UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA

(Associação Ampla entre a UNICENTRO e a UEPG)

Avaliação das incretinas GLP-1 e PYY em pacientes com Diabetes Mellitus 2 submetidos a Duodenal Swicth Parcial

PRISCILA COSTA ESTABILE

Ponta Grossa

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA

(Associação Ampla entre a UNICENTRO e a UEPG)

Avaliação das incretinas GLP-1 e PYY em pacientes com Diabetes Mellitus 2 submetidos a Duodenal Swicth Parcial

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa em associação com a Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Biologia Evolutiva)

Ponta Grossa

2012

Orientador

Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni

Co-orientador

Prof. Dr. Eduardo Bauml Campagnoli

Ficha catalográfica Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG.

Estabile, Priscila Costa
E79a Avaliação das incretinas GLP-1 e PYY em pacientes com Diabetes Mellitus 2 submetidos a Duodenal Swicth Parcial / Priscila Costa Estabile. Ponta Grossa, 2012.
81 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – área de concentração Biologia Evolutiva), Universidade Estadual de Ponta Grossa e Universidade Estadual do Centro - Oeste.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni
Co-orientador : Prof. Dr. Eduardo Bauml Campagnoli

1. Diabetes tipo 2. 2. Cirurgia bariátrica. 3. Células L. 4. GLP-1. 5. PYY 3-36. I. Artoni, Roberto Ferreira. II. Campagnoli, Eduardo Bauml. III. T.

CDD: 571

UEPG

Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva

Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa (Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética) e a Universidade Estadual do Centro Oeste (Departamento de Ciências Biológicas)

UNICENTRO pública e gratuita

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº. 09/2012

Ata referente à Defesa de Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, uma Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa e a Universidade Estadual do Centro-Oeste, pela candidata **PRISCILA COSTA ESTABILE**.

Aos treze do mês de fevereiro de dois mil e doze, no Auditório do Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa sob a presidência do Dr. Roberto Ferreira Artoni, em sessão pública, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do (a) aluno (a) **PRISCILA COSTA ESTABILE,** do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-área de concentração Biologia Evolutiva, visando o título de Mestre, constituída pelos: Dr. Roberto Ferreira Artoni (Orientador), Eduardo Bauml Campagnoli (Co-orientador) Dr. Fábio Quirillo Milléo e Dr. Giovani Marino Favero. Atestada pela colenda Congregação do Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva. Iniciados os trabalhos a presidência deu conhecimento aos membros da Comissão e ao (a) candidato(a) das normas que regem a defesa de dissertação. A seguir o candidato passou a defesa de sua dissertação intitulada: **"Avaliação das incretinas GLP-1 e PYY_{3-36} em pacientes com DM2 submetidos à Duodenal Swicth Parcial"**. Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou o (a) candidato (a) **APROVADA**. A Presidência ressalvou que a obtenção do título de Mestre está condicionada ao disposto da atual aprovação de outorga do Título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração em Biologia Evolutiva, <u>com validade de trinta dias</u>; o não depósito da versão definitiva de Dissertação, bem como as cópias em CD(PDF) com todas as correções feitas e atestadas pelo (a) orientador(a) neste prazo anulará toda possibilidade de outorga definitiva do Título, recebimento de Certidão e outros documentos, bem como a solicitação do Diploma. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Observação (se necessário)

Alteração de Título: sim ☒ **não** ☐

Novo título: Avaliação das incretinas GLP-1 e PYY_{3-36} em pacientes com Diabetes Mellitus tipo 2 submetidos à Duodenal Swicth Parcial

Ponta Grossa, 13 de fevereiro de dois mil e doze.

Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni

Prof. Dr. Eduardo Bauml Campagnoli

Drª Fábio Quirillo Milléo

Prof. Dr. Giovani Marino Favero

Dedico este trabalho à minha família, pelo amor e incentivo a cada desafio, e intensa dedicação ao decorrer do curso.

“A gente pode morar numa casa mais ou menos, numa rua mais ou menos, numa cidade mais ou menos, e até ter um governo mais ou menos. A gente pode dormir numa cama mais ou menos, comer um feijão mais ou menos, ter um transporte mais ou menos, e até ser obrigado a acreditar mais ou menos no futuro. A gente pode olhar em volta e sentir que tudo está mais ou menos... TUDO BEM! O que a gente não pode mesmo, nunca, de jeito nenhum... É amar mais ou menos, sonhar mais ou menos, ser amigo mais ou menos, namorar mais ou menos, ter fé mais ou menos, e acreditar mais ou menos. Senão a gente corre o risco de se tornar uma pessoa mais ou menos.”

Francisco Cândido Xavier

“Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais inteligente, mas o que melhor se adapta às mudanças.”

Charles Darwin

Agradecimentos

Agradeço a Deus por me conduzir a este caminho onde aprendi a ser mais paciente, simples, compreensiva, me tornando uma pessoa melhor.

Minha imensa gratidão a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho. Em particular a todos os pacientes diabéticos que se disponibilizaram em participar do grupo de estudo tornando possível este projeto.

Aos meus queridos pais, Silvio Antônio Estabile e Mª do Socorro Costa Estabile, por confiarem em mim depositando grande apoio e incentivo. Pelo amor incondicional e esforço em compreender as minhas escolhas, por estarem sempre dispostos a ouvir às minhas angústias e pelo imenso apoio em toda essa caminhada do mestrado.

Aos meus amados irmãos, Daniele Costa Estabile e Silvio Antônio Estabile Júnior, que apesar dos pouco tempo juntos sempre se fazem presente pelo carinho e belos momentos juntos. Ao meu querido primo, Mário Francisco Saldanha Neto, pela paciência e carinho, ao ouvir minhas aflições e me fazer sorrir sempre, mesmo estando distante, em Curitiba.

Ao meu orientador, Dr. Roberto Ferreira Artoni, pela oportunidade em desenvolver o mestrado, pela compreensão com os contratempos e seu esforço e disponibilidade em auxiliar em todos os aspectos deste trabalho. Por me receber de braços abertos e pela grande contribuição no meu aprimoramento como profissional.

Ao Dr. Eduardo Bauml Campagnoli, meu co-orientador, obrigada por compartilhar de sua experiência auxiliando na parte prática e no desenvolvimento de toda dissertação.

Ao Dr. Fábio Quirillo Milléo e ao Dr. Marcos Ricardo da Silva Rodrigues, por auxiliar na escolha dos pacientes para o estudo e pela contribuição na realização da técnica cirúrgica.

Aos amigos e colegas de laboratório Leonardo Gusso Goll e Jonathan Castro, pelo apoio fundamental no laboratório, pelas discussões da parte teórica e companhia nos momentos de descontração.

À Fernanda Mª Cordeiro que se fez presente nestes dois anos e em todos os momentos. Muito obrigada pelo apoio, pelas conversas, pela cumplicidade, pela companhia agradável nos necessários momentos de descontração. Sua amizade e incentivo foram essenciais para atravessar essa fase.

Às amigas Bruna Mariana Tartari, Isabel Pimenta, Juliana Bellafronte, Lívia Blumenschein, Magda Kiyoko e Thaísa Palozi, que conheci na minha primeira moradia no Pensionato Rainha da Paz, onde juntas passamos por bons e maus pedaços, mas sempre juntas como uma família.

À Zoli Oliveira, pelas conversas que tiraram dúvidas e ajudaram a solucionar problemas burocráticos.

À todos os colegas do mestrado: Dayane Molin, Fernanda Cordeiro, Jonathan Castro, Kátia Alonso, Leonardo Gusso Goll, Palloma que fizeram parte do crescimento pessoal e profissional desta fase. E agradeço especialmente a colega e amiga Kátia Alonso, por ser sempre solícita e parceira, obrigada pela amizade, pela força e companhia nos momentos e disciplinas difíceis.

À todo o pessoal do laboratório de Citogenética e Evolução da UEPG, especialmente aos alunos Alain de Barros, Barbara de Melo, Daniele Tasior, Jonathan Castro, Kamila Oliveira Rosa, Leonardo Gusso Goll, Marcela Puci Baer, Michele Orane, Paulo Svidnicki, Diana Cordeiro, Thais Saad Sczepanski,

Tajiana Costa e ao técnico de laboratório Miguel de Carvalho, grande amigo e por está sempre de prontidão. E aos professores (as) doutores (as) Mara Cristina de Almeida, Marcelo Vicari, Roberto Ferreira Artoni e Viviane Nogaroto Vicari.

À todos os professores do programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da UEPG que contribuíram compartilhando de seu conhecimento para minha formação no mestrado.

Aos professores Dr. Egberto Gaspar de Moura e a Drª Patrícia Cristina Lisbôa da Silva do Programa de Pós Graduação FISCLINEX da UERJ, por contribuírem compartilhando seu conhecimento e tempo, no desenvolvimento ensaios que muito enriqueceram este trabalho. As pesquisadoras e amigas do laboratório do Programa de Pós Graduação FISCLINEX da UERJ, pela troca de conhecimentos e por ter sido muito bem recebida durante minha estada na UERJ.

À Capes e a Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

Resumo

Avaliação das incretinas GLP-1 e PYY em pacientes com Diabetes Mellitus 2 submetidos a Duodenal Swicth Parcial

Diabetes mellitus do tipo 2 (DM2), assim como a Síndrome Metabólica (SM), é uma desordem metabólica e multifatorial que atualmente se apresenta como pandemia mundial com reflexos na morbimortalidade, possivelmente em decorrência do descompasso entre a evolução biológica e cultural do homem. Foi objeto de investigação do presente estudo analisar a expressão tecidual dos hormônios incretínicos *Glucagon Like Pepitide-1* (GLP1) e *Pepitide YY* (PYY_{3-36}), visando identificar e quantificar células L ao longo do trato gastrointestinal, de pacientes portadores de DM2 submetidos a gastroenteromentectomia adaptativa com bipartição intestinal (Duodenal Switch Parcial - DSP). O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética da UEPG e os pacientes informados e esclarecidos sobre os objetivos da pesquisa. O grupo de voluntários foi composto de 7 pacientes com idade entre 35 e 65 anos, Índice de Massa Corporal > 25 Kg/m^2, com DM2 em tratamento dietético e medicamentoso por um período mínimo de 2 anos e com dificuldade de controle glicêmico e hipertrigliceridemia associada. Foram obtidas amostras da mucosa intestinal (jejuno e íleo) dos pacientes submetidos à DSP no pré-operatório e no pós-operatório em condição de jejum de 12 horas (três e doze meses, respectivamente), através de biópsia incisional. Estas biópsias foram destinadas aos ensaios de Imunohistoquímica, qRT-PCR *(Quantitative Real Time PCR*) e *Western Blott*. Os resultados obtidos foram congruentes e apontam uma expressão diferencial pouco significativa entre o estado de pré- e pós-operatório para os ensaios de qRT-PCR (p=0,1669) e *Western Blott* (p=0,1569). A imunohistoquímica mostrou também baixa significância (p=0,0043) de células L imuno marcadas para os mesmos pacientes, nas mesmas condições. Estes dados podem ser interpretados a luz do jejum imposto aos pacientes. Além dos resultados serem inéditos para a imunomarcação de células L do trato gastrointestinal humano, os dados obtidos indicam que estas células apresentam secreção basal para GLP-1, mesmo após 12 horas sem estímulo alimentar. Em adição, os pacientes apresentaram normalização dos níveis de glicemia no estado pós-operado, sugerindo melhora metabólica. Foi ainda constatado que o número de células L marcadas aumenta em densidade ao longo do trato gastrointestinal em direção à porção mais distal do íleo (p=0,0409). Com estes resultados foi possível identificar, localizar e investigar diferentes níveis de expressão e secreção das células L intestinais em pacientes portadores de DM2 e submetidos a controle cirúrgico.

Palavras-chave: Diabetes tipo 2, cirurgia bariátrica, células L; GLP-1; $PYY_{3-36.}$

Abstract

Evaluation of the incretin GLP-1 and PYY in patiens with Diabetes Mellitus 2 undergoing Partial Duodenal Swicth

The Type 2 Diabetes Mellitus, as well as the metabolic syndrome (MS), is a multifactorial and metabolic disorder that now presents itself as a worldwide pandemic with effects on morbidity and mortality, possibly as a result of the mismatch between biological and cultural evolution of man. Was the object of research of this study to analyze the tissue expression of incretin hormones glucagon Pepitide Like-1 (GLP1) and Pepitide YY (PYY3-36), to identify and quantify L cells along the gastrointestinal tract in patients with DM2 subjected to adaptative gastroenteromentectomia with intestinal bipartition (Partial Duodenal Switch - DSP). The study was approved by the Ethics Committee of UEPG and patients informed and educated about the research objectives. The volunteer group consisted of 7 patients aged between 35 and 65 years, body mass index> 25 kg/m2 with T2DM on dietary treatment and medication for a minimum of 2 years and with difficulty on glycemic control and hypertriglyceridemia associated. Samples were obtained from the intestinal mucosa (jejunum and ileum) of DSP in patients undergoing preoperative and postoperative condition of fasting for 12 hours (three and twelve months respectively), through incisional biopsy. These biopsies were designed to test immunohistochemistry, qRT-PCR (Quantitative Real Time PCR) and Western Blott. The results were consistent and indicate a very significant differential expression between the state of pre- and postoperative tests for qRT-PCR ($p = 0.1669$) and Western Blot ($p = 0.1569$). Immunohistochemistry also showed low significance ($p = 0.0043$) of immune marked L cells for the same patients under the same conditions. These data can be interpreted in light of the fast imposed on patients. In addition the results are unprecedented for the immunostaining of L-cells of the human gastrointestinal tract, the data indicate that these cells have basal secretion for GLP-1, even after 12 hours without feed stimulation. In addition, the patients showed normalization of blood glucose levels in the post-surgery, suggesting metabolic improvement. It was also found that the number of L cells marked increases in density along the gastrointestinal tract toward the distal portion of the ileum ($p = 0.0409$). With these results it was possible to identify, locate and investigate different levels of expression and secretion from intestinal L cells in patients with DM2 and subjected to surgical control.

Key-words: Type 2 diabetes, bariatric surgery, cells L; GLP-1; PYY_{3-36}.

Lista de figuras

Figura 1 - Resposta pós prandial da incretínica do GLP-1 e sua ação neuroendócrina restabelecendo o equilíbrio metabolismo humano. Adaptado de Ehlers (2006).....22

Figura 2-- Esquema de células L liberando GLP-1 para o pâncreas por meio de estímulo após ingesta alimentar, onde o GLP-1 liberado é sinliza para células β que por sua vez liberam mais insulina e diminuem liberação de glucagon,mantendo assim o controle glicêmico no sangue. Adaptado de Ehlers (2006).....24

Figura 3 - **P**rimeiro esboço do trato gastrointestinal e porções: 1. omento, 2.estômago, 3. íleo distal, 4 intestino grosso, 5.fígado, 6.visícula biliar. Segundo esboço refere-se a gastrectomia e a omentectomia. E o terceiro esboço Duodenal Swicth Parcial**.** 29

Figuras do Capítulo I

Figura 1A - Imuno marcação obtida com a utilização de anticorpo policlonal para PYY_{3-36} (setas), indicando possível presença de células L no epitélio do trato gastrointestinal. Observa-se ausência de células L imuno marcadas e um beckgraund nas regiões do fundo gástrico (imagem 1) e piloro (imagem 2). Poucas células imuno marcadas na região do jejuno (imagem 3) e íleo proximal (imagem 4). Já na porções mais distais do íleo (imagens 5 e 6), observa-se maior frequência de células L em atividade imuno marcadas. 55

Figura 1B – Imuno marcação obtida com a utilização de anticorpo monoclonal para GLP-1 (setas), indicando possível presença de células L no epitélio do trato gastrointestinal. Observa-se ausência de células L imuno marcadas na região do fundo gástrico (imagem 1) e piloro (imagem 2). Poucas células imuno marcadas na região do jejuno (imagem 3) e íleo proximal (imagem 4). Já na porções mais distais do íleo (imagens 5 e 6), observa-se maior frequência de células L em atividade imuno marcadas**.** 56

Figura 2 – Média dos valores de ∆Ct referentes à expressão relativa de GLP1 nas condições pré e pós. As bandas sobre as colunas indicam a expressão gênica verificada por western blot 57

Figura 3 – Imuno marcação obtida com a utilização de anticorpo monoclonal para GLP-1 (setas), sugerindo a presença de células L no epitélio intestinal (íleo distal) . Notar o maior número de células imuno marcadas, por campo analisado, na condição pós operatória (imagens 2 e 4) quando comparado com a condição pré operatória (imagens 1 e 3) 58

Figura 4 – Média dos valores de ∆Ct referentes à expressão relativa de PYY3-36 nas condições pré e pós. As bandas sobre as colunas indicam a expressão gênica verificada por western blot ... 59

Figura 5 – Imuno marcação obtida com a utilização de anticorpo policlonal para PYY_{3-36} (setas), sugerindo a presença de células L no epitélio intestinal (íleo distal) . Notar o maior número de células imuno marcadas, por campo analisado, na condição pós operatória (imagens 2 e 4) quando comparado com a condição pré operatória (imagens 1 e 3). 60

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Relação dos anticorpos utilizados, indicando o clone, marca a concentração e o método de recuperação antigênica.....37

Tabelas do Capítulo I

Tabela 1 – Relação dos anticorpos utilizados, indicando o clone, marca a concentração e o método de recuperação antigênica 48

Tabela 2 – Número total de células L imuno marcadas por campo pelo anticorpo GLP-1 e PYY nas porções do Trato Gastrointestinal(TGI) amostras transoperatório.....54

Tabela 3 – Número total de células L imuno marcadas por campo pelo anticorpo GLP-1 em nas condições Pré (íleo trans) e Pós(íleo) operatório..... 57

Tabela 4 – Número total de células L imuno marcadas por campo pelo anticorpo PYY_{3-36} em nas condições Pré (íleo trans) e Pós(íleo) operatório..... 59

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO GERAL..... ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**13**

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....**15**

2.1–DIABETES MELLITUS TIPO 2 E SÍNDROME METABÓLICA.....**15**
2.2 – CLÍNICA E CONTROLE DA DIABETES......**18**
2.3 – GENÉTICA DA DIABETES MELLITUS TIPO 2 .....**20**
2.4 – GENES CANDIDATOS..... **.24**
2.4.1 – GLP-1 24
2.4.2 – PYY ..... .26
2.5 – BASES EVOLUTIVAS DA DUODENAL SWITCH PARCIAL ..... **.26**
2.6– CONCEITO DE IMUNOHISTOQUÍMICA ..... **.30**

