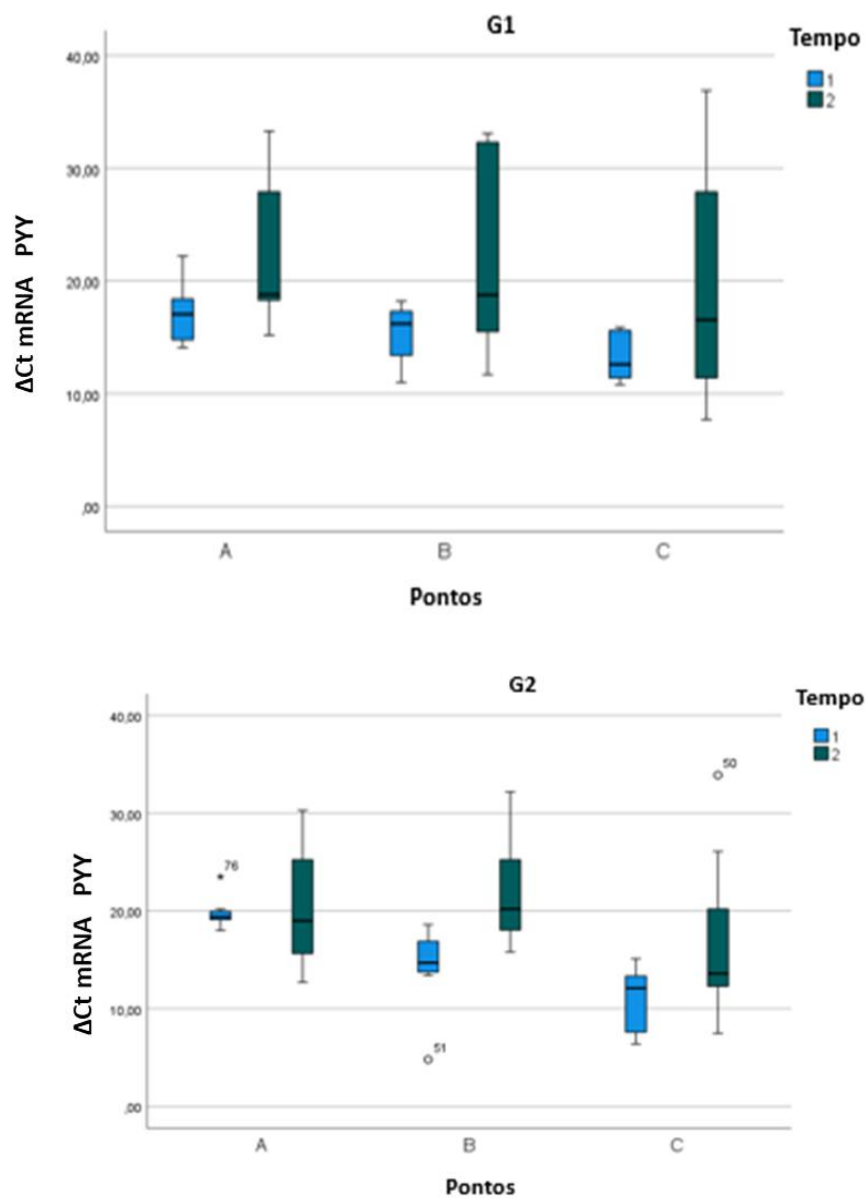


Gráfico 8. Gráfico de boxplot do valor ΔC_t de mRNA para genes alvo de PYY em G1 e G2.

6.1.2.4- Expressão do mRNA pelo gene alvo GLP-1

Houve aumento na expressão mRNA por GLP-1 em T1 ($16,1 \pm 10,4$) em relação a T2 ($23,2 \pm 4,41$) GDYR. Não houve diferença significativa entre os pontos A, B, e C entre os grupos 1 e 2. Houve aumento significativo ($p < 0,0001$) em ambos os pontos A, B e C. (figura 9)

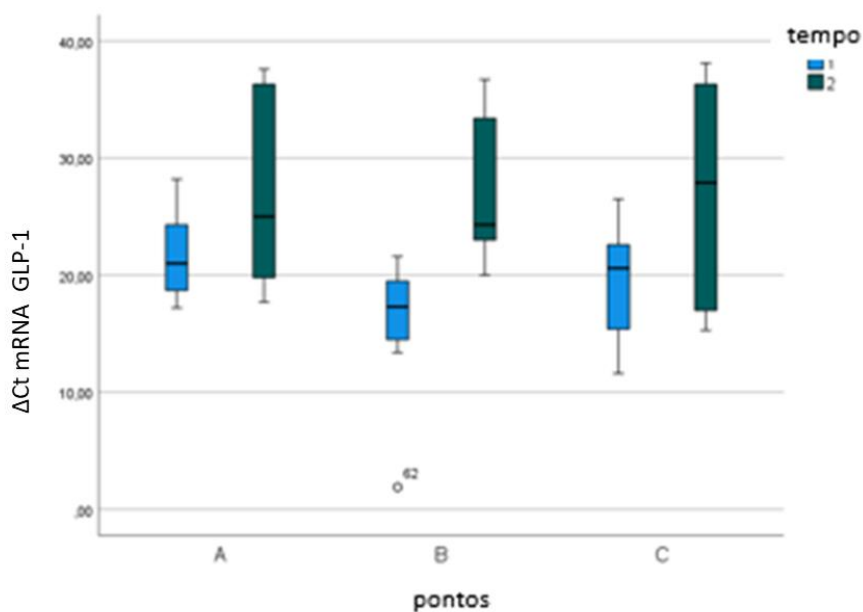
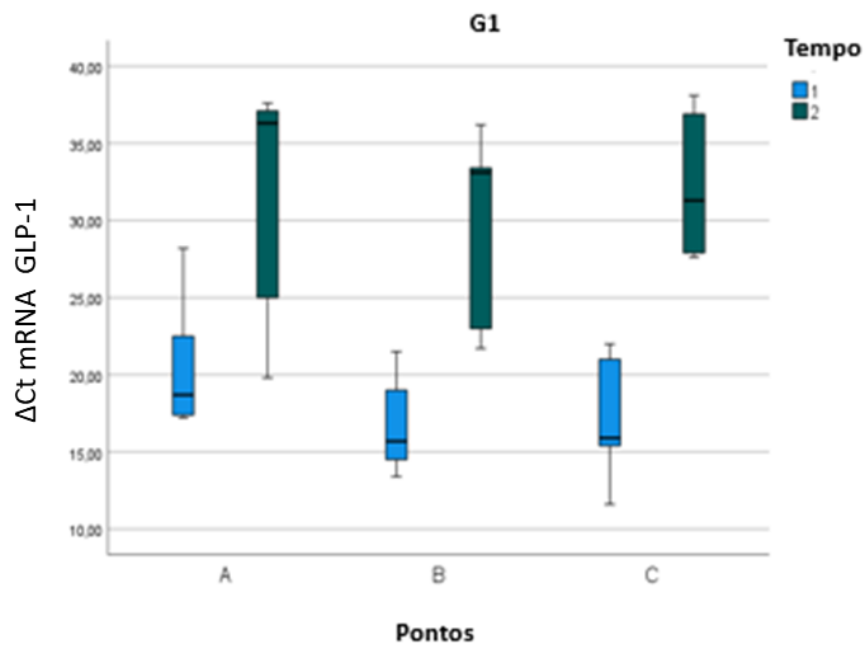