3.1 – JUSTIFICATIVA..... **.3**2

3.2 –OBJETIVOS ..... **.3**4

4 – MATERIAL E MÉTODOS ..... **.36**

4.1 – AMOSTRAGEM **36**
4.2 – METODOLOGIAS..... **.36**
4.2.1 – Bases evolutivas da Duodenal Switch Parcial - DSP..... .36
4.2.2 – Imunihistoquímica..... .37
4.2.3 – RT-PCR..... 39
4.2 -Western Blot.....40
4.2.5 - Análise Estatística.....41

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... **42**

Capítulo I -- **Detecção de células L por imunohistoquímica em pacientes submetidos a tratamento cirúrgico para controle da DM2.**..... 43

CONCLUSÕES..... **62**

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **63**

6 - ANEXOS..... **70**

6.1 – PROTOCOLO DE SILANIZAÇÃO DE LÂMINAS **70**
6.2- SOLUÇÕES PARA ENSAIO DE IMUNOHISTOQUÍMICA..... **70**
6.3 – PROTOCOLO BÁSICO DE IMUNOHISTOQUÍMICA...... **71**
6.4-PROTOCOLO DE RT-PCR.....**74**
6.5-PROTOCOLO DE WESTERN BLOT.....**75**
6.6-TABELA DE DADOS CLÍNICOS DOS PACIENTES.....**77**
6.7 - PARECER 37/2010 (PROTOCOLO 07883/10) DA SUBCOMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO COM SERES HUMANOS DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA...... **.78**
6.8 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (T.C.L.E.) PARA OS PACIENTES SEGUNDO A COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO COM SERES HUMANOS DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA..... **79**

Introdução Geral

1 – Introdução

A Diabetes Mellitus (DM) é uma doença crônica que ocorre quando o pâncreas produz insulina insuficiente ou quando corpo não corresponde adequadamente a insulina produzida. Essa alteração na homeostase glicêmica desencadeia uma série de distúrbios, afetando metabolismo glicídico e lipídico (De Fronzo *et al .;* 1992). A espectativa mundial é de que a incidência da DM aumente, especialmente quando associada a Síndrome Metabólica (SM), atingindo o estatus de pandemia. É estimado um aumento na frequência da DM2 na população mundial de 2,8% (171 milhões de pessoas) para 4,4% (366 milhões), entre os anos de 2000 e 2030 (Wild *et al*., 2004). Em dezembro de 2010, foi publicado pelo Ministério da Saúde que a diabetes se apresenta como a terceira causa de morte no Brasil e quinta causa de internação hospitalar, apresentando um crescente de 10% na sua incidência entre 1996 e 2007 (Ministério da Saúde, 2010). Além da patologia em si, o controle da Diabetes é prioritário para diminuir custos com a saúde e doenças crônicas associadas, tais como: hipertensão, dislipedemia, insuficiência renal, retinopatia, e algumas neuropatias (Reaven *et al*., 1988; 1993). A diabetes pode ter sua origem em distintas causas, destacando os fatores genéticos e ambientais entre os de maior importância. Estudos do perfil da glicemia em famílias evidenciam padrões de herança relacionada a hiperglicemia e outros ainda reforçam o ganho de peso e sedentarismo como hábitos de vida determinantes para a resistência à insulina (Reaven *et al*., 1993).

A DM2 atinge a todas as populações nos diferentes grupos etárias, tornando-se mais provalvelmente e apresentando maiores impactos sobre pessoas de idade avançada (King *et al*., 1998).Estudos prospectivos apontam que em 2025 o número de casos de DM2 em países em desenvolvimento será maior na faixa etária entre 45-64 anos, em contraste com os países desenvolvidos, onde o aumento se concentrará na faixa etária acima dos 65 anos (King *et al*., 1998).

Embora os números brasileiros para a incidência da DM2 se aproximem dos observados em países desenvolvidos, os coeficientes populacionais para cidadãos acima dos 65 anos são 2 vezes maiores do que os da faixa imediatamente anterior. Nos EUA, as internações por DM como motivo principal em 2000 atingiram 33,9 e 55,7/10.000 habitantes nos intervalos de 45-64 e 65 anos ou mais, respectivamente (Hall *et al*., 2002).

Inúmeras doenças podem ser ainda associadas a DM2 como a depressão psicológica em decorrência da falta de controle metabólico (Anderson *et al*., 2001), aumentando o risco de complicações do controle glicêmico(Egede *et al*., 2002). A propensão ao aumento de complicações macro e microvasculares, além de outros fatores cardiovasculares como hipertensão, encontra-se ainda associada à diabetes complicações oftalmológicas e renais (Simpson *et al*., 2003).

Com base nas complicações atribuídas ao desenvolvimento da DM e gastos com a gestão dos pacientes desde seu diagnóstico, tratamento e manutenção destes, destaca-se que a DM causa um grande impacto também na economia de qualquer país (Simpson *et al*., 2003).

A bem de todo o esforço em pesquisa e clínica para o controle da DM, destaca-se que muito desta patologia pode ser atribuída, no nível populacional, ao descompasso evolutivo na adaptação biológica do homem frente à alimentação atual que, muito rapidamente tem mudado, na oferta de alimentos menos fibrosos e altamente energéticos (Santoro *et al*., 2008), especialmente em relação a Diabetes tipo 2 (DM2).

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Diabetes Mellitus tipo 2 e Síndrome Metabólica

Embora existam relatos de antes de Cristo para sintomas que podem ser atribuídos a manifestação clínica da Diabetes, esta disfunção metabólica só ganhou melhor explicação com o isolamento e descrição do efeito hiperglicêmico da insulina por Banting e Charles Best em 1921 (Patlak, 2002).

Atualmente são utilizados valores de glicose plasmática de jejum, após sobre carga de glicose em 2 horas e medida casual para diagnosticar a ocorrência de DM. Os valores de referência indicam normalidade para aqueles pacientes que apresentam valores de glicose menores que 126mg/dl em jejum, e menores que 200mg/dl quando não em jejum (Who/Idf, 2006) e ainda ausência de outros achados clínicos como aumento do volume urinário, aumento de ingesta de líquidos, perda de peso rápida, náusea, vômito, fadiga e cicatrização difícil (Jorge *et al*., 2002).

A (DM) é uma doença em que existe uma dificuldade em manter a homeostase glicêmica sanguínea, podendo levar a uma hiperglicemia recorrente ou persistente. Têm como origem causas diversas, assim como fatores genéticos e ambientais. (Who, 2009).

A Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1), se caracteriza por sintomas agudos com elevado nível de glicose no sangue. É uma manifestação da DM, sendo uma doença autoimune que se caracteriza pela destruição das células β pancreáticas, secretoras de insulina, de modo a deixar o paciente dependente de insulina exógena para sobreviver. Já a DM2 pode ser caracterizada pela resistência a insulina ou mesmo pela sua baixa produção ao nível das células β (Anand *et al*., 2003), em decorrência disso geralmente é diagnosticada somente após o aparecimento de complicações associadas. A diabetes gestacional é outra forma de manifestação da DM, definida como um estado de intolerância à glicose durante a gravidez que geralmente desaparece após o parto, mas tem implicações importantes para risco subsequente de DM2, visto que a gravidez pode ser considerada um ambiente "estressante" que revela uma predisposição genética (Permutt *et al.*, 2005).

Pois a gestação é um estado de hiperfunção pancreática, caracterizado por aumento da resistência periférica à insulina, parcialmente explicada pela presença dos hormônios diabetogênicos, entre eles: progesterona, cortisol, prolactina e lactogênio placentário. Nesse período os níveis glicêmicos de jejum tendem a ser mais baixos e os valores pós-prandiais são elevados, havendo necessidade de maior produção/liberação de insulina (Gabbe e Graves , 2003 ; Ada ,2004).

Uma forma rara de DM é a *Maturity-Onset Diabetes of the Young* (MODY), um defeito primário na secreção da insulina associada à disfunção nas células β pancreáticas. Caracteriza-se por apresentar herança monogenética autossômica dominante para diferentes tipos de mutações gene-

específicas, as quais apresentam distintas subclassificações de acordo com o gene envolvido (Velho *et al*.,1998).

A obesidade vem sendo encarada como uma pandemia na atualidade, esta talvez seja uma das principais componentes da Síndrome Metabólica (SM). A SM é um grupo de distúrbios que inclui obesidade, resistência à insulina, dislipidemia e hipertensão arterial, que vem ganhando importância devido à sua associação com o desenvolvimento subsequente de doença cardiovascular e DM 2 (Karelis *et al*, 2004). Estimativas da Organização Mundial de Saúde projetam para 2015 um aumento significativo do número de indivíduos com excesso de peso (IMC ≥ 25 kg/m^2) atingindo a casa dos 2,3 bilhões de pessoas e 700 milhões de obesos (IMC ≥ 30 kg/m^2), indicando um aumento de 75% nos casos de obesidade em 10 anos no mundo (Who, 2000).

A SM, embora seja de manifestação clínica multifatorial, tem sido definida pela presença de resistência à insulina ou DM 2 e de pelo menos dois dos seguintes fatores: obesidade abdominal (relação cintura-quadril > 0,90 ou índice de massa corporal ≥ 30 kg/m2), dislipidemia (triglicerídeos séricos ≥ 1,70 mmol/l ou lipoproteína de alta densidade (HDL) < 0,9 mmol/litro), hipertensão (≥ 140/90 mmHg). Esses componentes principais foram considerados fundamentais para uma definição geral, embora muitos outros distúrbios relacionados a função endotelial e a coagulação têm sido associados com a SM (Liese *et al*., 1998). A SM abrange uma grande variedade de alterações fisiopatológicas, todas de repercussões sistêmicas, acometendo os mais distintos territórios do organismo, nos quais alterações nos transportadores de glicose são observadas em maior ou menor grau (Machado *et al*., 2006).

A diabetes (hiperglicemia) e a obesidade são condições de descompasso metabólico relacionado ao processo evolutivo do homem com impacto na morbidade e mortalidade da população. Que pode ser observado, por exemplo, nos índios PIMA, que são populações geneticamente propensas a desenvolver DM2, tanto surgimento quanto o desenvolvimento são determinados pelas mudanças ambientais, relacionado ao estilo de vida que foi mudando com decorrer da evolução humana social (Schulz *et al.;* 2006). Outro exemplo são estudos epidemiológicos feitos em populações africanas, onde condição do estado diabético era considerada rara. Porém devido à incidência urbanização e ocidentalização, surgiram aumento e prevalência DM2 na África. Devido à alta taxa de crescimento urbano, mudanças na dieta, redução da atividade física e obesidade crescente, estima-se que a prevalência de diabetes é devido a triplicar nos próximos 25 anos (Sobngwl *et al* .; 2001).

A obesidade está frequentemente associada com aumento da trigliceridemia e redução do HDL - colesterol em torno de 5% e aumento na concentração de apo-B lipoproteínas. Deste modo, os efeitos da obesidade no metabolismo lipídico são principalmente mediados pela resistência à insulina e a obesidade visceral (Milléo, 2005). A obesidade visceral leva resistência periférica, devido a produtos metabólicos liberados pelo tecido adiposo, como as citosinas e outros hormônios. O que acarretará também numa disfunção endotelial e processo inflamatório (Carvalho *et al* .; 2006).

2.2. Clínica e controle da Diabetes:

Segundo Stern e colaboradores (2005), estabelecer um diagnóstico para DM é um processo trabalhoso já que não se refere a uma única doença, mas

sim a transtornos múltiplos de diferentes causalidades. O diagnóstico clínico pode ser realizado verificando o nível plasmático de glicose após 12 horas de jejum maior ou igual a 126mg/dL (7,0mmol/l) em duas ocasiões diferentes. Nível plasmático de glicose maior ou igual a 200mg/dL ou 11,1mmol/l duas horas após uma dose de 75g de glicose oral como em um teste de tolerância à glicose (TOTG) em duas ocasiões distintas. Ainda a verificação aleatória nível plasmático de glicose igual ou acima de 200mg/dL ou 11,1mmol/l, sujestivo de DM (Anand *et al*., 2003).

Diferentes sintomas podem ser levados em consideração, contudo três são fundamentais para a identificação da DM2: a poliúria, caracterizado pelo aumento do volume urinário; a polidipsia, evidenciada pelo aumento da sede e consequente ingestão de líquido e a polifagia, que implica em aumento de apetite (Who/Idf, 2006). Adicionalmente podem estar acompanhados dos sintomas de perda rápida de peso, náusia, vômito, sede constante, fadiga e nervosismo. Além disso, infecções repetidas na pele ou mucosas, machucadas que demoram a cicatrizar e dores nas pernas devido a má circulação (Expert Committee, 2004).

A confirmação de um quadro clínico de diabetes também irá diferir entre uma pessoa que apresenta sintomas graves e hiperglicemia, para as outras com valores de glicose no sangue encontrado um pouco acima do valor de corte de diagnóstico (Frandkin *et al*., 2004). O diagnóstico de diabetes numa pessoa assintomática nunca deve ser feito com base em um único valor anormal de glicose sangüínea (Ada, 2006)

2.3. Genética da Diabetes Mellitus tipo 2

Embora todas as categorias de diabetes tenham algum traço genético, estes mecanismos de herança e controle genético estão ainda por ser melhor explicados. A exceção dos casos de MODY, que apresentam uma herança tipicamente autossômica dominate (Velho e Froguel,1998), os demais casos são de caráter poligênico e também estão associados a fatores ambientais (DeFronzo *et al*., 1992; DeFronzo, 1997). A DM1 também pode ser herdável atingindo cerca de 5 a 10% de todos os casos de DM (Zouali *et al*., 1997). Por outro lado, a maioria dos casos de diabetes (90 a 95%) podem ser atribuídos a DM2, que tem causas multifatoriais e uma natureza genética bastante complexa (Luo *et al*., 1995).

A DM2 acomete principalmente os obesos, hipertensos e dislipidêmicos e tem na resistência a insulina sua maior causa. Com etiologia genética heterogênea, o desencadeamento da doença é influenciado por uma série de genes de susceptibilidade, assim como por fatores ambientais (Luo *et al*., 1995). A hiperglicemia ocorre em consequência de uma combinação de falhas na sensibilidade à insulina, assim como na disfunção das células β pancreáticas (Reis e Velho, 2002). Estudos populacionais tem mostrado a associação de alguns genes a DM2.

Com os avanços na área da genética molecular e genômica, duas possibilidades de abordagem a cerca das possíveis causas genéticas da DM2 podem ser hoje empregadas. Uma delas atribui maior relevância a escolha de genes candidatos e a outra está fundamentada na genotipagem de marcadores polimórficos (microssatélites), conhecida como *genoma scan*. Algumas características biológicas podem auxiliar na eleição de genes candidatos a

serem investigados em relação a DM2, sendo estes: função biológica da proteína, receptores, transportadores; *loci* envolvidos em condições associadas ao diabetes como obesidade e síndrome metabólica; expressão gênica diferenciada em diabéticos em relação a não diabéticos (Reis e Velho, 2002). Devido a sua natureza heterogênea e complexa, é muito difícil correlacionar um gene específico na predisposição a DM2. Levando em consideração o aspecto ambiental na aquisição da obesidade e desta em mudanças metabólicas que podem levar à resistência a insulina, alguns genes tem se apresentado como objeto de estudo. Neste sentido, o tecido adiposo, especialmente aquele presente na gordura visceral (obesidade central), liberam sinais hormonais e citosinas para outros tecidos. Um exemplo é a ativação do fator inflamatório NF-$_k$β que está relacionado ao desenvolvimento da resistência à insulina (Shoelson *et al*, 2006), pois o aumento da massa adiposa altera produção adipocina e aumentando expressão de fatores inflamatórios (Carvalho *et al.;*2006). Outros fatores de transcrição também podem estar envolvidos na sensibilização a insulina como o PPAR-ɣ(receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama) que está implicado na diferenciação adipocitária e no metabolismo lipídico (Auwerx, 1999), sendo expresso pelo próprio tecido adiposo potencializando a sensibilidade à insulina e suprimindo os níveis circulantes e/ou ações de fatores derivados do tecido adiposo que causam insulino-resistência, como TNFα (Tavares *et al* .; 2007)

Estudos multicêntricos e em diferentes populações, utilizando da metodologia de *genoma scan* feito por análise de sequência do DNA através de marcadores moleculares em comparação com genomas depositados em banco de dados, e com concordância entre gêmeos monozigóticos e histórico familiar,

têm demonstrado associação de alguns genes com a predisposição a DM2. Alguns destes genes são o TCF7L2, FTO, KCNJ11, NOTCH2, WFS1, CDKAL1, IGF2BP2, SLC30A8, JAZF1, e o HHEX (Lyssenko *et al*., 2007; McCarthy, 2010). Dentre os mais importantes está o gene da KCNJ11 (*potassium inwardly rectifying channel, subfamily J, member 11*) que codifica o canal potássio e uma mutação nesse gene estaria associada com a hiperinsulinemia, e sua subunidade Kir6.2 que codifica a ilha ATP-sensível do canal de potássio sendo um canal para dentro retificar os íons de potássio, e o TCF7L2 (*transcription factor 7–like 2*), que regula a expressão do gene para proglucagon e com isso a produção de GLP-1 (Rother, 2007).

Uma vez que o impacto maior atribuído ao desenvolvimento da DM2 diz respeito ao efeito ambiental, cabe investigar como esta influência, ou ao menos seus processos chave, interferem na regulação de genes envolvidos no metabolismo glicídico. Assim, enterohormônios, ou incretinas como são conhecidos peptídeos intestinais que tem função no estímulo a produção de insulina e diminuição de glucagon pelo pâncreas (Figura1), como o GLP-1 (*Glucagon-like peptide-1*) (Holst *et al*., 1987, Kreymann *et al*., 1987) e o PYY (*Pancreatic Peptide* YY_{3-36}) (Tatemoto *et al*., 1985), se apresentam como candidatos a estudos de caracterização funcional e de regulação da expressão gênica.

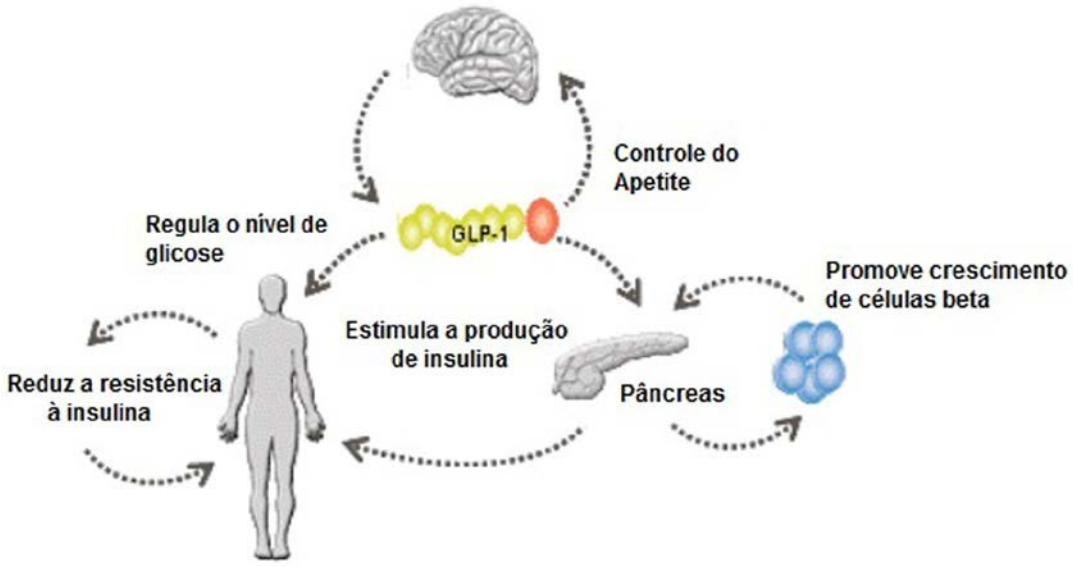

Figura 1 – Resposta pós prandial da incretínica do GLP-1 e sua ação neuroendócrina restabelecendo o equilíbrio metabolismo humano. Adaptado de Ehlers (2006).

2.4. Genes candidatos GLP1 e PYY.

2.4.1. GLP-1:

Um importante fenômeno fisiológico no metabolismo da glicose é o efeito incretínico. Este acontece quando a produção de insulina pelo pâncreas aumenta mediante sinalização por substâncias produzidas pelo próprio pâncreas, como glucagon e pelo intestino, como GLP-1 ditos incretinas. Dois dos peptídeos de grande relevância nesse processo são o GIP (*glucose-dependent insulinotropic popypeptide*) e o GLP-1 (*glucagon-like peptide-1*). Essas incretinas são peptídeos intestinais, o GIP produzido nas células K do duodeno e primeira porção do jejuno, enquanto o GLP-1 é sintetizado nas células L do íleo e cólon, em resposta a ingestão alimentar (Frias e Edelman, 2008). Acredita-se que o GLP-1 desempenhe um papel maior como efeito incretínico do que o GIP (Kreymann *et al*., 1987).

Em pacientes com DM 2, o efeito incretínico é insuficiente para o estímulo adequado a secreção de insulina pelas células β pancreáticas. Atualmente, tem sido utilizado moléculas homólogas ao GLP-1 humano (GLP-1 recombinante) para o controle da DM2, a exemplo da exenatide e do liraglutide, quando da necessidade da produção de insulina mediada por incretinas (Ryan e Hardy, 2011).

O GLP-1 é um polipeptídio secretado pelas células entero-endócrinas L do intestino distal em resposta à ingesta de nutrientes. As ações do GLP-1 incluem efeito sacietógeno direto no hipotálamo, diminuição da absorção de gorduras pelo trato gastrointestinal e inibição da motilidade intestinal (Figura2). Entretanto, a sua principal ação é a potencialização da síntese e liberação de insulina pelas células ββ das ilhotas pancreáticas (Kreymann *et al*., 1987; Farilla *et al*., 2008).

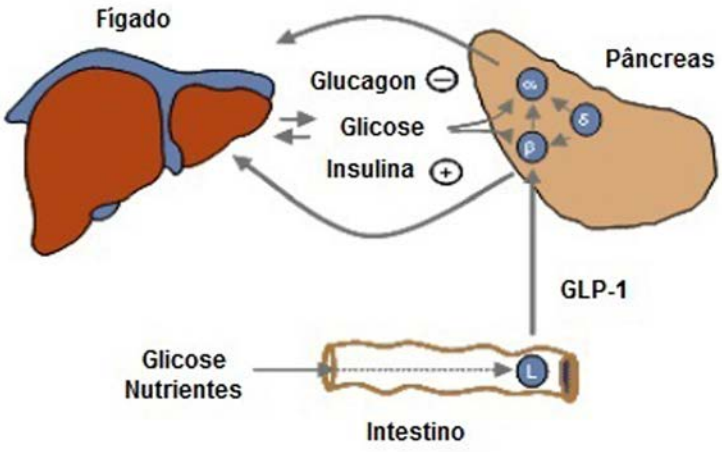

Figura 2 – Esquema de células L liberando GLP-1 para o pâncreas por meio de estímulo após ingesta alimentar, onde o GLP-1 liberado é sinliza para células β que por sua vez liberam mais insulina e diminuem liberação de glucagon,mantendo assim o controle glicêmico no sangue. Adaptado de Ehlers (2006).

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 (Bell , 1986). A molécula biologicamente ativa do GLP-$1_{(7-36)}$ consiste de 30 aminoácidos (HAEGTFTSDVSSVLEGQAAKEFIAWLVKGR) que é inativado *in vivo* pela enzima dipeptidil peptidase-IV em 1 à 3 minutos (Nauck , 1998).

A função incretínica 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 adenilil ciclase e resulta na produção e secreção de insulina (Drucker *et al*., 1987).

2.4.2. PYY:

Este hormônio incretínico pertence à família dos peptídeos pancreático (PP), da qual faz parte o neuropeptídeo Y. O peptídeo pancreático YY (PYY) é secretado principalmente pelas células "L" da mucosa do intestino delgado (íleo) (Taylor, 1985), imediatamente após a alimentação (Murphy e Bloom, 2006), em proporção às calorias ingeridas, sugerindo controle neural da secreção (Degen, 2005). O PYY também se expressa em neurônios do tronco cerebral (Glavas *et al*., 2008). O PYY, assim como o GLP-1, é considerado componente fundamental do chamado "*ileal brake*". Aparentemente, o PYY e o PP reduzem a expressão da grelina no estômago e têm efeito anorexígeno (Kim , 2005). Estudos com camundongos *knockout* Y2R confirmam esta evidência (Murphy e Murphy e Bloom, 2006).

O PYY é produto de um gene localizado no cromossomo 17 humano, composto por 97 aminoácidos e processamento alternativo para duas

isoformas: o PYY_{1-36} e o PYY_{3-36}. A forma do PYY predominantemente encontrada na circulação sanguínea é o PYY_{3-36} que se liga ao receptor Y2R (Murphy e Bloom, 2006).

2.5 Bases evolutivas para a Gastroenteromentectomia Adaptativa com Bipartição intestinal (Duodenal Switch Parcial - DSP).

Uma primeira tentativa de interpretação evolutiva para a crescente prevalência da obesidade e DM 2 foi postulada por Neel em 1962. A hipótese do "genótipo econômico" se fundamenta na presença de um conjunto de alelos supostamente adaptativos no ambiente pretérito, cenário evolutivo em que os hominídios se deparavam com a incerteza de poder contar com comida em abundância ou períodos de fome pela ausência de alimento. Deste modo, armazenar energia seria estratégico para a sobrevivência (Neel, 1962). Contudo, no presente, estes "genes econômicos" teriam hoje uma carga genética e efeitos deletérios como o desenvolvimento da obesidade e DM2. Apesar de nosso conhecimento do genoma humano, tais "genes econômicos" permanecem ainda desconhecidos (Stearns e Koella, 2008), embora a cada dia sejam divulgados achados de associações de SNPs (*Single Nucleotide Polimorphism*) em estudos populacionais de grande amplitude (Kathiresan *et al*., 2008). Em editorial da revista *Science* de fevereiro de 2006, intitulado "A medicina necessita da evolução" (*Medicine Needs Evolution*), os pesquisadores Randolph M. Nesse, Stephen C. Stearns e Gilbert S. Omenn reconhecem a Evolução como uma ciência de base para a Medicina (Nesse *et al*., 2006), sendo este um novo campo de investigação em biologia evolutiva.

Os hominídeos e humanos primitivos saíam em busca de seu alimento pela coleta ou pela ação coletiva mais elaborada da caça. O resultado dessa busca por alimento era variável em relação à qualidade e quantidade, e os indivíduos alimentavam-se de maneira irregular passando longos períodos em jejum. Devido às dietas primitivas serem baseadas em folhas e frutos, principalmente antes do advento da agricultura (que ampliou a participação de grãos e turbéculos mais calóricos), essas dietas eram volumosas, hipocalóricas e de difícil digestão face à grande participação de fibras. O estômago dos humanos primitivos (Hominoideo) selecionado nestas condições tinha capacidade de armazenar grandes volumes, semelhante ao dos gorilas atuais (Milton, 2003). Também as primeiras porções do intestino podiam ser bastante permeáveis, sem que isto resultasse em rápidas e intensas invasões do sangue por nutrientes, posto que a dieta primitiva, freqüentemente, era cercada por partículas de celulose e não oferecia abundância de nutrientes prontos para serem absorvidos (Milton, 2003). Com o desenvolvimento tecnológico alcançado nos últimos cem anos, a oferta de alimentos processados, hipercalóricos e livres de partículas não digeríveis é maior e mais acessível à população (Bellisari, 2008). Obesidade, hipertrigliceridemia e DM 2 estão entre as conseqüências do descompasso adaptativo entre a evolução biológica do aparelho digestório, gordura visceral, metabolismo e a evolução cultural representada por hábitos alimentares, sedentarismo, alimentos processados, entre outros (Deitel, 2006).

Na tentativa de intervir em casos graves de risco de morte provocados pela SM, especialmente referentes a obesidade mórbida, foram experimentados vários procedimentos cirúrgicos até o momento, normalmente

envolvendo processos que levam à restrição e/ou desabsorção alimentar. A técnica de CAPELLA representa bem o “Padrão Ouro”, do tratamento cirúrgico para obesidade nos dias atuais. A NIH (*National Institutes of Health – Consensus Development Panel*), realizada em 1991, referendou o *bypass* gástrico em Y de Roux. Contudo, novos conceitos trouxeram novas considerações a respeito do tratamento cirúrgico da obesidade e suas comorbidades, gerando a necessidade não somente de ajustar o peso do paciente como também à de ajustar o equilíbrio neuroendócrino e metabólico, diminuindo o risco de doenças relacionadas ao excesso de peso (Milléo, 2005).

A técnica de Santoro está fundamentada em bases fisiológicas e em dados antropológicos, tendo uma base evolucionária, inaugurando uma amplitude de visão incomum na idealização de procedimentos cirúrgicos. Já em 2003, Santoro já postulava que o comprimento variável do intestino (polimórfico) na população humana poderia ter implicações no processo de desenvolvimento da DM2, em face a dieta moderna hipercalórica (SANTORO, 2003). A técnica reúne procedimentos que isoladamente são amplamente conhecidos, inclusive no ser humano, e que apenas estão reunidos em uma associação nova. Juntos, constroem um tubo digestivo proporcionalmente reduzido, mas com as funções e estrutura geral preservada, uma reengenharia do aparelho digestório, sem prejudicar suas múltiplas funções (MILLÉO, 2005).

Recentemente alguns procedimentos cirúrgicos têm sido propostos para o tratamento da DM2. A gastroenteromentectomia é baseada na ressecção da gordura visceral e do grande omento. Preservando jejuno inicial, duodeno e o segmento do íleo proximal criando bipartição intestinal (Figura 3), procedimento visa à regularização de processos neuroendócrinos com base na adaptação

anatômica de órgãos do sistema digestório (Santoro *et al*., 2008). A DSP cria uma proporção adaptada do trato gastrintestinal (GI), que magnifica as respostas pós-prandiais neuroendócrinas. Como resultado tem-se uma redução da produção de grelina produzida principalmente na mucosa gástrica e de resistina pela retirada do grande omento, levando mais nutrientes para serem absorvidos distalmente proporcionando melhor secreção de GLP-1 e de PYY (Santoro *et al*., 2008), e ajuste adequado da produção de insulina pelo pâncreas frente a ingesta alimentar quando este órgão secretor ainda mantém suas funções endócrinas preservadas(Figura 3).

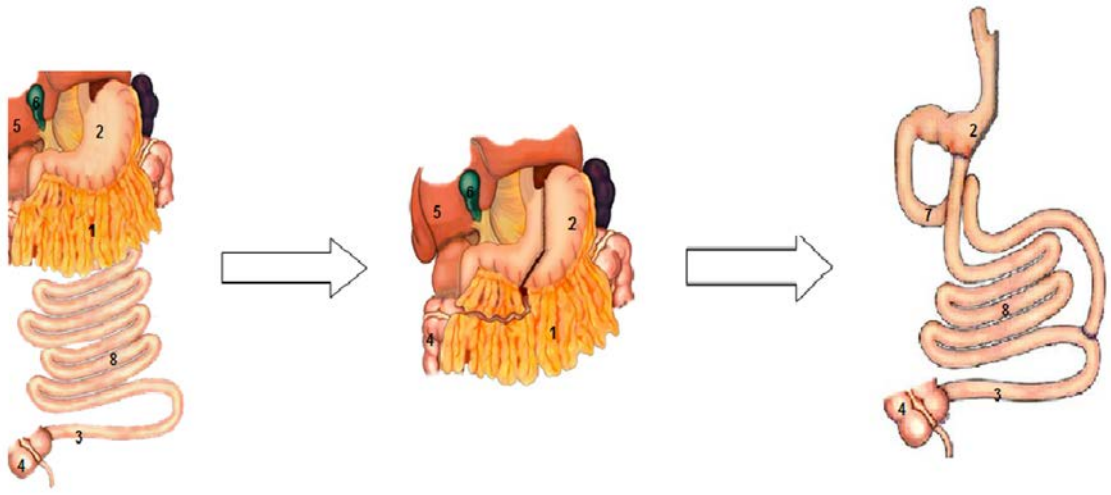

Figura 3 - Primeiro esboço do trato gastrointestinal e porções: 1. omento, 2.estômago, 3. íleo distal, 4 intestino grosso, 5.fígado, 6.visícula biliar. Segundo esboço refere-se a gastrectomia e omentectomia. E o terceiro esboço Duodenal Swicth Parcial.

2.6 Conceitos em Imunohistoquímica

A Imunohistoquímica (IHQ) é uma técnica de coloração celular diferencial sobre cortes histológicos de tecidos pré-fixados (Walker, 2006). A IHQ se

presta à análise da tradução de proteínas verificadas diretamente no tecido biológico, tendo como mecanismo básico o reconhecimento de moléculas de proteína (antígenos) por um anticorpo primário (Ac primário). A IHQ pode ser realizada empregando-se anticorpos policlonais [vários sítios de ligação antigênico (epítopos) para uma mesma proteína], ou monoclonais (um único epítopo específico) (Simerly *et al*.; 2003).

O complexo antígeno-anticorpo pode ser detectado pela IHQ de diversos modos. Mais freqüentemente, um anticorpo é conjugado a uma enzima que pode ser uma peroxidase ou fosfatase alcalina, que tem como função a conversão de um cromógeno incolor em um produto final que pode conferir diversas cores aos antígenos teciduais marcados. As cores mais comuns são a castanha (peroxidase + diaminobenzidina-DAB) e a vermelha (fosfatase alcalina + *fast red*) (Simerly *et al*., 2003). Alternativamente, o anticorpo pode ser marcado por um corante fluorescente, que permite a leitura das regiões marcadas através da emissão de comprimentos de onda visíveis em resposta a excitação ultra violeta.

Atualmente existe disponibilidade comercial para diversos tipos de anticorpos comerciais, o que facilita o emprego e diversificação dos estudos envolvendo a IHQ. Há mais de 40 anos utilizada na investigação de doenças humanas como no diagnóstico de neoplasias, a IHQ tem sido utilizada cada vez mais na avaliação terapêutica e investigativa (Nonogaki *et al*.; 2007), assim como na pesquisa básica para compreender a localização e distribuição de proteínas expressas diferencialmente em distintos tecidos (Taylor *et al*., 2006). Por exemplo, o aumento da expressão da *p*53, proteína citoplasmática relacionada a supressão tumoral, ocorre por acúmulo intranuclear em

decorrência da diminuição de degradação protéica ocasionada por mutação gênica. O emprego da IHQ com anticorpo *p53* detecta a presença da proteína ao nível citoplasmático, que em trabalhos clínicos, tem sido relacionada a agressividade tumoral quando o gene da *p53* estiver super expresso (Waitzeberg *et al* ., 2004).

Mais recentemente, grande atenção tem sido voltada para a demonstração de marcadores prognósticos de tumores celulares, impulsionados pelo advento da biologia molecular e da descoberta de numerosas moléculas regulatórias, aliada com produção de anticorpos específicos correspondentes (Capelozzi *et al*., 2009). O conhecimento da ação das proteínas nos tecidos oferece condições de interpretação a cerca da dinâmica da expressão gênica, inferida através do precipitado celular (complexo antígeno-anticorpo-enzima) diagnosticado pela IHQ. Esta interferência permite, entre outras ações, por exemplo, traçar uma linha diagnóstica entre o estado clínico de pacientes em condições de tratamento e também na ausência (Castro Júnior *et al*.; 2010).

Outro exemplo, a imuno localização de células L com marcação por anticorpo contra GLP-1 realizada em porcos para demonstrar maior concentração destas células no íleo em relação ao jejuno (Mortensen et al., 2003). Além da utilização do GLP-1 como imuno marcador no trato gastrointestinal de rato, porco e humano (Eissele et al., 1992), de modo a avaliar distribuição de células partindo de características morfológicas e densidade celular e que dentre elas variam de acordo com ordem das espécies. E o mesmo imuno marcador sendo também utilizado no pâncreas para localizar na periferia das ilhotas células alfas imuno reativas.