Gráfico 9. Gráfico de boxplot do valor ΔC_t de mRNA para genes alvo de GLP-1 em T1 e T2.

Na análise descritiva estratificada por grupo G1 e G2 pode ser observado mesmo resultado nas variáveis de desvio padrão (DP) e mediana do total de célula L para anti-GLP-1, nos tempos T1 e T2 da GDYR. (tabela 10). É visível aumento expressivo dos pontos A, B e C em T2 tanto para grupo G1 como G2, não havendo diferença na expressão entres mesmo e sim similaridade no comportamento dos grupos. (figura 10)

Tabela 10. Valor de ΔCt do mRNA para genes alvos GLP-1 T1 e T2.

Ponto	G1(n=6)		G2(n=7)	
	T1	T2	T1	T2
A	20,8 \pm 4,6	31,1 \pm 8,2	22 \pm 2,8	26,2 \pm 8,1
B	16,8 \pm 3,3	29,4 \pm 6,6	16,2 \pm 6,3	26,4 \pm 6,2
C	17,1 \pm 4,2	32,3 \pm 4,9	20,8 \pm 4,7	23,9 \pm 9,2



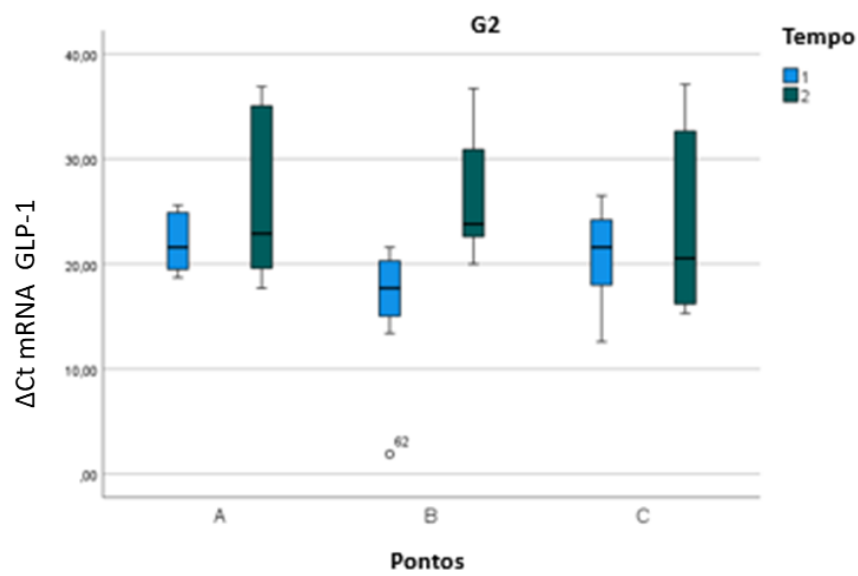


Gráfico 10. Gráfico de boxplot do valor ΔC_t de mRNA para genes alvo de GLP-1 em G1 e G2.

7. DISCUSSÃO

Foram avaliados 20 pacientes com obesidade grave e DM2 do Serviço da Cirurgia Bariátrica do HCFMUSP, sendo possível realizar intervenção cirúrgica e coleta biópsias pré-operatória em apenas 15 candidatos, deste grupo somente 13 pacientes concluíram a etapa de coleta pós-operatória, 2 pacientes não compareceram a convocação da coleta de biópsia pós-operatória. Não houve ocorrência de óbito no decorrer do protocolo.

Por ser um estudo randomizado e subdivido em 2 grupos de tamanho de ABP diferentes, foram realizadas a contagem do total de alças de intestino delgado para inclusão do paciente no grupo de ABP longa, reduzindo a possibilidade deste desenvolver síndromes desabsortivas compatíveis com a alça comum muito curta associadas a desnutrição.⁸¹

O padrão médio da extensão de alça do intestino delgado ($687,9 \pm 53,8$ cm), destacando as seguintes variáveis: anatômicas, modelo cirúrgico, fator nutricional e estímulo incretínicos. Contudo, o diferencial da atividade de resposta entero-hormonal ocorre nas alças AA e ABP, enquanto a alça comum está mais relacionada com perda de peso e absorção nutricional.⁸²

Nosso estudo analisa os efeitos da extensão da alça biliopancreática (longa ou padrão) na densidade e expressão das células L após GDYR e sua possível influência na remissão da DM2 em pacientes com obesidade grave. Alguns estudos já sugerem que o mecanismo híbrido na GDYR atua como gatilho na melhora da secreção de entero-hormônios.⁽⁶⁷⁾