3.1 – Justificativa:

A DM 2 tem se tornado um grave problema de saúde pública mundial ocasionando um aumento significante da morbidade e mortalidade da população mundial. Além de ser um dos fatores que contribuem para surgimento e aumento da Síndrome Metabólica (Who, 2009).

O crescente e impactante distúrbio metabólico verificado na população mundial pela incidência da DM 2 e da SM, encontram em suas causas básicas um descompasso evolutivo de adaptação biológica do homem frente à hábitos de vida modernos que, muito rapidamente tem mudado. Destaque deve ser dado para o sedentarismo e consumo de alimentos altamente energéticos e pobres em fibras, contrário aos hábitos do homem primitivo.

Diante disso, alguns procedimentos cirúrgicos têm sido propostos para o tratamento da DM2 (Santoro *et al*., 2008). A DSP visa à regularização de processos neuroendócrinos com base na readaptação anatômica de órgãos do sistema digestório. Sua base teórica é estimular mais precocemente as células êntero-endócrinas L a produzir os peptídeos GLP-1 e PYY que são secretados por elas na porção do intestino distal em resposta à ingesta de nutrientes.

O GLP-1, produzido nas células L age direto no hipotálamo dando efeito de saciedade, diminuindo a absorção de gorduras pelo trato gastrointestinal, assim como inibe a motilidade intestinal e principalmente, estimula a síntese e liberação de insulina pelas células beta pancreáticas em resposta a ingestão alimentar (Kreymann *et al*., 1987; Farilla *et al*., 2003).

O PYY, também sintetizado nas células L intestinais, a maioria co-expressando GLP-1 (Kim *et al.,* 2005), é secretado pós-prandialmente com

resposta sacietógena mais efetiva em relação a carga lipídica (Degen *et al*., 2005).

Assim, entender melhor o comportamento histológico na localização de células secretoras e da síntese destas incretinas frente ao controle cirúrgico proposto para controle da DM2, é papel fundamental para interpretação de um quadro metabólico tão complexo como o apresentado pela SM e a própria DM2.

3.2 - Objetivos

Gerais:

Estudar a expressão tecidual dos genes *GLP1* e *PYY* com vistas a identificar e quantificar células secretoras ao longo do intestino delgado de pacientes diabéticos tipo 2 submetidos a Gastroenteromentectomia Adaptativa com Bipartição Intestinal (Duodenal Switch Parcial - DSP).

Específicos:

1 - Caracterizar histologicamente amostras de biópsia do intestino (jejuno e íleo) em indivíduos submetidos à DSP no pré-operatório e no pós-operatório;

2 - Identificar e localizar as células L intestinais;

3 - Realizar ensaios de marcação de proteínas por análise imunohistoquímica total de células L da mucosa intestinal de todos os pacientes;

4- Investigar possíveis modificações histológicas na mucosa, especialmente nas células L intestinais;

5 - Relacionar os dados de expressão gênica com o estado clínico dos pacientes durante o tempo da pesquisa, especialmente em relação ao processo da síndrome metabólica e diabetes;

4 – Materiais e Métodos

4.1 - Amostragem

Os fatores de inclusão para os pacientes da Gastroenteromentectomia Adaptativa com Bipartição Intestinal (Duodenal Switch Parcial - DSP) seguiram o protocolo aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Estadual de Ponta Grossa (COEP-UEPG, protocolo nº 0783/10, parecer 37/2010). O material de análise foi obtido através de amostras retiradas por endoscopia digestiva alta (estômago, jejuno e íleo), e colonoscopia (íleo), em sete pacientes submetidos à DSP no trans-operatório e no pós-operatório segundo o procedimento descrito por Santoro e colaboradores (2008).

4.2 - Metodologias

4.2.1 Gastroenteromentectomia Adaptativa com Bipartição Intestinal (Duodenal Switch Parcial - DSP).

O procedimento começa por via laparotômica, pela qual se realiza uma gastrectomia vertical (Branco Filho *et al*.; 2011) com técnica previamente descrita, entretanto frouxa (com Sonda de Fouchet 36F, não ajustada), com ressecção de uma grande porção gástrica. Omento maior é removido, destacando-o do cólon-estômago e uma jejunectomia é feita nas seguintes bases tal qual descrita por Santoro e colaboradores (2003, 2008). Separa-se o segmento do íleo proximal aos 40 primeiros centímetros de jejuno até os últimos 260 cm do íleo a partir da válvula íleo-secal. O segmento compreendido entre estes dois pontos é ressecado, respeitando o limite inferior da normalidade entre os adultos nunca operados.

Segue-se uma jejuno-íleo anastomose, término-lateral feita a 100 cm da válvula íleo-cecal e uma gastro-íleo anastomose feita latero-lateralmente no antro gástrico, criando a bipartição do trânsito. Encerra-se o procedimento com o fechamento das incisões e drenagem, e obtenção de amostras (estômago, jejuno e íleo). O procedimento cirúrgico e as biopsias foram realizados na Sociedade Beneficente São Camilo do Hospital Vicentino – Ponta Grossa, Paraná.

4.2.2 Imunohistoquímica (Protocolo Anexo 6.3)

As amostras foram previamente fixadas em Solução de Bouin (ácido pícrico 75 ml, formol 20 ml, ácido acético 5 ml) logo após a biópsia, sendo fragmentadas em pequenas porções para permitir a fixação rápida e uniforme do tecido. Após 24horas o material foi imerso em álcool 70% por 48horas. Então o material passou por banhos de desidratação em série alcoólica, banhos de xilol e foi emblocado em parafina, conforme protocolo do Laboratório de Histologia de UEPG. Cortes histológicos com 5 µm de espessura foram obtidos e corados com hematoxilina e eosina, conforme protocolo adotado no Laboratório de Histologia da UEPG.

Para reações de imunohistoquímica foram realizados cortes com 5 µm de espessura dos blocos de parafina contendo tecido a ser testado. Os cortes foram fixados em lâminas silanizadas (*3-aminopropyl-triethoxysilane*, Sigma, A-3648, EUA) e colocados em estufa a 56^{o}C por 24 horas. Na seqüência, os cortes foram diafanizados em xilol, com duas trocas de 10 minutos em temperatura ambiente e hidratados em concentrações decrescentes de etanol (absoluto, 90%, 70%, 50%) seguindo-se banho em

água. Após a hidratação dos cortes foi então realizada a recuperação antigênica, específica para cada anticorpo utilizado. A relação de anticorpos e os detalhes técnicos utilizados encontram-se sumarizados na Tabela 1.

Tabela 1: Relação dos anticorpos utilizados, indicando o clone, marca a concentração e o método de recuperação antigênica.

Anticorpo	Clone	Marca	Diluição empregnada	Recuperação antigênica
GLP-1	SC 57166 (monoclonal)	Santa Cruz Biotecnology	1:1000	Tampão de Citrato de Sódio (pH 6,0) Microoondas :potência máxima por 20 minutos
PYY_{3-36}	SC 98995 (policlonal)	Santa Cruz Biotecnology	1:1000	Tampão de Citrato de Sódio (pH 6,0) Microoondas :potência máxima por 20 minutos

Foi realizada recuperação antigênica em microondas (Electrolux, Brasil), por 20 minutos em potência máxima e a solução de recuperação antigênica usada foi o tampão citrato, à base de ácido cítrico, 10 mM e pH 6,0. Após a recuperação antigênica, as amostras foram deixadas em temperatura ambiente por 20 minutos para resfriamento.

Na seqüência os cortes foram lavados em água corrente por 5 minutos e incubados com solução aquosa de peróxido de hidrogênio 20 volumes (BIOTEC, Brasil) em 6 trocas de 5 minutos cada, para bloqueio da peroxidase endógena. Foi realizada Nova lavagem em água corrente, durante 5 minutos e, em seguida, os cortes foram lavados por três vezes de 2 minutos cada com solução fosfatada tamponada (PBS). Os cortes foram então incubados com os anticorpos primários, previamente diluídos em PBS, por aproximadamente 18 horas (*overnight*) a 4°C em câmara úmida. A diluição dos anticorpos primários foi de 1:1000.

Na seqüência os cortes foram lavados com PBS (3 trocas de 3 minuto) e a reação revelada com o Novo *Link Polymer Detection System* (Novocastra, Brasil). Para tanto se incubou com solução bloqueadora pós-primária (durante 30 minutos), NovoLink TM Polímero (30 minutos) e solução de trabalho de DAB (50 µl de 3,3'-diaminobenzina - cromógeno e 1000 µl solução tampão – durante 05 minutos em câmara escura 37°C). Em seguida, os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Carazzi, diafanizados em xilol e montados com bálsamo do Canadá.

Como controle negativo das reações, lâminas com cortes foram submetidas a todas as etapas da reação imunohistoquímica, exceto a incubação com o anticorpo primário.

Então os cortes histológicos foram analisados em microscopia de campo claro (Olympus BX41) com captura digital de imagens (Olympus DP71 equipada com o software DP-Controller).

A identificação de antígenos nos tecidos com anticorpos foi feita através da secção corada em células da mucosa intestinal do tecido alvo (jejuno e íleo). O diagnóstico quantitativo e qualitativo dos anticorpos *GLP-1* e *PYY* das células L foi realizado em um microscópio Olympus BX41 e câmera de captura Olympus DP72. As imagens foram tratadas com o software Image Pro Plus 6.0. Para validação estatística foram contadas células de 10 campos aleatórios para cada lâmina, para cada anticorpo testado.

4.2.3 *qRT-PCR* (Protocolo Anexo 6.4)

O RNA total dos pacientes foi extraído de aproximadamente 3 mm^3 de tecido alvo (mucosa do íleo distal) com o uso do kit comercial *"Illustra RNAspin*

Mini RNA Isolation Kit" (GE Healthcare®), segundo as instruções do fabricante. Aproximadamente 1 µg do RNA total foi utilizado para a síntese de fita do DNA complementar *("First-Strand cDNA Synthesis Kit" - GE Healthcare®).*

As amostras de cDNA foram então submetidas à ensaios de expressão gênica de GLP1 e PYY_{3-36} por *Quantitative Real time* (qRT-PCR) no equipamento Stratagene Mx3005P, utilizando-se o "Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix" (Stratagene®) com os *primers* comerciais *(QuatinTect Primer Assay - Qiagen*). O nível de expressão de cada gene alvo foi então normalizado para RNA ribossômico 18S. Pará uma Análise dos dados foi utilizado o 2-ΔΔCt Método de Quantificação Relativa (Livak e Schmittgen, 2001).

As amplificações (PCR) foram realizadas utilizando-se os seguintes componentes: cDNA – 1 µL; *primer forward* – 0,8µM (1 µL); *primer reverse* – 0,8µM (1 µL); Sybr Green (2x) – 12,5 µL; H_2O miliQ autoclavada – 9,9 µL, finalizando um volume total de 20 µL para cada amostra a ser testada. As amostras foram pré-aquecidas a 95^oC por 10 minutos seguiu-se 40 ciclos repetidos de 95^oC por 15 segundos, 60^oC por 1 minuto, 72^oC a 15 segundos. Finalizando com 1 ciclo para a curva de dissociação, sendo: 95^oC por 1 minuto, 55^oC por 30 segundos, 95^oC por 30 segundos. Sendo que para PYY_{3-36} na temperatura de *annelinng* de 55ºC ao invés de 60ºC como GLP-1, sendo mantido a mesma quantidade de reagente e as demais temperaturas/tempos por ciclo.

4.2.*4 Western Blot* (Protocolo Anexo 6.5)

Amostras congeladas dos tecidos foram trituradas em solução de lise (Tris-HCL deixar pH (20mM) – 121,14mg em 40 ml;Na F (fluoreto de sódio) /

(10mM) – 15mg em 40 ml;NP40(1%) – 500µl em 40 ml NaCl(150 mM) – 93,06µl em 40ml;SDS 0,1% - 0,05g em 40ml) até tornar se homogenato de células. As proteínas totais foram dosadas utilizando o kit BCA *Protein Assay Reagent* (*Thermo Scientific*) em placa de ELISA e leitura em espectrofotômetro (UV mini-1240 – SINC) As amostras foram fervidas em solução tampão por 5 min, para evitar a formação de pontes de dissulfeto na proteína.

As proteínas das amostras foram separadas de acordo com o peso molecular em gel de poliacrilamida a 10%. Terminada a corrida foi feita a transferência dessas proteínas para uma membrana de nitrocelulose e com fim desse processo, se inicia o bloqueio (solução a 2% de BSA em T-TBS) na membrana para assim impedir ligações inespecíficas.

Após o bloqueio inicia-se o processo de detecção por incubação com anticorpo primário *over nigth*. No dia seguinte continua-se a reação com incubação do anticorpo secundário (anti-IgG) e a detecção da proteína. A revelação foi feita pelo método radioativo, com exposição do material em câmara escura e revelação de raio-X.

4.2.5 - Análise Estatística

Os dados coletados foram processados e analisados com auxílio do programa *GraphPadPrismaStar* 5.0 (MOTULSKY,2007). As amostras dos pacientes foram comparadas por Teste t de Student para amostras pareadas, tanto para as condições pré e pós operatórias, bem como entres as porções do trato gastrointestinal. O nível de significância do teste foi estabelecido para um valor de $p<0,005$.

5. Resultados e Discussão

Os resultados e discussão estão organizados no capítulo correspondente ao artigo científico

Capítulo I

Detecção de células L na mucosa do trato gastrointestinal por imunohistoquímica em pacientes submetidos a tratamento cirúrgico para controle da DM2

Capítulo I – **Detecção de células L na mucosa do trato gastrointestinal por imunohistoquímica em pacientes submetidos a tratamento cirúrgico para controle da DM2.**

Abstract

The Type 2 Diabetes Mellitus is one of the most striking desease of today. Incretin hormones play a central role in stimulating the endocrine pancreas to produce insulin. This work aimed to investigate the presence, location and secretion of L cells in the small intestine of patients undergoing adaptive gastroenteromentectomy with partial bipartition/splitting. Rehearsal of immunohistochemistry , real-time quantitative PCR and western blot assays were conducted on samples of intestinal mucosa of patients with DM2, in the conditions of pre- and post-surgery. All results were consistent and indicated basal expression and secretion of incretins Glucagon Like Pepitide-1 (GLP-1) and Peptídeo YY (PYY_{3-36}) in L cells. These still showed a greater density in the distal portions of the small intestine and no significant difference was found between patients before and after surgery, given the state of starvation in which the samples were collected. The findings also reinforce the notion that a greater number of L cells in activity, involves a better signaling of the peptides and in response and work of the neuroendocrine road.

Key-words: Type 2 diabetes, bariatric surgery, cells L; GLP-1; PYY_{3-36}.

Resumo

A Diabetes Mellitus 2 é uma das doenças mais impactantes da atualidade. Hormônios incretínicos desempenham papel central no estímulo ao pâncreas endócrino à produção de insulina. Este trabalho teve como objetivo investigar a presença, localização e secreção de células L no intestino delgado de pacientes submetidos a gastroenteromentectomia adaptativa com bipartição parcial. Ensaios de imunohistoquímica, PCR quantitativo em tempo real e *western blot* foram conduzidos em amostras de mucosa intestinal de pacientes com DM2, nas condições de pré e pós-operatório. Todos os resultados foram congruentes e indicaram expressão e secreção basal das incretinas *Glucagon like pepitide*-1 (GLP-1) e Peptídeo YY (PYY_{3-36}) nas células L. Estas ainda se mostraram em maior densidade nas porções mais distais do intestino delgado e nenhuma diferença significante foi encontrada entre os pacientes pré e pós-operado, dado o estado de jejum prolongado em que as amostras foram coletadas. Os achados ainda reforçam que um maior número de células L em atividade, implica em melhor sinalização dos peptídeos e resposta e funcionamento da via neuroendócrina.

Palavras–chave: Diabetes tipo 2, cirurgia bariátrica, células L; GLP-1; PYY_{3-36}

Introdução

A Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2), assim como a Síndrome Metabólica (SM), são desordens metabólicas e multifatoriais. Normalmente ocorrem associadas à obesidade, acúmulo de gordura intra-abdominal, dislipidemias, hipertensão arterial e doenças cardiovasculares (Gomes *et al*., 2006). É estimado que 285 milhões de pessoas sejam portadoras de DM2 e que, até 2030 este fenômeno deve chegar a 439 milhões(Shaw *et al*.;2010) Embora ainda seja bastante polêmico a definição de SM, estudo em diferentes populações têm motivado uma dada relevância (Ford, 2005; Sandhofer *et al*., 2007; Benner *et al*.; 2009),chegando a 90% quando em associação com a DM2 (Song e Hardisty,2008) Isso se deve a rápida mudança no estilo de vida, frente as facilidades conquistadas pelo homem na vida moderna, com reflexos na expectativa de vida da população (Druce e Bloom, 2006).

Muitas são as alternativas propostas para o tratamento da DM2 e vão desde a administração de medicamentos hipoglicemiantes com ou sem a reposição de insulina, mudança alimentar e estilo de vida, até intervenções cirúrgicas (Milléo *et al*., 2006). O freqüente insucesso nos tratamento clínicos em combate a obesidade e diabetes foi um estímulo ao desenvolvimento de cirurgias para tratamento da SM e da DM2. Santoro e colaboradores (2008) demonstraram efetividade no controle da glicemia de pacientes portadores de DM2 submetidos à gastroenteromentectomia. Este procedimento adaptativo do sistema digestório, fundamentado em bases fisiológicas e evolutivas da espécie humana (Bellisari, 2008), por enzima imuno ensaio (ELISA) revelou secreção de GLP-1 e PYY aumentada no pós-prandial, de pacientes com cinco

anos de história cirúrgica e remissão da DM2 com controle glicêmico (Santoro *et al*., 2008). Estes dados suportam a importância das incretinas no controle da DM2.

Ao se estudar portadores de DM2, depara-se com o desafio de controlar a glicemia, especialmente no entendimento da participação dos hormônios incretínicos intestinais GLP-1 e PYY, no estímulo ao pâncreas endócrino na secreção de insulina (Laurie *et al*., 2007). Assim, se reveste de grande importância não somente compreender os mecanismos de secreção das células do epitélio intestinal, mas quem são e onde se localizam estas células responsáveis pela ação dos peptídeos GLP-1 e PYY (Brubaker, 2010).

Deste modo, o presente trabalho teve como escopo investigar a presença, localização e secreção de células L no intestino delgado de pacientes submetidos à gastroenteromentectomia adaptativa com bipartição.

Materiais e Métodos

A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Estadual de Ponta Grossa (COEP-UEPG, protocolo nº. 0783/10, parecer 37/2010).

Obtenção das amostras

Participaram destas pesquisas 7 voluntários que foram submetidos à Gastroenteromentectomia Adaptativa com Bipartição Intestinal (Duodenal Switch Parcial - DSP) e atendiam os seguintes critérios de inclusão: idade > 35 e < 65 anos, pacientes com IMC > 35 Kg/m^2 com DM2 em tratamento dietético e medicamentoso por um período mínimo de 2 anos e com dificuldade de

controle clínico e com hipertrigliceridemia associada. Realizado na Sociedade Beneficente do Hospital Vicentino em Ponta Grossa,Paraná.

Ao todo foram obtidas amostras da mucosa intestinal (estômago, jejuno e íleo) no trans-operatório e no pós-operatório (íleo) de sete pacientes submetidos à DSP e, através de biópsia incisional.

Três meses antes da realização da cirurgia, os pacientes foram submetidos à colonoscopia preparação hipermolar e jejum 4 horas, visando à observação da integridade da mucosa intestinal, momento em que foram coletadas amostras por biópsia do íleo distal, já o duodeno retirado por endoscopia digestiva alta com jejum 4 horas. Na realização da DSP, os pacientes encontravam se em 12 horas de jejum, durante o procedimento foram retiradas amostras de estômago, omento e íleo sendo esta a coleta trans-operatório. Após 3 meses, repetiu se a coleta por endoscopia digestiva alta obtendo – se amostra de íleo para o pós-operatório.

As amostras destinadas aos testes de RT-PCR e *Western Blot* foram armazenadas em *RNA Latter* (Sigma) e mantidas à -80°C. Já o tecido a ser utilizado em ensaios de imunohistoquímica foram armazenados em solução de Bouin (ácido pícrico 75 ml, formol 20 ml, ácido acético 5 ml) por um dia e depois em etanol 70% e deixado a 4°C até seu processamento.

Imunohistoquímica

Os tecidos a serem analisados foram incluídos em parafina e feitos cortes histológicos seriados com 5 µm de espessura em um micrótomo rotativo manual (Leica RM2125RT). Os filmes obtidos foram fixados em lâminas após série alcoólica de desidratação e corados com hematoxilina e eosina.

Para as reações de imunohistoquímica os cortes histológicos foram fixados em lâminas silanizadas (*3-aminopropyl-triethoxysilane*, Sigma, A-3648, EUA) e colocados em estufa a 56^{o}C por 24 horas(Protocolo 6.1). Na seqüência, os cortes foram diafanizados em xilol, com duas trocas de 10 minutos em temperatura ambiente e hidratados em concentrações decrescentes de etanol (absoluto, 90%, 70%, 50%) seguindo-se banho em água destilada. Após a hidratação dos cortes foi então realizada a recuperação antigênica, específica para cada anticorpo utilizado. A relação de anticorpos e os detalhes técnicos utilizados encontram-se sumarizados na Tabela 1.

Tabela 1: Relação dos anticorpos utilizados, indicando o clone, marca, a concentração e o método de recuperação antigênica.

Anticorpo	Clone	Marca	Diluição empregnada	Recuperação antigênica
GLP-1	SC 57166 (monoclonal)	Santa Cruz Biotecnology	1:1000	Tampão de Citrato de Sódio (pH 6,0) Microoondas :potência máxima por 20 minutos
PYY3-36	SC 98995 ((policlonal)	Santa Cruz Biotecnology	1:1000	Tampão de Citrato de Sódio (pH 6,0) Microoondas :potência máxima por 20 minutos

Foi realizada recuperação antigênica em forno microondas por 20 minutos em potência máxima e a solução de recuperação antigênica usada foi o tampão citrato, à base de ácido cítrico (10 mM e pH 6,0). Após a recuperação antigênica, as amostras foram deixadas em temperatura ambiente por 20 minutos para resfriamento.

Na seqüência os cortes histológicos foram lavados em água corrente por 5 minutos e incubados em solução aquosa de peróxido de hidrogênio 20 volumes (BIOTEC, Brasil) em 6 trocas de 5 minutos cada, para bloqueio da peroxidase endógena. Nova lavagem em água corrente foi realizada, durante 5 minutos e, em seguida, os cortes foram lavados por três vezes de 2 minutos

com solução fosfatada tamponada (PBS). Os cortes foram então incubados com os anticorpos primários, previamente diluídos em PBS, por aproximadamente 18 horas a 4°C em câmara úmida. A diluição dos anticorpos primários foi de 1:1000.

Em seguida os cortes histológicos foram lavados com PBS em 3 trocas de 3 minuto cada e a reação revelada com o Novo *Link Polymer Detection System* (Novocastra, Brasil). Para tanto, incubou-se as lâminas em solução bloqueadora pós-primária durante 30 minutos (Novo Link TM Polímero) por 30 minutos e solução de trabalho DAB (50 µl de 3,3'-diaminobenzina - cromógeno e 1.000 µl de solução tampão) durante 5 minutos em câmara escura à 37°C. Em seguida, os cortes foram contra corados com hematoxilina de Carazzi, diafanizados em xilol e montados com bálsamo do Canadá (Protocolo 6.3).

Como controle negativo das reações, lâminas com cortes histológicos foram submetidas a todas as etapas da reação imunohistoquímica, exceto a incubação com o anticorpo primário.

Os cortes histológicos foram analisados em microscopia de campo claro (Olympus BX41) com captura digital de imagens (Olympus DP71 equipada com o *software DP-Controller*). As imagens foram tratadas com o *software Image Pro Plus 6.0.* Para validação foram contadas células imuno marcadas ao aumento de 200x em campo aleatório para cada lâmina, para cada anticorpo testado em todos os pacientes. Os números absolutos de células foram comparados através do teste T pareado ao nível de significância de 0,05% com o *software Graph Pad Prisma Star* 5.0(MOTULSKY,2007).

qRT-PCR

O RNA total dos pacientes foi extraído de aproximadamente 3 mm^3 de tecido alvo (mucosa do íleo distal) com o uso do kit comercial *Illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit* (GE Healthcare®), segundo as instruções do fabricante. Aproximadamente 1 µg do RNA total foi utilizado para a síntese de fita do cDNA (*First-Strand cDNA Synthesis Kit* - GE Healthcare®).

As amostras de cDNA foram então submetidas à ensaios de expressão gênica de GLP1 e PYY_{3-36} por *Quantitative Real time* (qRT-PCR) no equipamento Stratagene Mx3005P, utilizando-se o kit *Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix* (Stratagene®) com os *primers* comerciais (QuatinTect Primer Assay - Qiagen).

As amplificações (PCR) foram realizadas utilizando-se os seguintes componentes: cDNA – 1 µL; *primer forward* – 1µM ; *primer reverse* – 0,8µM (1 µL); Sybr Green (2x) – 12,5µL; H_2O milliQ autoclavada – 9,9 µL, finalizando um volume total de 20 µL para cada amostra a ser testada. As amostras foram pré-aquecidas a 95°C por 10 minutos, seguindo 40 ciclos repetidos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto, 72°C a 15 segundos. Finalizando com 1 ciclo para a curva de dissociação, sendo: 95°C por 1 minuto, 55°C por 30 segundos, 95°C por 30 segundos(Protocolo 6.4). Sendo que para PYY_{3-36} TM de *annelinng* de 55ºC, mantém reagente e as temperaturas/tempos de ciclo.

O nível de expressão de cada gene alvo foi então normalizado para rRNA 18S. Para análise dos dados foi utilizado o 2-ΔΔCt Método de Quantificação Relativa (Livak e Schmittgen, 2001). Os valores de *cicle threshold* (CT) médio foram através do teste T pareado ao nível de significância de 0,05% com o software PrismaGraphPad 5.0 (Motulsky, 2007).

Western Blot

Amostras congeladas dos tecidos alvo foram trituradas em solução de lise (Tris-HCL 121,14mg em 40 ml; Na F 15mg em 40 ml; NP40(1%) – 500µl em 40 ml; NaCl 93,06µl em 40ml; SDS 0,1% - 0,05g em 40ml) até tornar se homogenato de células. As proteínas totais foram dosadas utilizando o kit BCA *Protein Assay Reagent* (*Thermo Scientific*) em placa de ELISA e leitura em espectrofotômetro UV mini-1240 – SINCAs amostras foram fervidas em solução tampão (Solução de azul de Bromofenol*)* por 5 minutos, para evitar a formação de pontes de dissulfeto na proteína.

As proteínas das amostras foram separadas de acordo com o peso molecular em gel de poliacrilamida a 10%. Terminada a corrida realizou-se a transferência dessas proteínas para uma membrana de nitrocelulose e após o bloqueio (solução a 2% de BSA em T-TBS) na menbrana para assim impedir ligações inespecíficas.

A membrana foi submetida a detecção por incubação com anticorpo primário *over nigth*. No dia seguinte continuou a reação com incubação do anticorpo secundário e a decteção da proteína. A revelação foi feita pelo método radioativo, com exposição do material em câmara escura e revelação de raio-X (Protocolo 6.5).

Análise Estatística

Os dados coletados foram processados e analisados com auxílio do programa *Graph Pad Prisma Star* 5.0 (Motulsky, 2007). As amostras dos pacientes foram comparadas por Teste t pareado, tanto para as condições pré, trans e pós operatórias, bem como entres as porções do trato gastrointestinal. O nível de significância do teste foi estabelecido para um valor de $p<0,005$.

Resultados e Discussão

Pela primeira vez as células L intestinais foram mapeadas por imunohistoquímica em pacientes com DM2 submetidos a tratamento cirúrgico, para a detecção da expressão das incretinas GLP-1 e PYY_{3-36}. Uma análise de transecto histológico do fundo do estômago ao íleo distal, passando por porções medianas do tubo digestivo delgado, evidenciou um crescente número de células L ativas (Figura 1A e 1B, Tabela 2), estatisticamente significante (p=0,0409). A imuno localização de células L com marcação por anticorpo contra GLP-1 evidenciou maior concentração destas células no íleo em relação ao jejuno também em porcos (Mortensen et al., 2003). Nossos dados reforçam a hipótese de ocorrência de células L em maior densidade nas porções mais baixas do intestino delgado, embora estejam dispersas ao longo do trato gastrointestinal (Brubaker, 2010 e presente estudo).

O GLP-1 já havia sido anteriormente localizado por imunohistoquímica no trato gastrointestinal de rato, porco e humano (Eissele et al., 1992), assim como o PYY (Lundberg et al., 1982), contudo, nenhum estudo anterior havia mostrado a localização de células L e detecção das incretinas GLP-1 e PYY_{3-36} por imunohistoquímica ao longo do trato gastrointestinal humano, do estômago ao íleo distal.

Dado o papel regulatório que estes pepitídeos desempenham no metabolismo da ingestão alimentar e da biosíntese de insulina (Stanley et al., 2005). A imunohistoquímica em células intestinais com o anticorpo primário contra o PYY_{3-36} na mucosa gástrica, apresentou uma forte imuno marcação, porém suspeita-se de reação cruzada contra a proteína grelina, a qual já foi descrita em células L por Tatemoto et al. (1982).

Embora a secreção fisiológica do GLP1 e PYY_{3-36} ocorra em resposta ao estímulo alimentar (Elliott et al., 1993), nossos dados indicam que as células L apresentam secreção e expressão basal desses genes, observado em pacientes com 12 horas de jejum, confirmado pelos dados de imunohistoquímica, western blot e qRT-PCR (Figura 2 e 3) para GLP-1.Pode ser observado o PYY_{3-36} (Figura 4 e 5) pelos resultados de imuno e qRT-PCR .Conforme demonstrado na literatura, os peptídeos intestinais GLP-1 (Baggio e Drucker, 2007) e PYY_{3-36} (Melisande et al., 2011) apresentam meia vida curta e sua expressão varia durante o dia, conforme a ingestão de alimentos. Assim, o esperado não seria encontrar células L imuno marcadas após um período longo de jejum como verificamos no presente estudo.

Contudo, os resultados obtidos indicam não haver diferença de expressão de GLP-1 entre as condições de pré e pós-cirurgia (p=0,1669) e PYY_{3-36} (0,0017), com pequena significância para os dados de imunohistoquímica que evidenciaram um número maior de células L marcadas com anticorpo contra GLP-1 e PYY_{3-36} no pós-operatório (p=0,0043). Estes dados, contrários aos achados por Santoro et al. (2008), em pacientes submetidos a gastro enteromentectomia, podem ser explicados visto que estes últimos dosaram GLP-1 e PYY_{3-36} na circulação periférica por enzima imuno ensaio (ELISA) em condições de jejum e pós-prandiais de 30, 60, 90 e 120 min com emprego de nutrição padronizada, nutri drink.

Procedimentos bariátricos são adotados com sucesso no controle da saciedade e demonstram melhora do controle metabólico associado ao PYY_{3-36} (Korner et al., 2005; Le Roux et al., 2006; Milléo et al., 2008). Os pacientes do presente estudo, embora não tenham apresentado aumento significativo da

expressão e secreção destas incretinas, nas condições analisadas, apresentam melhor controle glicêmico no pós-cirúrgico (Tabela anexo 6.6), reforçando a importância do procedimento no controle da DM2. A redução do trato gastrointestinal (GI) contribui para uma melhor resposta pós-prandial neuroendócrina e também reduz a produção de grelina e resistina, levando mais nutrientes a serem absorvidos distalmente no intestino delgado, reforçando o estímulo a secreção de GLP-1 e de PYY $_{3-36}$ (Milléo et. al , 2005).

Em conclusão, os resultados dessa investigação confirmam a importância do papel dos peptídeos GLP e PYY $_{3-36}$ como fatores implicados na normalização e regulação do estado da diabetes mellitus tipo 2, bem como no controle metabólico evidenciado pelas marcações das células L intestinais ativas nas porções mais distais do trato gastrointestinal. Um maior número de células L em atividade,implica numa melhor sinalização dos peptídeos, resposta e funcionamento da via neuroendócrina.

Tabela 2 – Número total de células L imuno marcadas por campo pelo anticorpo GLP-1 e PYY nas porções do Trato Gastrointestinal(TGI) amostras transoperatório .

TGI	PYY_{3-36}	GLP-1
Estômago fundo	0	0
Estômago distal	0	0
Jejuno	4	3
Íleo proximal	3	4
Íleo medial	5	7
Íleo distal	7	7
Total	19	21

Comparação entre nº de células L nas porções do TGI para os anticorpos GLP-1 e PYY_{3-36}

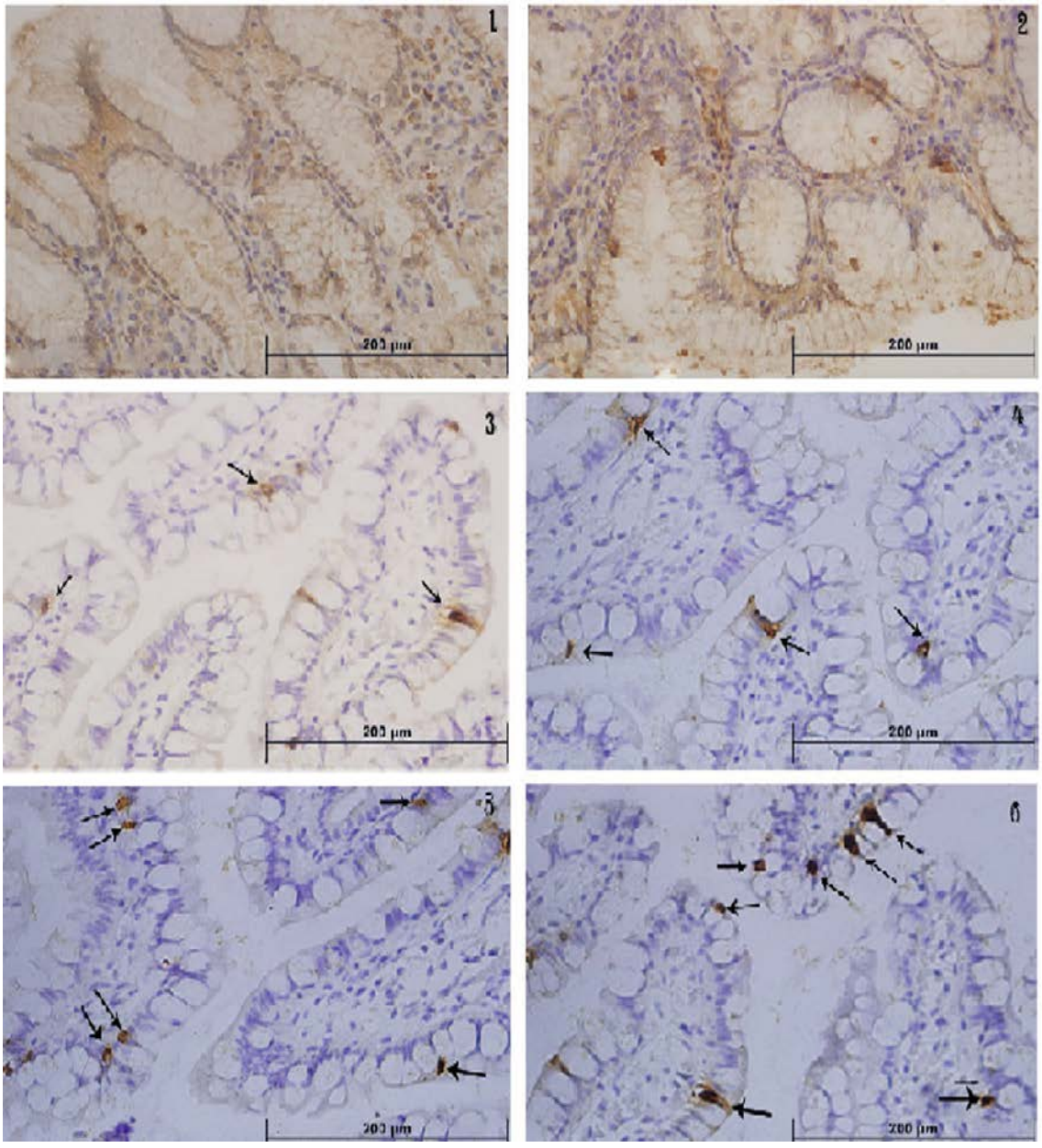

Figura 1A – Imuno marcação obtida com a utilização de anticorpo policlonal para PYY_{3-36} (setas), indicando possível presença de células L no epitélio do trato gastrointestinal. Observa-se ausência de células L imuno marcadas e um beckgraund nas regiões do fundo gástrico (imagem 1) e piloro (imagem 2). Poucas células imuno marcadas na região do jejuno (imagem 3) e íleo proximal (imagem 4). Já na porções mais distais do íleo (imagens 5 e 6), observa-se maior frequência de células L em atividade imuno marcadas.