A ingestão de alimentos normalmente estimula a liberação de hormônios intestinais estimulantes da saciedade e da insulina, como o GLP-1 e PYY.⁽⁷¹⁾

Esta resposta é atenuada em indivíduos acometidos pela obesidade e resistentes à insulina, mas é rapidamente restaurada após a cirurgia da GDYR. Isso pode ocorrer

devido a extensão da alça biliopancreática facilitar a chegada do alimento mais rapidamente a porções mais distais. ⁽⁷⁵⁾ E associado as alterações dos sais biliares que ocorrem na mucosa do intestino delgado após o rearranjo anatômico. ⁽⁷⁵⁾

Reservas consideráveis de GLP-1 e PYY são armazenadas em células endócrinas intestinais, células L, onde possuem mecanismos que controlam a secreção de acordo com o estímulo e oferta de nutrientes a mucosa intestinal. ^(27,76)

A GDYR com uma BPL mais longa resulta em um perfil hormonal pós-prandial distinto com respostas aumentadas de GLP-1 e neurotensina que podem ser benéficas para os resultados metabólicos da cirurgia quando comparado ao procedimento clássico. ^(77,78)

Um aumento na densidade de células L ativas resulta na melhor sinalização peptídica, resposta e função do sistema neuroendócrino. É possível observar em seguimentos mais distais do intestino delgado no pós-operatório tardio maior número de células L imunomarcada pelas incretinas GLP-1 e PYY. ⁽⁷³⁾ Nosso estudo observou aumento do número de células ativas após cirúrgica independentemente da extensão da alça BP.

Entretanto, estudo anterior sugere que o alça biliopancreática mais longa no GDYR não afeta a secreção de GLP-1. Portanto, o aumento característico da resposta ao GLP-1 e PYY após o GDYR pode não depender exclusivamente da entrega de nutrientes aos segmentos intestinais mais distais. ⁽³²⁾ Porém é importante considerar que as biopsias são realizadas após jejum de 8h, identificando apenas células com atividade basal, sem estímulo nesse momento.

Em nosso estudo não observamos que a alça biliopancreática mais longa proporciona mais estímulo as células L distais mesmo apresentando uma modulação da expressão gênica nas células L, subsequente na produção incretinas de GLP-1 e PYY. ⁽⁶⁰⁾

Não havendo diferença significativa entre os grupos em relação à expressão do RNA e ao número de células ativas marcadas entre os grupos, embora haja diferença significativa entre os períodos pré e pós-cirúrgico. Portanto, ambas as técnicas são equivalentes, atingindo o objetivo de influenciar na elevação dos níveis de incretinas pós prandias e consequente melhora metabólica. ⁽⁷⁷⁾

Estudos demonstram que as mudanças profundas mediadas pela GDYR na concentração e composição do ácido biliar acredita-se que ocorra devido as adaptações intestinais ocasionadas pelo aumento da absorção de nutrientes. ⁽³⁷⁾ Analisando nossos resultados vemos reflexo dessa possível influência dos ácidos biliares no aumento significativo de sensibilização de células ativas da mucosa e o aumento expressivo dos genes alvos em ambos grupos G1e G2.

8 CONCLUSÃO

8.1. CONCLUSÃO:

Houve aumento significativo número de células L por imunomarcação positiva de GLP-1 e PYY após a GDYR.

Não ocorreu diferença densidade de células ativas entre os grupos ABP padrão e longa.

As células L apresentaram aumento expressivo dos genes GLP-1 e PYY após a GDYR.

Os grupos de ABP padrão e curta demonstraram uma similaridade na expressão dos genes GLP-1 e PYY.

Ambas as técnicas foram equivalentes, proporcionando a melhora da secreção incretínica e aumento densidade das células L.

9.1 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIMENTO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DA PESQUISA

TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: *"Avaliação células L intestinais em pacientes obesos graves com Diabetes Tipo 2 submetidos à gastroplastia em Y Roux"*.

PESQUISADOR: Ms. Priscila Costa Estabile CARGO/FUNÇÃO: bióloga/Biologia Molecular e Celular e Prof. Dr. Marco Aurelio Santo CARGO/FUNÇÃO: Coordenador da Unidade de Cirurgia Bariátrica e Metabólica INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL: N°52911 UNIDADE DO HCFMUSP: Instituto Central do Hospital das Clínicas.

DEPARTAMENTO/INSTITUTO: Cirurgia do Aparelho Digestivo do Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

1 – Convite à participação - Você está sendo convidado(a) a participar de um estudo clínico para avaliar a diferença da quantidade de células produtoras de hormônios (células L) em diferentes partes do intestino, conforme o tamanho do desvio intestinal, após realizar o procedimento de Gastroplastia com derivação em Y de Roux (cirurgia de redução do estômago com desvio do intestino) para o tratamento da obesidade e diabetes mellitus 2. É muito importante incluir uma avaliação clínica para identificar alterações que possam prever melhor o controle do diabetes e da evolução do peso. O médico irá realizar coleta de informações clínicas do diabetes (uso de medicamentos, tempo de história do diabetes, cálculo do índice de massa corpórea – IMC), de doenças associadas à obesidade, coletas de sangue relacionadas à diabetes e biópsias do intestino. Após a realização da cirurgia de obesidade, você continuará o acompanhamento clínico para verificar o controle do diabetes e da evolução de peso com os mesmos exames feitos antes da cirurgia.

2 - Justificativa e objetivos do estudo - O objetivo deste estudo é avaliar a quantidade de células produtoras de hormônios em diferentes partes do intestino conforme o tamanho do desvio intestinal. A Gastroplastia Redutora em Y-de-Roux é o procedimento cirúrgico com a melhor resposta para o controle do Diabetes e perda de peso atualmente, no entanto, o tamanho desse desvio ainda é um assunto em debate. As células L são as responsáveis pela produção e liberação de alguns hormônios com importante papel na perda de peso e controle do Diabetes após a cirurgia de obesidade. Assim, o estudo da população dessas células em diferentes partes do intestino, irá contribuir para a escolha de qual o tamanho do desvio intestinal (maior ou menor) é o melhor para controlar o diabetes e o peso após a cirurgia.