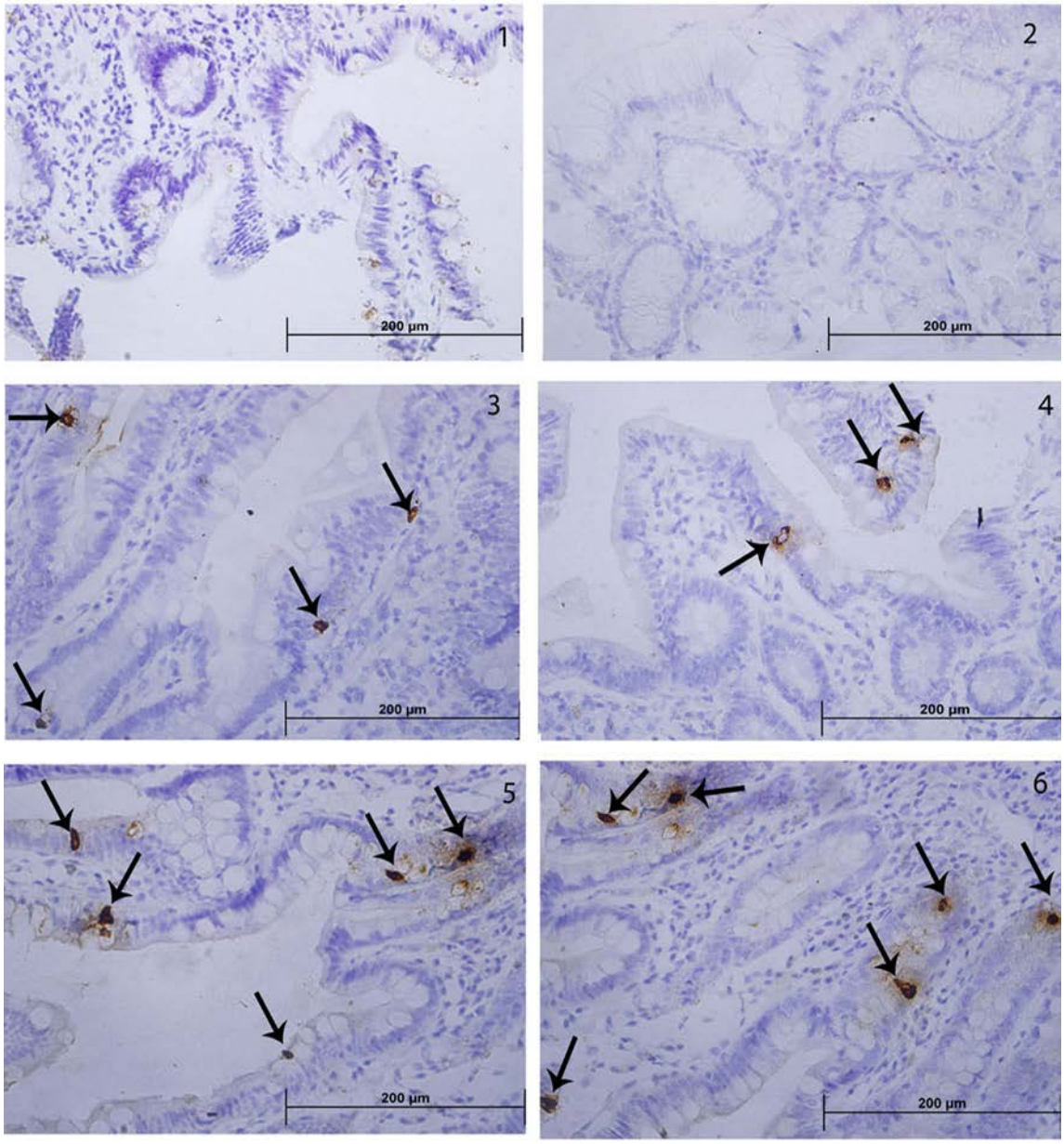

Figura 1B – Imuno marcação obtida com a utilização de anticorpo monoclonal para GLP-1 (setas), indicando possível presença de células L no epitélio do trato gastrointestinal. Observa-se ausência de células L imuno marcadas na região do fundo gástrico (imagem 1) e piloro (imagem 2). Poucas células imuno marcadas na região do jejuno (imagem 3) e íleo proximal (imagem 4). Já nas porções mais distais do íleo (imagens 5 e 6), observa-se maior frequência de células L em atividade imuno marcadas.

Tabela 3 – Número total de células L imuno marcadas por campo pelo anticorpo GLP-1 em nas condições Pré (íleo trans) e Pós(íleo) operatório .

Pacientes	Pré	Pós
1	9	12
2	7	11
3	7	10
4	7	10
5	9	9
6	8	13
7	0	9
Média	6,71	10,57

Comparação entre nº de células L nas porções do TGI para os anticorpos GLP-1

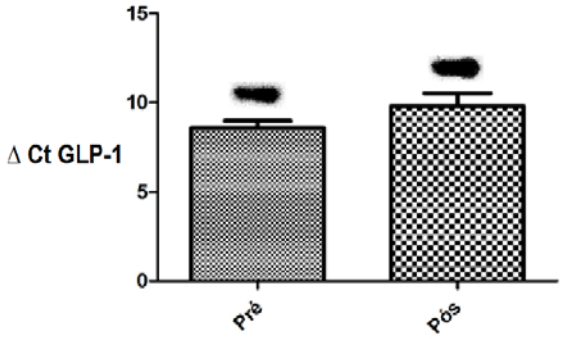

Figura 2 – Média dos valores de ΔCt referentes à expressão relativa de GLP1 nas condições pré e pós. As bandas sobre as colunas indicam a expressão gênica verificada por western blot.

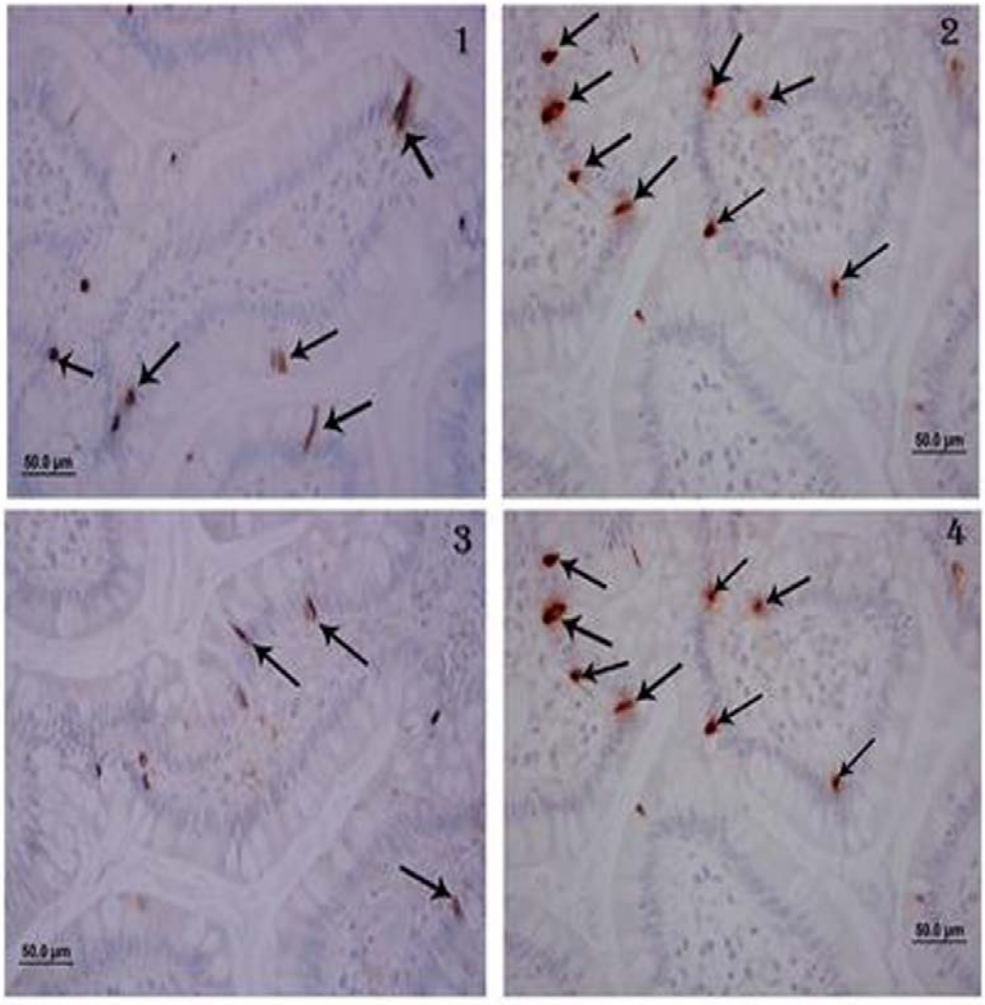

Figura 3 – Imuno marcação obtida com a utilização de anticorpo monoclonal para GLP-1 (setas), sugerindo a presença de células L no epitélio intestinal (íleo distal) . Notar o maior número de células imuno marcadas, por campo analisado, na condição pós operatória (imagens 2 e 4) quando comparado com a condição pré operatória (imagens 1 e 3) .

Tabela 4 – Número total de células L imuno marcadas por campo pelo anticorpo PYY_{3-36} em nas condições Pré (íleo trans) e Pós (íleo) operatório.

Pacientes	Pré	Pós
1	3	5
2	4	7
3	4	8
4	3	4
5	2	5
6	4	5
7	3	7
Média	3,29	5,86

Comparação entre nº de células L nas condições pré e pós com anticorpo PYY_{3-36}

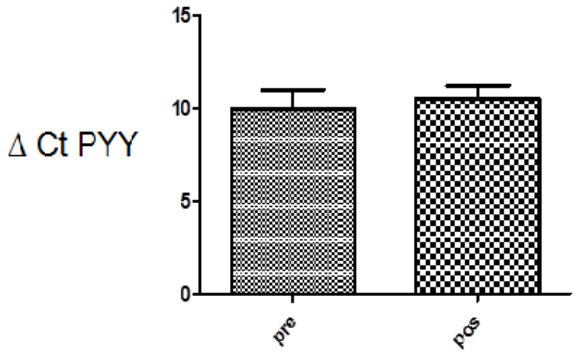

Figura 4 – Média dos valores de ΔCt referentes à expressão relativa de PYY_{3-36} nas condições pré e pós.

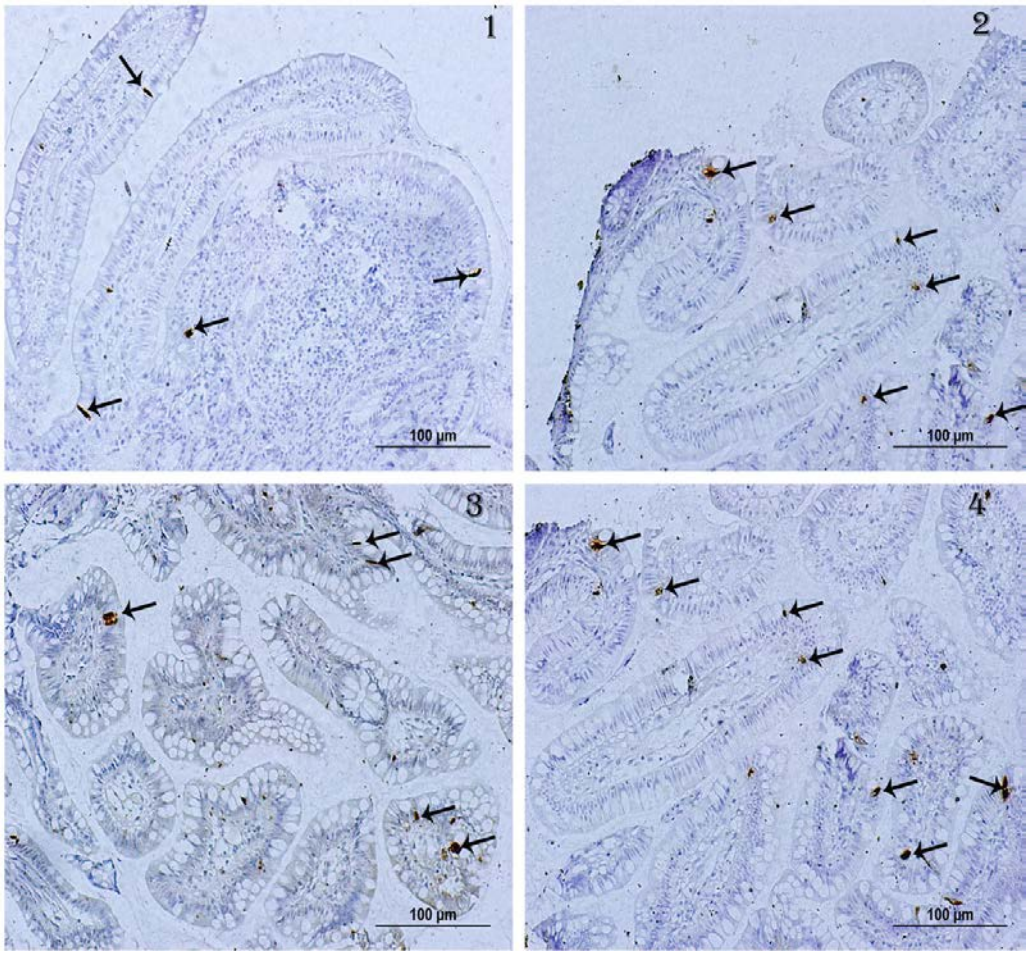

Figura 5 – Imuno marcação obtida com a utilização de anticorpo policlonal para PYY_{3-36} (setas), sugerindo a presença de células L no epitélio intestinal (íleo distal) . Notar o maior número de células imuno marcadas, por campo analisado, na condição pós operatória (imagens 2 e 4) quando comparado com a condição pré operatória (imagens 1 e 3)

Agradecimentos

Agradecemos à Fundação CAPES pelo apoio financeiro.

Referências

As referências citadas neste capítulo são apresentadas no final da dissertação no item **Referências Bibliográficas.**

Conclusões

Foi possível no presente estudo avaliar a expressão gênica das incretinas GLP1 e PYY_{3-36} e localizar células L secretoras desses enterormônios no trato gastrointestinal de pacientes DM 2 submetidos a Duodenal Switch Parcial, mediante o quadro de evolução clínica desses pacientes (anexo 6.6), deste modo:

1 - Caracterizar histologicamente amostras de biópsia do trato gastrointestinal (estômago, jejuno e íleo) em indivíduos submetidos à DSP no pré-operatório e no pós-operatório;

2 – As células L intestinais foram identificadas mediante sua atividade secretora e uma gradiente crescente de células ativas foi caracterizada ao longo do trato gastrointestinal do estômago ao íleo distal;

3 - Os ensaios de expressão gênica quantitativa e a imuno detecção das incretinas GLP-1 e PYY demonstrou expressão e secreção basal para estes genes presentes nas células L da mucosa intestinal, mesmo na ausência prolongada (12 horas) de ingestão alimentar;

4 - Os dados de expressão gênica, verificados nas mesmas condições e em jejum de 12 horas, não acusaram diferença significativa entre as condições de pré- e pós-cirurgia. Contudo, a evidência imunohistológicas acusou um pequeno aumento do número de células L ativas no pós-operatório;

5 - Os dados obtidos por exames clínicos demonstram melhora da DM2 dos pacientes no pós-operatório em relação ao pré-operatório, desse modo inferindo que a expressão basal das incretinas GLP-1 e PYY podem estar envolvidas neste cenário.

Referências Bibliográficas

ADA. Standards of Medical Care in Diabetes. **Diabetes Care**, v.29, n.1,p.5-39, 2006.

ADA. Gestational diabetes mellitus. **Diabetes Care,** v.27, n.1, p.88-90, 2004.

ANAND, S.S.; RAKAK, F.; VUKSAN, V.; GERSTEIN, H.C.; MALMBERG, K.; YI, Q.; TEO, K.K.; YUSUF, S. Diagnostic Strategies to Detect Glucose Intolerance in a Multiethnic Population. **Diabetes Care**, v.26, n.2,p.290-296, 2003.

ANDERSON, R.J.; FREEDLAND, K. E.; CLOUSE, R.E.; LUSTMAN, P.J. The prevalence of comorbid depression in adults with diabetes: a meta-analysis. **Diabetes Care**, v.24, p.1069-1078, 2001.

AUWERX, J. PPARgamma the ultimate thrifty gene. **Diabetologia**, v.42, p.1033-1049, 1999.

BAGGIO, L.L E DRUCKER. D.J. Biology of Incretins: GLP-1 and GIP. **Biology of incretins**, v.132, p.2131–2157, 2007.

BATTERHAM, R.L.; COHEN, M.A.; ELLIS, S.M.; LE ROUX, C.W.; WITHERS, D.J.; FROST, G.S; GHATEI, M.A.; BLOOM, S.R .Inhibition of food intake in obese subjects by peptide YY3-36. **The New England Journal of Medicine**, v.349, n.10, p.941–8, 2003.

BELL, G.I. The glucagon superfamily: precursor structure and gene organization. **Peptides 7,** v.1, p.27–36, 1986.

BELLISARI, A. Evolutionary origins of obesity. **Obesity Reviews**, v.9, p.165-180, 2008.

BENNER, A.; ZIRIE, M.; MUSSALLAM, M.; KHADER, Y.S.; AL-HAMAQ, A.O.A.A. Prevalence of metabolic syndrome according to Adult Treatment Panel III and International Diabetes Federation criteria: A population-based study. **Metabolic Syndrome Related Desorders**; v.7, p.221-230, 2009.