3 – Procedimentos que serão realizados e métodos que serão empregados – Você será selecionado de forma aleatória para ver qual será o tamanho do desvio intestinal que será feito na sua cirurgia de Gastroplastia Redutora em Y- de Roux, ou seja, se será maior (200cm) ou menor (75cm). Serão coletadas biópsias no pré-operatório e após 6 meses da cirurgia bariátrica. As biópsias pré-operatória serão realizadas durante a cirurgia de redução do estômago (serão retiradas pequenas amostras do intestino delgado), com a colonoscopia que é uma endoscopia do intestino grosso. As biópsias pós-operatórias de 6 meses após a cirurgia será feita por enteroscopia, sendo uma endoscopia do intestino fino e, colonoscopia, sendo uma endoscopia do intestino grosso, realizadas no mesmo momento, para a biópsia de diferentes partes do intestino delgado para o estudo da população de células produtoras de hormônios para ver se houve alteração no número dessas células após a cirurgia. Junto com essas coletas, o médico continuará o acompanhamento clínico e laboratorial para verificar o controle do diabetes e da evolução do peso. O procedimento cirúrgico realizado neste estudo será a Gastroplastia redutora com derivação em Y-de-Roux. Os pacientes deste estudo serão divididos em 2 grupos onde todos os aspectos relacionados a cirurgia serão iguais (bolsa do estômago reduzido de 30-50ml, alça do intestino desviado por onde passam os alimentos de 100cm) com exceção do desvio do intestino, que será realizado em um grupo de forma maior e noutro menor.

4 – Explicação de possíveis desconfortos e riscos decorrentes da participação na pesquisa – No momento em que for realizar a endoscopia, há 2 procedimentos adicionais: a enteroscopia e a colonoscopia. Durante a realização desses procedimentos, é oferecida sedação para o conforto do paciente e os procedimentos serão realizados sob efeito da mesma sedação, onde o desconforto será mínimo. No entanto, em decorrência da realização da colonoscopia, deverá ser realizado o preparo de cólon com o uso de remédios laxativos no dia anterior ao exame. Os riscos da enteroscopia e da colonoscopia são os mesmos dos exames de endoscopia realizados de rotina, podendo haver riscos de perfuração e sangramento relacionados ao exame e/ou biópsia.

5 – Benefícios esperados para o participante – acompanhamento e avaliação da evolução do diabetes e da perda de peso.

6 - Esclarecimento sobre a forma de acompanhamento e assistência a que terão direito os participantes da pesquisa – Todos os pacientes serão acompanhados pela equipe multidisciplinar – vários profissionais – do grupo de cirurgia metabólica e de obesidade do HCFMUSP, com garantias de todos os procedimentos necessários, tanto ao nível de internação como ambulatorial, utilizando toda a estrutura do Hospital das Clínicas da FMUSP.

7 – É garantida a plena liberdade ao participante de recusar-se a participar ou retirar o seu consentimento em qualquer fase da pesquisa sem penalização alguma, de sigilo e privacidade, ou em relação à continuidade de seu tratamento na Instituição

8 - Garantia de que o participante receberá uma via do termo de consentimento – Você ficará com uma via deste Termo para guardar e consultar sempre que precisar.

9 – Explicitação das garantias de ressarcimento por despesas decorrentes da pesquisa e explicitação da garantia de indenização por eventuais danos decorrentes da pesquisa - 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 ou por eventuais danos decorrentes.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de dúvidas. O principal investigador é o Prof. Dr. Marco Aurelio Santo, que pode ser encontrado no endereço Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255 - 9º andar Telefone(s) 2661-7561 E-mail: santomarco@uol.com.br. 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: (11) 2661-7585, (11) 2661-1548, (11) 2661-1549; e-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br.

Fui suficientemente informado a respeito do estudo “*Avaliação células L intestinais em pacientes obesos graves com Diabetes Tipo 2 submetidos à gastroplastia em Y Roux*”.

Eu discuti as informações acima com o Pesquisador Responsável Marco Aurelio Santo ou pessoa (s) por ele delegada (s) Priscila Costa Estabile, sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim os objetivos, os procedimentos, os potenciais desconfortos e riscos e as garantias. Concordo voluntariamente em participar deste estudo, assino este termo de consentimento e recebo uma via rubricada pelo pesquisador.

Assinatura do participante/representante legal Data ____/____/____

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____/____

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO (OU ETIQUETA INSTITUCIONAL DE IDENTIFICAÇÃO) DO PARTICIPANTE 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(.....).....

9.2 PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Avaliação células L intestinais em pacientes obesos graves com Diabetes Tipo 2 submetidos à gastroplastia em Y Roux

Pesquisador: Marco Aurelio Santo

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 65854317.8.0000.0068

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.081.258

Apresentação do Projeto:

Os autores apresentam estudo envolvendo a cirurgia bariátrica relacionada à melhora do diabetes tipo 2. A Diabetes Mellitus 2 (DM2) é uma doença sistêmica e multifatorial, que assim como a Síndrome Metabólica (SM) vem causando grande impacto na saúde pública mundial e a obesidade é um fator de risco expressivo para o desenvolvimento da DM2. Paralelamente ao desenvolvimento da cirurgia bariátrica no tratamento da obesidade grave, a observação da melhora da diabetes foi um fato contundente, despertando a possibilidade significativa que a perda de peso fosse responsável por esta melhora. Nas cirurgias onde há ocorrência da má absorção, como na derivação "duodenal switch", a remissão do diabetes gira em torno de 95% e na gastroplastia em Y de Roux (GDYR) a taxa é de cerca de 85%, mas a extensão da alça alimentar e biliopancreática do bypass gástrico de Y de Roux provavelmente influencia na remissão do DM2 após tratamento cirúrgico em pacientes com obesidade grave. Nesse sentido, os autores apontam que estudos que abordaram a eficácia do aumento do comprimento do componente bilio-pancreático na influência do equilíbrio metabólico evidenciaram melhora da sinalização neuroendócrina.

Os peptídeos GLP1 e PYY são expressos pelas células L presentes nas células da mucosa intestinal e demonstram ser reguladores metabólicos. Admite-se que em indivíduos normais a presença de células L em atividade e expressão GLP1 e PYY sejam superiores a indivíduos acometidos de



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE



Continuação do Parecer: 2.081.258

obesidade e DM2, assim como síndrome metabólica. Sendo assim, os autores afirmam que é importante analisar a expressão de células L através da expressão de GLP1 e PYY por meio da imunohistoquímica para marcação e identificação das mesmas, para entender a diferença conforme a localização no território intestinal, e também para interpretação da melhora do quadro metabólico.

Para esse fim, 20 pacientes obesos graves com DM2 que serão submetidos à gastroplastia em Y de Roux, subdivididos de forma prospectiva e randomizada em dois grupos contendo 10 pacientes cada, conforme a extensão da alça bilio-pancreática (maior ou menor). Os pacientes serão selecionados e convocados respectivamente para coleta de dados clínicos, realização de biópsias por enteroscopia e análise de expressão celular por secreção entero-hormonal.

Objetivo da Pesquisa:

Analisar a diferença de expressão das "células L" em diferentes segmentos do intestino delgado, conforme a extensão da alça bilio-pancreática em pacientes submetidos ao procedimento da gastroplastia em Y de Roux, para tratamento da obesidade mórbida e diabetes mellitus 2. Os procedimentos cirúrgicos levam ao desencadeamento de efeitos biológicos diretos que se refletem sobre o metabolismo da glicose, na função endócrina pancreática e em sua via neuroendócrina. Nas cirurgias ainda há ocorrência da má absorção, como na derivação "duodenal switch", a remissão do diabetes gira em torno de 95% e na gastroplastia em Y de Roux (GDYR) a taxa é de cerca de 85%, mas a extensão da alça alimentar e biliopancreática do bypass gástrico de Y de Roux provavelmente influencia na remissão do DM2 após tratamento cirúrgico em pacientes com obesidade grave.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os autores afirmam que os riscos são inerentes ao procedimento cirúrgico já indicado para o tratamento dos pacientes, assim como os benefícios (controle do diabetes e do peso).

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto tem introdução apresentada de forma adequada, assim como o objetivo e os métodos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.



Continuação do Parecer: 2.081.258

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_868976.pdf	17/03/2017 09:57:04		Aceito
Outros	CADASTRO_ONLINE_ASSINADO.pdf	17/03/2017 09:56:05	Marco Aurelio Santo	Aceito
Folha de Rosto	FOLHA_ROSTO_ASSINADA.PDF	17/03/2017 09:55:40	Marco Aurelio Santo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_CAPPesq.docx	13/03/2017 10:45:58	Marco Aurelio Santo	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	FINAL_PROJETO_CELS_L_PRISCILA_31_01.doc	06/03/2017 09:28:05	Marco Aurelio Santo	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 25 de Maio de 2017

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

10 REFERÊNCIAS

10.1 REFERÊNCIAS

1. Ng M, Fleming T, Robinson M, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013 [published correction appears in *Lancet*. 2014 Aug 30;384(9945):746]. *Lancet*. 2014;384(9945):766-781. doi:10.1016/S0140-6736(14)60460-8
2. United Kingdom. Government Office for Science. Department of Health and Social Care. Tackling obesities: future choices - Foresight project looking at how we can respond to rising levels of obesity in the UK [online]. [London]: Gov.UK; 2007 [update 2007 Oct 17, cited 2023 03 20]. Available from: <https://www.gov.uk/government/collections/tackling-obesities-future-choices>
3. Wardle J, Carnell S, Haworth CM, Plomin R. Evidence for a strong genetic influence on childhood adiposity despite the force of the obesogenic environment. *Am J Clin Nutr*. 2008;87(2):398-404. doi:10.1093/ajcn/87.2.398
4. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e Síndrome Metabólica (ABESO) [Internet]. Mapa da obesidade;2021 [acesso em 2022Mar]. Disponível em: <https://abeso.org.br/obesidade-e-sindrome-metabolica/mapa-da-obesidade/>
5. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigitel Brasil 2019: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2020.
6. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Saúde prepara ações para controle do excesso de peso e da obesidade [online]. 22 out 2020 [citado em 24 out 2020]. Brasília (DF): Ministério da Saúde, 2020. Disponível em: <https://aps.saude.gov.br/noticia/10137>.
7. World Health Organization. Obesity and overweight - fact sheet n.311 [online]. Geneva: World Health Organization,c2020 [citado em 17 out 2020]. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
8. Wadden TA, Butryn ML, Byrne KJ. Efficacy of lifestyle modification for long-term weight control. *Obes Res*. 2004;12 Suppl:151S-62S. doi:10.1038/oby.2004.282
9. Ilias EJ. When should a patient be referred for bariatric surgery?. *Rev Assoc Med Bras (1992)*. 2016;62(1):24-25. doi:10.1590/1806-9282.62.01.24
10. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria N° 424, de 19 de março de 2013. Redefine as diretrizes para a organização da prevenção e do tratamento do sobrepeso e obesidade como linha de cuidado prioritária da Rede de Atenção à Saúde das