BRANCO FILHO, A. J.; NASSIF, L. S .; MENACHO, A. M .; AURICHIO, R. A. E .; SIQUEIRA, D.E.D.; FERNANDEZ, R.M. Tratamento da obesidade mórbida com gastrectomia vertical. **Arquivo Brasileiro Cirurgia Digestiva,** v.24, n.1, p.52-54, 2011.

BRUBAKER, P.L. Minireview: Update on Incretin Biology: Focus on Glucagon-Like Peptide-1. **Endocrinology**, v.151, n.5, p.1984–1989, 2010.

CAPELOZZI, V. L. Role of immunohistochemistry in the diagnosis of lung cancer. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.35, n.4, p.375-382, 2009.

CARVALHO, M.H.; COLAÇO, A.L.; FORTES, Z.B. Citocinas, Disfunção Endotelial e Resistência à Insulina. **Arquivo Brasileiro Endocrinologia Metabolismo**, v.50, n.2, p.304-312, 2006.

CASTRO JÚNIOR, M.A.M.; KRUEL, C.D.P.; MEURER.; CASTRO, A.P. Expressão imunohistoquímica de P53 e Ki-67 na carcinogênese esofágica induzida pela

dietilnitrosamina: modelo experimental. **Revista Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v.37, n.2, p.128-134, 2010.

DE FRONZO, R.A.; BONADONNA, R.C.; FERRANNINI, E. Pathogenesis of NIDDM: a balanced overview. **Diabetes Care**, v.15, p.318-6, 1992.

DE FRONZO .Pathogenesis of type 2 diabetes: metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes. **Diabetes Review**, v.5, p.177-269, 1997.

DEGEN, L. Effect of peptide YY_{3-36} on food intake in humans. **Gastroenterology**, v. 129, p.1430–1436, 2005.

DEITEL, M. The obesity epidemic. **Obesity Surgery**, v.16, p.377-378, 2006.

DRUCE, M.; BLOMM, S.R. The regulation of appetite. **The British Medical Journal: Archives of Disease in Childhood**, v.91, p.183-187, 2006.

DRUCKER, D.J.; PHILIPPE, J.; MOJSOV, S.; CHICK, W.L.; HABENER, J.F. Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line. **Proccedings of the National Academy Scienses U.S.A**. v. 84, n.10, p.3434–3438, 1987.

EGEDE, L.E.; ZHENG, D.; SIMPSON, K. Comorbid depression is associated with increased health care use and expenditures in individuals with diabetes. **Diabetes Care**, v.25, p.464-470, 2002.

EHLERS, M.R.; HARLEY, R.E.; MATHISEN, A.L.; SCHNEIDER, R.; KIPNES, M.S. 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.

EISSELE, R.; GÖKE, R.; WILLEMER, S.; HARTHUS, H.P.; VERMEER, H.; ARNOLD, R.; GÖKE, B. Glucagon-like peptide-1 cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man. **European Journal Clinical Investigation**, n.22, p. 283–291, 1992.

ELLIOTT, R.M.; MORGAN, L.M.; TREDGER, J.A.; DEACON, S.; WRIGTH, J.; MARCKS, V. Glucagon-like peptide-1 (7-36) amide and glucose-dependent insulinotropic polypeptide secretion in response to nutrient ingestion in man: acute post-prandial and 24-h secret ion patterns . **Journal Endocrinoloy**, v.138, n.1, p.159-169, 1993.

Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Clinical Diabetes**, v.22, n.2, p. 3160–3167, 2004.

FARILLA, L. Glucagon-like peptide 1 inhibits cell apoptosis and improves glucose responsiveness of freshly isolated human islets. **Endocrinology**, v.144, p.5149 –5158, 2008.

FORD, E. S. Prevalence of the metabolic syndrome defined by the International Diabetes Federation among adults in the U.S. **Diabetes Care,**v.28, p.2745-2749, 2005.

FRADKIN, J. Diabetes Clinical Trials: What Is New at NIDDK? **Clinical Diabetes**, v. 22, n.3, p.108-112, 2004.

FRIAS, J.P E EDELMAN, S.V. Current Opinion in Endocrinology. **Diabetes and Obesity**, v. 14, p.269-275, 2008.

GLAVAS, M.M.; GRAYSON, B.E.; ALLEN, S.E.; COPP, D.R.; SMITH, M.S.; COWLEY, M.A.; GROVE, K.L .Characterization of brainstem peptide YY (PYY) neurons. **Journal of Comparative Neurology**, v.506, n.2, p.194–210, 2008.

GABBE, S.G E GRAVES, C.R. Management of diabetes mellitus complicating pregnancy. **Obstetrics and Gynecology**, v.102, n.4, p.857-868, 2003.

GOMES, M.B.; NETO, D.G.; MENDONÇA, E.; TAMBASICA, M.A.; FONSECA, R.M.; RÉA, R.R.; MACEDO, G.; FILHO, J.M.; SCHIMID, H.; BITTENCOURT, A.V.; CALVACANTI, S.; RASSI, N.; FARIA, M.; PEDROSA, H.; DID, S.A E COLABORADORES. Prevalência de Sobrepeso e Obesidade em Pacientes Com Diabetes Mellitus do Tipo 2 no Brasil: Estudo Multicêntrico Nacional, **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo ,**v.50,n.1,p.136-144, 2006.

KARELIS, A. D.; PIERRE, D.H.; CONUS, F.; LHORET, R.R.; POELHMAN, E.T. Metabolic and Body Composition Factors in Subgroups of Obesity: What Do We Know? **Journal Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.89, n.6, p.2569–2575, 2004.

KATHIRESAN, S.; MELANDER, O.; GUIDUCCI, C E COLABORADORES. Six new loci associated with blood low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol or triglycerides in humans. **Nature**, v.40, n.2, p.189-197, 2008.

KIM, B. Peptide YY is secreted after oral glucose administration in a gender-specific manner. **J. Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.90, p.6665–6671, 2005.

KING, H.; AUBERT, R.E.; HERMAN, W.H. Global burden of diabetes, 1995-2025 prevalence, numerical estimates, and projections. **Diabetes Care,** v.21, n.9, p.1414-31, 1998.

KORNER, J.; BESSLER, M.; CIRILO, L.J.; CONWELL, I.M.; DAUD, A.; RESTUCCIA, N.L. Effects of Rouxen-Y gastric bypass surgery on fasting and postprandial concentrations of plasma ghrelin, peptide YY, and insulin. **Journal Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.90, p.359-65, 2005.

KREYMANN, B.; GHATEI, M.A.; WILLIAMS, G.; BLOOM, S.R. Glucagon-like peptide-1 7–36: a physiologic incretin in man. The **Lancet**, p.1300–1304,1987.

HALL, M.J E OWINGS, M.F. National Hospital Discharge Survey. **Advance Data from vital and health statistics**, v.329, 2002.

HOLST, J.J.; ORSKOV, A.C.; SCHWARTZ, T.W.; NIELSEN, O.V. Truncated glucagon-like peptide-1, an insulin-releasing hormone from the distal gut. **FEBS lettrs**, v.211, p.169–174,1987.

JORGE, G.L.; SILVEIRO, S.P.; CAMARGO, J.L.; REICHELT, A.J.; AZEVEDO, M.J. Diabetes Mellitus: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. **Arquivo Brasileiro Endocrinologia e Metabolismo**, v.46, n.1, p.16-26, 2002.

LAURIE, L.; BAGGIO, L.L.; DRUCKER,D.J. Biology of Incretins: GLP-1 and GIP **Gastroentroenterology**, v.132, p.2131–2157, 2007.

LE ROUX, C.W.; AYLWIN, S.J.B.; BATTERHAM, R.L.; BORG, C.M.; FRANCES COYLE, F.;VYAS PRASAD, V.; SANDRA SHUREY, S.;GHATEI, M.A.; PATEL, A.G.; BLOOM, S.R. Gut Hormone Profiles Following Bariatric Surgery Favor an Anorectic State, Facilitate Weight Loss, and Improve Metabolic Parameters. **Annals of Surgery**, v. 243, n.1, 2006.

LIESE, A.D.; MAYER, E.J.D.; HAFFNER, S.M. Development of the multiple metabolic syndrome: an epidemiologic perspective. **Epidemiology Review**, v.20, n.2, p.157–172,1998.

LIVAK, J.K E SCHMITTGEN, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 22DDCT Method. **Methods**, v.25; p.402–408, 2001.

LUNDBERG, J.M., TATEMOTO, K., TERENIUS, L., HELLSTROM P.M, MUTT, V., HOKFELTI, T, HAMBERGER, B. Localization of peptide YY (PYY) in gastrointestinal endocrine cells and effects on intestinal blood flow and motility. **Proccedings of National Academy Scienses U.S.A**., n.79, p. 4471-4475, 1982.

LUO, D.F.; BUI, M.M.; MUIR, A.; MACLAREN, N.K.; THOMSON, G.; SHE,J.X. Affected-Sib-Pair Mapping of a Novel Susceptibility Gene to Insulin-Dependent Diabetes Mellitus (IDDM8) on Chromosome 6q25-q27. Am. J. Hum. **The American of Journal Human Genetics**, v.57, p.911-919, 1995.

LYSSENKO, V.; LUPI, R.; MARCHETTI, P.; DEL GUERRA, S.; ORHO-MELANDER, M.;ALMGREN, P.; SJOGREN, M.;LING, C.;ERIKSSO, K.F.;LETHAGEN ,A.L .Mechanisms by which common variants in the TCF7L2 gene increase risk of type 2 diabetes. **Journal Clinical Investigation**, v.117, p.2155-2163, 2007.

MACHADO, U.F; SCHANN, B.D; SERAPHIN, P.M, 2006. Transportadores de Glicose na Síndrome Metabólica. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v.50, n.2,p.177-189, 2006.

MCCARTHY, I.M. Genomics, Type 2 Diabetes, and Obesity. **The New England Journal of Medicine**, v.363, n.24, p.2339-2350, 2010.

MELISANDE, L. A.; JAMES, S. M.; JOY, C. S.; KEISUKE, S.; TRICIA, M. T.; BENJAMIN, C. T. F.; NATACHA, G.Z.; MOHAMMAD, A. G.; STEPHEN, R. B. A Role for Metalloendopeptidases in the Breakdown of the Gut Hormone, $PYY_{3–36}$. **Endocrinology**, v.1, p.1195 – 2011, 2011.

MILLÉO, F.Q. Estudos comparativos do efeito de técnicas cirúrgicas para o tratamento da obesidade, Capella e Santoro II, sobre a trigliceridemia periférica (dissertação), 2005.

MILTON, K. The critical role played by animal source foods in Human (*Homo*) evolution. **Journal of Nutrition**, v.133, p.3886-3892, 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Saúde Brasil 2009:* uma análise da situação de saúde e agenda nacional e internacional de prioridades em saúde. Brasília/DF, 2010.

Mortensen, K.; Christensen, L.L.; Holst, J.J.; Orskov, C. GLP-1 and GIP are colocalized in a subset of endocrine cells in the small intestine. **Regulatory Peptides**, n.114, p. 189– 196, 2003.

MOTULSKY, H.J. Prism 5 Statistics Guide, GraphPad Software, 2007.

MURPHY, K.G.; BLOOM, S.R. Gut homones and the regulation of energy homeostasis. **Nature**, v.444, n.7121, p. 854–859, 2006.

NAUCK, M.A. Glucagon-like peptide 1 (GLP-1): a potent gut hormone with a possible therapeutic perspective. **Acta Diabetologica** ,n.35, p.117–129, 1998.

NEEL, J.V. 1962. Diabetes mellitus: a 'thrifty' genotype rendered detrimental by 'progress'? **American Journal of Human Genetics**, v.14, p.353–362,1962.

NESSE, R.M., STEARNS, S. C., OMENN, G.S. Medicine needs evolution. **Science**, v.13, p.311-1071, 2006.

NOGAROTO, V., SVIDNICKI, P.V., BONATTO, N., MILLÉO, F.Q., ALMEIDA, M.C., VICARI, M.R., ARTONI, R.F. New HNF-1α nonsense mutation causes maturity-onset diabetes of the young type 3. **Clinics**, v.66, n.1, p.167-168, 2011.

NONOGAKI, S.; KANAMURA, C.T.; OLIVEIRA, L.F.; MÔNICA CONTE BELA, M.C.; MENEZES,Y.; WAKAMATSU, A.; SANTOS, R.T.M.; ALVES, V.A.F. Analysis of internal and external factors potentially relevant to the diagnosis in immunohistochemistry in a public reference laboratory. **Jornal Brasileiro Patologia Médica Laboratorial**, v.43, n.4, p.297-304, 2007.

PATLAK, M .New weapons to combat an ancient disease: treating diabetes. **The FASEB Journal**, v.16, n.14,p.1853-1867, 2002.

PERMUTT, M.A.; WASSON, J.; NANCY.; COX ,N. Genetic epidemiology of diabetes. **The Journal of Clinical Investigation,** v.115, n.6, p.1431-1439, 2005.

REAVEN, G.M. Role of insulin resistance in human disease (syndrome X): and expanded definition. **Annual Review of Medice**, v.44, p.121-31, 1993.

REAVEN, G.M. Role of insulin resistance in human disease. **Diabetes**, v.37, p.1595-607, 1988.

REIS, F.A e VELHO, G. Bases Genéticas do Diabetes Mellitus Tipo 2. **Arquivo Brasileiro Endocrinologia e Metabolismo**, v.46, n.4, p.426-432, 2002.

ROTHE, K.I. Diabetes treatment-bridging the divide. **The New England Journal of Medicine**, v.356, n.15, p.1499–501, 2007.

RYAN, G.J.; HARDY, Y. Liraglutide: once-daily GLP-1 agonist for the treatment of type 2 diabetes. **Journal Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v.36, n.3, p. 260-274, 2011.

SANDHOFER, A.; IGLSEDER, B.; PAULWEBER, B.; EBENBICHLER, C.F.; PATSCH, J.R. Comparison of different definitions of the metabolic syndrome. **European Journal Clinical Investigation,** v.37, p.109-116, 2007.

SANTORO, S. Relações entre o comprimento do intestino e a obesidade. Hipótese: a síndrome do intestino longo. **Einstein**, n.1, p.46, 2003.

SANTORO, S.; MILLÉO, F.Q.; MALZONII, C.E.; KLAJNER, S.; BORGES, P.C.M.; SANTO, M.A.; CAMPOS, F.G.; ARTONI, R.F. Enterohormonal Changes After Digestive Adaptation:Five-Year Results of a Surgical Proposal to Treat Obesity and Associated Diseases. **Obesity Surgery**, v.18, p.17–26, 2008.

SCHULZ, L.O.; BENNETT, P.H .; RAVUSSIN, E .; R. KIDD, J.R.; K. KIDD, K.K.; ESPARZA, J.; VALENCIA, M.E Effects of Traditional and Western Environments on Prevalence of Type 2 Diabetes in Pima Indians in Mexico and the U.S. **Diabetes Care**, v.29, n.8, p.1866–1871, 2006.

SHAW, J. E. .; SICREE, R. A..; ZIMMET, P. Z. "Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030," **Diabetes Research and Clinical Practice**, v.87, n.1, p. 4–14, 2010.

SHOELSON, S.E.; LEE, J.; GOLDFINE, A.B. Inflammation and insulin resistance. **Journal Clinical Investigation,** v.116, n.7, p.1793–801, 2006.

SIMERLY, C.R.; MORENO, R..; RAMALHO-SANTOS, J.; HEWITSON, L. ; SCHATTEN, G. Confocal imaging of structural molecules in mammalian gametes. **Oxford University Press**, p.165-183, 2003.

SIMPSON, S. H.; CORABIAN, P.; JACOB, S.P.; JOHNSON, J.A. The cost of major comorbidity in people with diabetes mellitus. **Clinical Medicine American Journal**, v.168, p.1661-1667, 2003.

SOBNGWI, E., MAUVAIS, J.E., VEXIAU, P., MBANYA, J.C.; GAUTIER, J.F. Diabetes in Africans. Part 1: Epidemiology and Clinical Specificities. **Diabetes and Metabolism**, v.27, p.628–34, 2001.

SONG, S.H E HARDISTY, C.A. Diagnosing metabolic syndrome in type 2 diabetes: does it matter? **International Journal of Medicine**, v.10, n.10, p.487-491, 2008.

STANLEY, S.; WYNNE, K.; MCGOWAN, B.; BLOOM, S. Hormonal regulation of food intake. **Physiology Review**, n.85, p.1131-1158, 2005.

STERN, S. E.; WILLIAMS. K.; FERRANNINI. E.; DEFRONZO, R.A.; BOGARDUS,C.; STERN, M.P. Identification of individuals with insulin resistance using routine clinical measurements. **Diabetes Cares**, v.54, n.2, p.333-339, 2005.

STEARNS, S.C e KOELLA, J.C. Evolution in health and disease. **Oxford University Press Inc**, 2008.

TATEMOTO, K. Isolation and characterization of peptide YY (PYY), a candidate gut hormone that inhibits pancreatic exocrine secretion. **Proccedings National Academy Scienses USA**, v.79, p. 2514–8, 1985.

TAYLOR, I.L ."Distribution and release of peptide YY in dog measured by specific radioimmunoassay". **Gastroenterology**, v.88, n.3, p.731–7, 1985.

TAYLOR, .C R.; LEVENSON, R. M. Quantification of immunohistochemistry—issues concerning methods, utility and semi quantitative assessment II. **Histopathology**, v.49, p.411–424, 2006.

TAVARES, V .; HIRATA, M.H.; HIRATA, R.D.C. Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma Gama (PPARγ): Estudo Molecular na Homeostase da Glicose, Metabolismo de Lipídeos e Abordagem Terapêutica. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**; v.51, n.4, p.526-533, 2007.

The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus: Follow-up Report on the Diagnosis of Diabetes Mellitus. **Clinical Diabetes**, v.22, n.2, p.5-20 2004.

VELHO, G.; FROGUEL, P. Genetic, metabolic and clinical characteristics of maturity onset diabetes of the young. **European Journal Endocrinology,** v.1, n.138, p.233-239, 1998.

WAITZBERG, A.F.L.; NONOGAKI, S.; NISHIMOTO, I.N.; KOWALSKI, L.P.; MIGUEL, R.E.V.; BRENTANI, R.R.; BRENTANI, M.M. Clinical significance of *c-myc* and p53 expression in and neck squamous cell carcinomas. A.F.L. Waitzberg. **Cancer Detection and Prevention,** v.28, p.178–186, 2004.