- Pessoas com Doenças Crônicas. Diário Oficial da União, Brasília (DF). 2013 20 mar.; Seção 1: 23.
11. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria N° 2.172, de 17 de dezembro de 2017. Redefine as diretrizes para a organização da prevenção e do tratamento do sobrepeso e obesidade como linha de cuidado prioritária da Rede de Atenção à Saúde das Pessoas com Doenças Crônicas. Diário Oficial da União, Brasília (DF). 2017 17 dez.; Seção 1: 205.
 12. Guimarães M, Pereira SS, Holst JJ, Nora M, Monteiro MP. Can Metabolite and Hormone Profiles Provide a Rationale for Choosing Between Bariatric Procedures?. *Obes Surg*. 2021;31(5):2174-2179. doi:10.1007/s11695-021-05246-8
 13. Cagiltay E, Celik A, Dixon JB, et al. Effects of different metabolic states and surgical models on glucose metabolism and secretion of ileal L-cell peptides: results from the HIPER-1 study. *Diabet Med*. 2020;37(4):697-704. doi:10.1111/dme.14191
 14. Vigneri P, Frasca F, Sciacca L, Pandini G, Vigneri R. Diabetes and cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2009;16(4):1103-1123. doi:10.1677/ERC-09-0087
 15. Cummings DE, Rubino F. Metabolic surgery for the treatment of type 2 diabetes in obese individuals. *Diabetologia*. 2018;61(2):257-264. doi:10.1007/s00125-017-4513-y
 16. Santo MA, Pajceki D, Riccioppo D, Cleva R, Kawamoto F, Cecconello I. Early complications in bariatric surgery: incidence, diagnosis and treatment. *Arq Gastroenterol*. 2013;50(1):50-55. doi:10.1590/s0004-28032013000100010
 17. Buchwald H, Estok R, Fahrbach K, et al. Weight and type 2 diabetes after bariatric surgery: systematic review and meta-analysis. *Am J Med*. 2009;122(3):248-256.e5. doi:10.1016/j.amjmed.2008.09.041
 18. Badman MK, Flier JS. The gut and energy balance: visceral allies in the obesity wars. *Science*. 2005;307(5717):1909-1914. doi:10.1126/science.1109951
 19. Geloneze B, Pareja JC. Cirurgia bariátrica cura a síndrome metabólica? [Does bariatric surgery cure the metabolic syndrome?]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2006;50(2):400-407. doi:10.1590/s0004-27302006000200026
 20. Rubino F, Forgione A, Cummings DE, et al. The mechanism of diabetes control after gastrointestinal bypass surgery reveals a role of the proximal small intestine in the pathophysiology of type 2 diabetes. *Ann Surg*. 2006;244(5):741-749. doi:10.1097/01.sla.0000224726.61448.1b
 21. Still CD, Wood GC, Benotti P, et al. Preoperative prediction of type 2 diabetes remission after Roux-en-Y gastric bypass surgery: a retrospective cohort study. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2014;2(1):38-45. doi:10.1016/S2213-

8587(13)70070-6

22. de Cleva R, Kawamoto F, Borges G, Caproni P, Cassenote AJF, Santo MA. C-peptide level as predictor of type 2 diabetes remission and body composition changes in non-diabetic and diabetic patients after Roux-en-Y gastric bypass. *Clinics (Sao Paulo)*. 2021;76:e2906. Published 2021 Aug 4. doi:10.6061/clinics/2021/e2906
23. Dirksen C, Jørgensen NB, Bojsen-Møller KN, et al. Mechanisms of improved glycaemic control after Roux-en-Y gastric bypass. *Diabetologia*. 2012;55(7):1890-1901. doi:10.1007/s00125-012-2556-7
24. Loid P, Mustila T, Mäkitie RE, et al. Rare Variants in Genes Linked to Appetite Control and Hypothalamic Development in Early-Onset Severe Obesity. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020; 11:81. Published 2020 Feb 21. doi:10.3389/fendo.2020.00081
25. Guedes TP, Martins S, Costa M, et al. Detailed characterization of incretin cell distribution along the human small intestine. *Surg Obes Relat Dis*. 2015;11(6):1323-1331. doi:10.1016/j.soard.2015.02.011
26. van Baar ACG, Prodan A, Wahlgren CD, et al. Duodenal L cell density correlates with features of metabolic syndrome and plasma metabolites. *Endocr Connect*. 2018;7(5):673-680. doi:10.1530/EC-18-0094
27. Jorsal T, Rhee NA, Pedersen J, et al. Enteroendocrine K and L cells in healthy and type 2 diabetic individuals. *Diabetologia*. 2018;61(2):284-294. doi:10.1007/s00125-017-4450-9
28. Kuhre RE, Deacon CF, Holst JJ, Petersen N. What Is an L-Cell and How Do We Study the Secretory Mechanisms of the L-Cell?. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021; 12:694284. Published 2021 Jun 8. doi:10.3389/fendo.2021.694284
29. Brubaker PL. Minireview: update on incretin biology: focus on glucagon-like peptide-1. *Endocrinology*. 2010;151(5):1984-1989. doi:10.1210/en.2010-0115
30. Drucker DJ, Nauck MA. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet*. 2006;368(9548):1696-1705. doi:10.1016/S0140-6736(06)69705-5
31. Cazzo E, Gestic MA, Utrini MP, et al. Correlation between pre and postoperative levels of glp-1/glp-2 and weight loss after roux-en-y gastric bypass: a prospective study. *Arq Bras Cir Dig*. 2016;29(4):257-259. doi:10.1590/0102-6720201600040010

32. Palha AM, Pereira SS, Costa MM, et al. Differential GIP/GLP-1 intestinal cell distribution in diabetics' yields distinctive rearrangements depending on Roux-en-Y biliopancreatic limb length. *J Cell Biochem.* 2018;119(9):7506-7514. doi:10.1002/jcb.27062
33. Miras AD, Kamocka A, Pérez-Pevida B, et al. The Effect of Standard Versus Longer Intestinal Bypass on GLP-1 Regulation and Glucose Metabolism in Patients With Type 2 Diabetes Undergoing Roux-en-Y Gastric Bypass: The Long-Limb Study. *Diabetes Care.* 2021;44(5):1082-1090. doi:10.2337/dc20-0762
34. Estabile PC, Santo MA, Moura EGH, et al. Small intestinal l cell density in patients with severe obesity after roux-en-y gastric bypass. *Arq Bras Cir Dig.* 2022;35:e1681. Published 2022 Oct 3. doi:10.1590/0102-672020220002e1681
35. Santo MA, Pajewski D, Riccioppo D, Cleva R, Ceconello I. Indicações e resultados da cirurgia bariátrica em adultos. In: Waitzberg DL. *Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica.* 5.ed. Rio de Janeiro: Atheneu; 2017. p.655-61.
36. Schauer PR, Kashyap SR, Wolski K, et al. Bariatric surgery versus intensive medical therapy in obese patients with diabetes. *N Engl J Med.* 2012;366(17):1567-1576. doi:10.1056/NEJMoa1200225
37. Buchwald H, Avidor Y, Braunwald E, et al. Bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis [published correction appears in JAMA. 2005 Apr 13;293(14):1728]. *JAMA.* 2004;292(14):1724-1737. doi:10.1001/jama.292.14.1724
38. Roberts RE, Glicksman C, Alagband-Zadeh J, Sherwood RA, Akuji N, le Roux CW. The relationship between postprandial bile acid concentration, GLP-1, PYY and ghrelin. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2011;74(1):67-72. doi:10.1111/j.1365-2265.2010.03886.
39. Lee WJ, Hur KY, Lakadawala M, et al. Predicting success of metabolic surgery: age, body mass index, C-peptide, and duration score. *Surg Obes Relat Dis.* 2013;9(3):379-384. doi:10.1016/j.soard.2012.07.015
40. Manual Cirurgia Bariátrica. Luiz Alberto De Carli. Apoio Sociedade Brasileira de Cirurgia Bariátrica e Metabólica. Congresso 2021. 23. Zeve, J.L.M.; Novais, P.O.; Júnior, N.O. Técnicas em cirurgia bariátrica: uma revisão da literatura. *Revista Ciência & Saúde,* 2012; 5 (2): 132-140.
41. Abdulrazzaq S, Elhag W, El Ansari W, Mohammad AS, Sargsyan D, Bashah M. Is Revisional Gastric Bypass as Effective as Primary Gastric Bypass for Weight Loss and Improvement of Comorbidities?. *Obes Surg.* 2020;30(4):1219-1229. doi:10.1007/s11695-019-04280-

42. EHLERS M.R.; HARLEY RE, MATHISEN, AL, SCHNEIDER R, KIPNIS, MS. Subcutaneous Infusion of GLP-1 for 7 Days Improves Glycemic Control Over a Broad Dose Range in Patients with Type 2 Diabetes. IFD, 19th Annual Diabetes Conference Cape Town, South Africa, 2006.
43. Lam NT, Kieffer TJ. The multifaceted potential of glucagon-like peptide-1 as a therapeutic agent. *Minerva Endocrinol.* 2002;27(2):79-93.
44. Meier JJ, Gallwitz B, Salmen S, et al. Normalization of glucose concentrations and deceleration of gastric emptying after solid meals during intravenous glucagon-like peptide 1 in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(6):2719-2725. doi:10.1210/jc.2003-030049
45. Kreymann B, Williams G, Ghatei MA, Bloom SR. Glucagon-like peptide-1 7-36: a physiological incretin in man. *Lancet.* 1987;2(8571):1300-1304. doi:10.1016/s0140-6736(87)91194-9
46. Farilla L, Bulotta A, Hirshberg B, et al. Glucagon-like peptide 1 inhibits cell apoptosis and improves glucose responsiveness of freshly isolated human islets. *Endocrinology.* 2003;144(12):5149-5158. doi:10.1210/en.2003-0323
47. Ballantyne GH, Belsley S, Stephens D, et al. Bariatric surgery: low mortality at a high-volume center. *Obes Surg.* 2008;18(6):660-667. doi:10.1007/s11695-007-9357-y
48. Batterham RL, Cohen MA, Ellis SM, et al. Inhibition of food intake in obese subjects by peptide YY3-36. *N Engl J Med.* 2003;349(10):941-948. doi:10.1056/NEJMoa030204
49. Kastin AJ, Pan W, Akerstrom V, Hackler L, Wang C, Kotz CM. Novel peptide-peptide cooperation may transform feeding behavior. *Peptides.* 2002;23(12):2189-2196. doi:10.1016/s0196-9781(02)00247-4
50. Nauck MA, Kleine N, Orskov C, Holst JJ, Willms B, Creutzfeldt W. Normalization of fasting hyperglycaemia by exogenous glucagon-like peptide 1 (7-36 amide) in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia.* 1993;36(8):741-744. doi:10.1007/BF00401145
51. Taylor CR, Levenson RM. Quantification of immunohistochemistry--issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment II. *Histopathology.* 2006;49(4):411-424. doi:10.1111/j.1365-2559.2006.02513.x
52. Degen L, Oesch S, Casanova M, et al. Effect of peptide YY3-36 on food intake in humans. *Gastroenterology.* 2005;129(5):1430-1436. doi:10.1053/j.gastro.2005.09.001
53. 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):916-919. doi:10.1136/gut.38.6.916