WALKER,R.A. Quantification of immunohistochemistry—issues concerning methods, utility and semi quantitative assessment I, **Histopathology**, v.49, p.406–410;2006.

WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE, R.; KING, H .Global prevalence of diabetes: Estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v.27, p.1047-1453, 2004.

WHO. The Wold Health Report—Health systems improving performance. Genebra, 2000.

WHO/IDF. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia (Report): World Health Organization / International Diabetes Federation. 2006.

WHO/Idf. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia (Report):WORLD Health Organization/International Diabetes Federation.2009.

ZOUALI, H .; HANI. E.H.; PHILLIPI, A.; VIONNET, N.; BECKMANN, J.S.; FLORENCE DEMENAI, F.; FROGUEL, P. A susceptibility locus for early-onset non-insulin dependent (type 2) diabetes mellitus maps to chromosome 20q, proximal to the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. **Human Molecular Genetics**, v.6, n.9, p.1401–1408, 1997.

6 - Anexos

6.1 – Protocolo de Silanização de Lâminas

1. Colocar as lâminas nos bercinhos
2. Colocar os bercinhos em uma cuba e deixar passando água por 1 hora (inicia a remoção de pó e sujeira)
3. Acrescentar detergente (para desengordurar as lâminas) deixando-as de molho por cerca de 40 minutos
4. Enxaguar as lâminas e deixá-las em água corrente por 40-50 minutos
5. Lavar duas vezes em água destilada
6. Remover o excesso de água
7. Colocar os bercinhos com as lâminas dentro da estufa para secagem. A temperatura máxima deve ser de 140°C
8. Quando as lâminas estiverem secas (30 minutos), tirar da estufa e deixar esfriar a temperatura ambiente
9. Preparar as cubas para silanização:
   1° Cuba = 200 ml de acetona
   2° Cuba = 10 ml de 3-aminotrietoxisilano + 200 ml de acetona
   3° Cuba = 200 ml de acetona
10. Colocar imediatamente a 140°C por 30 minutos
11. Esperar resfriar
12. Guardar as lâminas

6.2 Soluções para ensaio de Imunohistoquímica

- SOLUÇÃO PBS 20X – SOLUÇÃO MÃE

. NaCl anidro..... 360 gramas

. Fosfato de Sódio dibásico..... 71,62 gramas

. Fosfato de Sódio monobásico .. 9,70 gramas

. Dissolvem em 2 litros de água destilada.

. Para que a solução fique límpida e totalmente homogênea aqueça a mesma no microondas na potencia média de 3 a 4 minutos.

. Ajustar o pH 7,4 (pode variar 7,2 a 7,6)

. Guardar em temperatura ambiente

- SOLUÇÃO PBS 1X - Solução de Trabalho

. Preparar 4 litros

. Medir 200 ml de solução mãe (20X) e completar com 3,8 litros de água destilada.

. Acertar sempre o pH para 7,4.

- Tampão para Recuperação Antígena:

TRIS/EDTA

. EDTA.....1,86g

. H_2Odestilada.....5L

. 2 a 2,5mL.....NaOH

. Acertar o pH para 8,0

6.3 - Protocolo Básico de Imunohistoquímica

1º Dia do Ensaio:

O processo de desparafinização:

1. Xilol I por 10 minutos.

2. Xilol II por 10 minutos.

3. Álcool absoluto (3 passagens).

4. Álcool a 90% por 30 segundos.

5. Álcool a 80% por 30 segundos.

6. Álcool a 70% por 30 segundos.

7. Álcool a 50% por 30 segundos.

8. Lavar as lâminas em água corrente e destilada.

9. Recuperação de antígenos:

- Preparar solução de citrato:

. Ácido cítrico: 4,202 g

. Água destilada: 2000 ml

Ajustar o pH em 6,0

- Transferir as lâminas para um cuba contendo os bercinhos e acrescentar os 2 litros de solução citrato.
- Levar ao microondas por 24 minutos em potência máxima (atentar que no último minuto a solução deve estar fervendo).
- Retirar do microondas e deixar as lâminas dentro da solução citrato por 20 minutos, em temperatura ambiente para resfriar o material.
- Transferir novamente as lâminas para cubinhas e lavar em água.

10. Após a recuperação de antígenos, lavar as lâminas em água corrente e destilada.

11. **Bloqueio da peroxidase endógena:** mergulhar as lâminas em H_2O_2 6% (água oxigenada 20 volumes) com 5 trocas de 5 minutos cada.

12. Lavar em água corrente e destilada (duas trocas cada).

13. Lavar com solução PBS (1x) 10mM pH 7,4 por 5 minutos.

14. Incubar as lâminas com o anticorpo diluído em tampão PBS contendo albumina bovina (BSA) 1% no título previamente estabelecido, durante 16 a 18 horas (overnight) a 4°C em câmara úmida.

PBS com BSA: 100 ml de PBS + 1 mg de albumina bovina

Homogeneizar e deixar armazenado na geladeira

Obs: para cada corte vai aproximadamente 200 μl, assim cobre-se bem o corte.

15. Deixar incubado em câmara úmida por 16 a 18 horas (overnignt) a 4°C.

2° Dia Revelação do Ensaio:

Metodologia: NovoLink Polymer Detection System

16. Lavar em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada (ou 2 trocas de 5 minutos).
17. Incubar com Bloqueador Pós-primário por 30 minutos (vem no kit).
18. Lavar em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada.
19. Incubar com NovoLink TM Polímero por 30 minutos (vem no Kit).
20. Lavar em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada.
21. Preparar a solução de trabalho de DAB.

    . Adicionar 50μl do DAB em 1 ml Tampão substrato de DAB (vem no Kit)

    . Usar dentro de seis horas após o preparo.

22. Cobrir com a solução de DAB por 5 minutos (em câmara escura - 37°C).
23. Lavar em água corrente (mais ou menos 3 minutos).
24. Contra corar com hematoxilina de Carase (já vem no kit) - 1 minuto.
25. Lavar em água corrente e destilada (5 minutos).
26. Etanol 50%, 30 segundos.
27. Etanol 80%, 30 segundos.
28. Etanol 95%, 30 segundos.
29. Etanol 100% 3 vezes, 30 segundos cada.
30. Xilol I – 3 minutos.
31. Xilol II – 3 minutos.

32. Colocação da lamínula, utilizando-se de bálsamo do Canadá.

33. Secar as lâminas em estufa.

6.4 Protocolo de RT – PCR

Curva de Eficiência : 101,6%

Concentrações: Para cada amostra a serem amplificações (PCR) foram realizadas utilizando-se os seguintes componentes:

cDNA – 5 µL (três diluições sendo: diluição 1 - 12,25ng/ µL; diluição 2 – 1,225ng/ µL; diluição 3 - 0,1225ng/ µL)
Primer Forward – 0,5µM (1 µL)
Primer Reverse – 0,5µM (1µL)
Sybr green (2x) – 12,5 µL
H2O milliQ?? – 1,5 µL
Total – 20 µL

Reação RT-PCR GLP e PYY_{3-36}

Concentrações: Para cada amostra a serem amplificações (PCR) foram realizadas utilizando-se os seguintes componentes:

cDNA –1 µL
Primer F – 0,8 mM (1 µL)
Primer R – 0,8 mM (1 µL)
Sybr – 12,5 µL
H2O milliQ – 9,9 µL
Total – 20 µL

Programa:

Amplificação(40 ciclos):

95^{o} C – 15:00

94^{o} C – 00:15 segundos
60^{o} C – 00:30 minutos* (Leitura)
72^{o} C – 00:15 segundos

Curva de dissociação (1 ciclo):

95^{o} C – 01:00 minutos
55^{o} C – 00:30 segundos
95^{o} C – 00:30 segundos

* (Leitura) : Para o PYY_{3-36} foi uma TM = 55º C

6.5 Protocolo Western Blott

1. Preparação do gel

Colocar sobre as placas o gel de separação

Acrescentar H_2O destilada até o limite da placa

Aguardar 30 minutos para polimerização do gel

Retirar a H_2O destilada vertendo a cuba

Colocar o gel de entrada sobre o gel de separação já polimerizado

Aguardar 30 minutos

2. Corrida do gel

Colocar o gel junto com as placas na cuba de corrida

Retirar o pente

Acrescentar tampão de corrida (1x) até o limite do gel

Colocar as amostras e o padrão de peso molecular

Ajustar os parâmetros de corrida na fonte:

150V, 25mA, 1h- 1gel

150V, 50mA, 2 géis

3. Transferência

30 minutos antes do término da corrida, incubar a membrana (8,5cmx5cm) por 5 segundos em metanol

Lavar em H_2O destilada

Deixar no tampão de transferência por 30 minutos

Após corrida, incubar o gel no tampão de transferência por 10 minutos

Molhar a câmara de transferência com o tampão

Montar o sanduíche (filtro-membrana-gel-filtro)

Ajustar os parâmetros de transferência:

15V, 328Ma, 1h

Após o término da transferência, corar a membrana com corante Ponceau Rouge

Descorar a membrana com água destilada para visualização das bandas

4. Bloqueio

Incubar a membrana com 2% de BSA em T-TBS ou T-PBS (0.05% tween-20 em PBS ou com leite desnatado 5%) (1.25 de leite em 25mL de T-TBS) por 1hora e 30 minutos sob agitação.

5. Incubação com anticorpo

Incubar a membrana em anticorpo 1º por 1hora e 30 minutos sob agitação ou overnight a 4ºC

Lavar com T-TBS 3 vezes POR 5 minutos cada lavagem

Incubar com o anticorpo 2º anti-IgG (de acordo com a origem do anticorpo 1º utilizado) conjugado a biotina, diluído em T-TBS (1:1000) por 1 hora sob agitação

Lavar com T-TBS 3 vezes por 5 minutos cada lavagem

Incubar com estreptavidina conjugada a peroxidase (HRP) diluída em T-TBS (1:1000) por 1 hora sob agitação

Lavar com T-TBS 3 vezes por 5 minutos cada lavagem

Obs: Ac 2º diluído 1:1000 para revelar por DAB

Ac 2º diluído 1:20.000 para revelar por ECL

Depende do tecido e do Ac 1º e 2º utilizados

6. Revelação por DAB (diaminobenzidina)

Preparar o DAB:1 pastilha (7,5 mg) em 15mL de tampão Tris-HCl 0,1M

A solução DAB deve ser mantida protegida da luz e ser preparado no momento do uso

Adicionar o DAB sobre a membrana e acrescentar alíquotas de H_2O_2 30% até o aparecimento de cor (castanho/marrom)

6.6 – TABELA DADOS CLÍNICOS DOS PACIENTES

Pacientes	Glicemia Jejum Pré (mg/dl)	Glicemia Jejum Pós (mg/dl)	Glicose Pós Prandial 2horas Pré(mg/dl)	Glicose Pós Prandial 2horas Pós(mg/dl)	HgB Pré (%)	HgB Pós (%)	IMC Pré (kg/m2)	IMC Pós (Kg/m2)	Triglice-rídeo Pré (mg/dL)	Triglice-rídeo Pós (mg/dL)	HDL Pré (mg/dl)	HDL Pós (mg/dl)
1	245	120	324	146	10	5,8	32,18	26,92	110	90	35	29
2	290	115	420	133	9,6	6,1	32,7	26,13	164	79	40	41
3	198	98	273	113	10,8	6,4	33,65	30,04	198	120	36	38
4	233	154	333	171	11,6	7	32,7	29,53	192	126	31	34
5	218	96	308	102	8,9	5,9	33,79	27,47	210	132	40	43,4
6	373	135	333	148	11,1	6,4	27,4	22,86	270	168	43,4	38
7	153	110	285	85	8,3	6,1	32,66	26,13	320	170	29	32

6.7 - Parecer 37/2010 (protocolo 07883/10) da Subcomissão de Ética em Experimentação com Seres Humanos da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

UEPG
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

PROPESP
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

COEP
COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER Nº 37/2010
Protocolo: 07883/10

Em reunião ordinária, realizada dia 27 de Maio de 2010, a Comissão de Ética em Pesquisa, **APROVOU** o protocolo de pesquisa intitulado "**Expressão de Genes Candidatos frete a Gastroenteromentectomia Adaptativa com Bipartição intestinal: Estratégia cirúrgica para o tratamento da Diabetes tipo 2 com sobrepeso ou obesidade grau 1**" de responsabilidade do pesquisador Roberto Ferreira Artoni.

Conforme Resolução CNS 196/96, solicitamos que sejam apresentados a esta Comissão, relatórios sobre andamento da pesquisa, conforme modelo (http://www.uepg.br/coep/).

Data para entrega do relatório final: Agosto de 2011

Ponta Grossa, 28 de Maio de 2010.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Prof. Dr. Ulisses Coelho
Coordenador

Av. Carlos Cavalcanti, 4748 - CEP: 84030-900 – Ponta Grossa - PR – BRASIL
Bloco M Sala 12 - Campus Universitário em Uvaranas
Fone (42) 3220-3108 – Fax: (42) 3220-3102
e-mail: seccoep@uepg.br Home page: www.uepg.br

6.8 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (T.C.L.E.) para os Pacientes segundo a Comissão de Ética em Experimentação com Seres Humanos da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

UEPG
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (T.C.L.E.)

PESQUISA COM SERES HUMANOS

Eu, _____, original da cidade de _____, Estado ___, nascido (a) no dia/mês/ano _____, portador (a) do documento de identidade número _____, C.P.F número _____, residente à Rua_____, número ____, complemento _____, no Bairro _____, localizado no município de _____, Estado ___, concordo com a minha participação no projeto de pesquisa intitulado "***Expressão de Genes Candidatos frente a Gastroenteromentectomia Adaptativa com Bipartição intestinal: Estratégia cirúrgica para o tratamento da Diabetes tipo 2 com sobrepeso ou obesidade grau I***" à realizar-se na Universidade Estadual de Ponta Grossa, no Laboratório M40 e nas dependências do Hospital Vicentino, sob supervisão do Dr. Roberto Ferreira Artoni (42-3220-3739) e Dr. Fábio Quirillo Milléo (42-3222-9444), respectivamente.

Declaro que estou sob tratamento médico para a diabetes tipo 2 e também para os elevados níveis de triglicérides e/ou colesterol no sangue, e que sei que são importantes fatores de risco para minha saúde. Fui informado(a) sobre o recente desenvolvimento de nova técnica (Adaptação Digestiva) para o tratamento para a obesidade e que estas técnicas podem causar melhora acentuada do diabetes e da dislipidemia. Fui informado(a) ainda que a referida técnica, consiste na retirada de parte do estômago, parte do intestino delgado e da gordura do omento maior e se destina a ao tratamento da Diabetes tipo 2 e suas complicações. Fui igualmente informado(a) que, ainda mais recentemente, esta técnica foi modificada, tendo havido a diminuição da intervenção no estômago, para reduzir seu potencial emagrecedor e poder ser aplicada para diabéticos que não apresentam obesidade mórbida ou que não desejam restrições alimentares.

Estando cansado do tratamento medicamentoso e dietético, decidi submeter-me à referida técnica, com o intuito de melhorar meu perfil metabólico. Houve o esclarecimento de que se trata de técnica recente e com a qual não há experiência de longo prazo.

Estou ciente que a cirurgia que ora me proponho a fazer não é o procedimento habitual nem consagrado, mas uma técnica em fase inicial que visa melhorar o perfil metabólico dos pacientes (diabetes, dislipidemias e suas conseqüências).

Minha cirurgia consistirá da retirada de uma parte do intestino delgado (enterectomia parcial), deixando dimensões residuais ainda dentro dos limites da normalidade (3 metros), e da retirada da gordura do omento maior.

Fui informado(a) que a conformação geral do tubo digestivo sofrerá apenas uma redução proporcionada de dimensões. Todos os procedimentos (gastrectomia vertical, retirada da gordura do omento ou omentectomia e retirada de parte do intestino delgado ou enterectomia) são procedimentos bem conhecidos isoladamente.

Em busca de melhores resultados que os oferecidos por tratamentos consagrados, busco um procedimento sabidamente recente e assim compreendo que assumo riscos adicionais advindos da ausência de experiência consolidada. Nestes casos, o Hospital tem por responsabilidade apenas a boa execução dos procedimentos hospitalares, respeitando as orientações médicas, e não pela escolha da técnica ou método.

Fui igualmente esclarecido(a) que, esta como todas as cirurgias, tem riscos. Neste caso, os riscos incluem infecção, tromboses, embolias, deiscências e fístulas.

Fui esclarecido(a) do que significam os termos deste consentimento e tive todas minhas demais perguntas respondidas atenciosamente.

Estou ciente ainda de que todo o material coletado no pré e no pós-operatório servirão ao propósito da análise de expressão de genes relacionados ao diabetes e a síndrome metabólica, como objeto de estudo e como tal poderão ser publicados e divulgados no meio científico.

Os resultados destes trabalhos poderão ser apresentados à comunidade científica em geral, respeitando toda a informação adquirida que será tratada como confidencial pelos pesquisadores. Apenas pacientes voluntários serão incluídos como participantes deste estudo, no qual qualquer tipo de identificação pessoal será mantida sob sigilo e não constará em nenhum relatório ou publicação científicos ou estará disponível a terceiros (seguradoras, empregadores). Os procedimentos e tratamentos específicos, quando

identificadas qualquer alteração genética, não trarão ônus nenhum aos pacientes participantes deste estudo.

Estou ciente ainda de que posso me recusar a participar do estudo, ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que haja penalização alguma ou prejuízo ao meu tratamento. Da mesma forma, não haverá qualquer dano e, que em caso de reclamação, ou recurso poderei entrar em contato com a secretaria da Comissão de Ética em Pesquisa, pelo telefone (42) 3220-3108, Av. Gen. Carlos Cavalcanti, n º 4748, Cep-84030-900, Bloco M, Sala 12, e-mail: coep@uepg.br.

Li, portanto, este termo, fui orientado (a) quanto ao teor da pesquisa acima mencionada e concordo voluntariamente em participar desta pesquisa, sabendo que não receberei nenhum valor econômico por minha participação.

_____ _____

Voluntário (a) Dr. Roberto Ferreira Artoni

(Pesquisador responsável)

_____

Dr. Fábio Quirillo Milléo

(Clínico responsável)

Ponta Grossa, ____ de_____ de 20___.