54. Portela-Gomes GM, Stridsberg M. Chromogranin A in the human gastrointestinal tract: an immunocytochemical study with region-specific antibodies. *J Histochem Cytochem.* 2002;50(11):1487-1492. doi:10.1177/002215540205001108
55. Kim BJ, Carlson OD, Jang HJ, Elahi D, Berry C, Egan JM. Peptide YY is secreted after oral glucose administration in a gender-specific manner. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(12):6665-6671. doi:10.1210/jc.2005-0409
56. Mok JKW, Makaronidis JM, Batterham RL. The role of gut hormones in obesity. *Rev Endocrine and Metabolic Research* 2019,4:4-13. doi.org/10.1016/j.coemr.2018.09.00
57. Østergaard S, Paulsson JF, Kjaergaard Gerstenberg M, Wulff BS. The Design of a GLP-1/PYY Dual Acting Agonist. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2021;60(15):8268-8275. doi:10.1002/anie.202016464
58. Parker HE, Wallis K, le Roux CW, Wong KY, Reimann F, Gribble FM. Molecular mechanisms underlying bile acid-stimulated glucagon-like peptide-1 secretion. *Br J Pharmacol.* 2012;165(2):414-423. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01561.
59. Greiner TU, Bäckhed F. Microbial regulation of GLP-1 and L-cell biology. *Mol Metab.* 2016;5(9):753-758. Published 2016 May 28. doi:10.1016/j.molmet.2016.05.012
60. Everard A, Cani PD. Gut microbiota and GLP-1. *Rev Endocr Metab Disord.* 2014;15(3):189-196. doi:10.1007/s11154-014-9288-6
61. Dang JT, Mocanu V, Park H, et al. Ileal microbial shifts after Roux-en-Y gastric bypass orchestrate changes in glucose metabolism through modulation of bile acids and L-cell adaptation. *Sci Rep.* 2021;11(1):23813. Published 2021 Dec 10. doi:10.1038/s41598-021-03396-4
62. Wardle J, Carnell S, Haworth CM, Plomin R. Evidence for a strong genetic influence on childhood adiposity despite the force of the obesogenic environment. *Am J Clin Nutr.* 2008;87(2):398-404. doi:10.1093/ajcn/87.2.398
63. Bell GI. The glucagon superfamily: precursor structure and gene organization. *Peptides.* 1986;7 Suppl 1:27-36. doi:10.1016/0196-9781(86)90160-9
64. Vilsbøll T, Holst JJ. Incretins, insulin secretion and Type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia.* 2004;47(3):357-366. doi:10.1007/s00125-004-1342-6
65. Nauck MA. Glucagon-like peptide 1 (GLP-1): a potent gut hormone with a possible therapeutic perspective. *Acta Diabetol.* 1998;35(3):117-129. doi:10.1007/s005920050116
66. Drucker DJ, Philippe J, Mojsov S, Chick WL, Habener JF. Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet

- cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(10):3434-3438. doi:10.1073/pnas.84.10.3434
67. Murphy KG, Bloom SR. Gut hormones and the regulation of energy homeostasis. *Nature*. 2006;444(7121):854-859. doi:10.1038/nature05484
68. Nergaard BJ, Leifsson BG, Hedenbro J, Gislason H. Gastric bypass with long alimentary limb or long pancreato-biliary limb--long-term results on weight loss, resolution of co-morbidities and metabolic parameters. *Obes Surg*. 2014;24(10):1595-1602. doi:10.1007/s11695-014-1245-7
69. Mingrone G, Nolfo G, Gissey GC, et al. Circadian rhythms of GIP and GLP1 in glucose-tolerant and in type 2 diabetic patients after biliopancreatic diversion. *Diabetologia*. 2009;52(5):873-881. doi:10.1007/s00125-009-1288-9
70. Rubino F, Schauer PR, Kaplan LM, Cummings DE. Metabolic surgery to treat type 2 diabetes: clinical outcomes and mechanisms of action. *Annu Rev Med*. 2010;61:393-411. doi:10.1146/annurev.med.051308.105148
71. Gautier JF, Fetita S, Sobngwi E, Salaün-Martin C. Biological actions of the incretins GIP and GLP-1 and therapeutic perspectives in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Metab*. 2005;31(3 Pt 1):233-242. doi:10.1016/s1262-3636(07)70190-8
72. Kaska L, Kobiela J, Proczko M, Stefaniak T, Sledziński Z. Does the length of the biliary limb influence medium-term laboratory remission of type 2 diabetes mellitus after Roux-en-Y gastric bypass in morbidly obese patients?. *Wideochir Inne Tech Maloinwazyjne*. 2014;9(1):31-39. doi:10.5114/wiitm.2014.40383
73. Pinheiro JS, Schiavon CA, Pereira PB, Correa JL, Noujaim P, Cohen R. Long-long limb Roux-en-Y gastric bypass is more efficacious in treatment of type 2 diabetes and lipid disorders in super-obese patients. *Surg Obes Relat Dis*. 2008;4(4):521-527. doi:10.1016/j.soard.2007.12.016
74. Estabile PC, Almeida MC, Campagnoli EB, et al. Immunohistochemical detection of I cells in gastrointestinal tract mucosa of patients after surgical treatment for control of type 2 diabetes mellitus. *Arq Bras Cir Dig*. 2022;35:e1651. Published 2022 Jun 17. doi:10.1590/0102-672020210002e1651
75. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262
76. van Baar ACG, Prodan A, Wahlgren CD, et al. Duodenal L cell density correlates with features of metabolic syndrome and plasma metabolites. *Endocr Connect*. 2018;7(5):673-680. doi:10.1530/EC-18-0094
77. Xie C, Jones KL, Rayner CK, Wu T. Enteroendocrine Hormone Secretion and Metabolic Control: Importance of the Region of the Gut

- Stimulation. *Pharmaceutics*. 2020;12(9):790. Published 2020 Aug 21. doi:10.3390/pharmaceutics12090790
78. Jarak I, Pereira SS, Carvalho RA, et al. Gastric Bypass with Different Biliopancreatic Limb Lengths Results in Similar Post-absorptive Metabolomics Profiles. *Obes Surg*. 2020;30(3):1068-1078. doi:10.1007/s11695-019-04294-5
79. R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>
80. Brunner, E., Domhof, S., and Langer, F. (2002). Nonparametric Analysis of Longitudinal Data in Factorial Experiments, Wiley, New York.
81. Tacchino RM. Bowel length: measurement, predictors, and impact on bariatric and metabolic surgery. *Surg Obes Relat Dis*. 2015;11(2):328-334. doi:10.1016/j.soard.2014.09.016
82. Abellan I, Luján J, Frutos MD, et al. The influence of the percentage of the common limb in weight loss and nutritional alterations after laparoscopic gastric bypass. *Surg Obes Relat Dis*. 2014;10(5):829-833. doi:10.1016/j.soard.2014.06.009