

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**Estudo da expressão de mRNA, síntese e liberação de GIP e GLP-1 no jejuno de indivíduos obesos grau III, diabéticos e não diabéticos, sua modulação por ácidos graxos monoinsaturados e envolvimento de marcadores inflamatórios**

**Francieli Rohden**

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dra. Regina Maria Vieira Da Costa Guaragna**

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas - Bioquímica, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção de grau de Doutora em Ciências Biológicas: Bioquímica.

Porto Alegre

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

Estudo da expressão de mRNA, síntese e liberação de GIP e GLP-1 no jejuno de indivíduos obesos grau III, diabéticos e não diabéticos, sua modulação por ácidos graxos monoinsaturados e envolvimento de marcadores inflamatórios

**FRANCIELI ROHDEN**

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Regina Maria Vieira da Costa Guaragna

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Bioquímica, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção de grau de Doutora em Ciências Biológicas: Bioquímica.

Porto Alegre

2015

**Estudo da expressão de mRNA, síntese e liberação de GIP e GLP-1 no jejuno de indivíduos obesos grau III, diabéticos e não diabéticos, sua modulação por ácidos graxos monoinsaturados e envolvimento de marcadores inflamatórios**

**Francieli Rohden**

Membros da Banca Examinadora:

Dr. Janice Carneiro Coelho, Relatora  
Programa de Pós-Graduação: Bioquímica. ICBS/UFRGS

Dr. Paulo Ivo Homem de Bittencourt Júnior  
Programa de Pós-Graduação: Fisiologia. ICBS/UFRGS

Dr. Maurício Reis Bogo  
Laboratório de Biologia Genômica e Molecular. Faculdade de Biociências. PUCRS

Suplentes:

Dr. Fátima T. R. Guma. Programa de Pós-Graduação: Bioquímica. ICBS/UFRGS

Dr. Jussara C. de Almeida. Faculdade de Medicina. UFRGS.

Porto Alegre

2015

*"A vida sem ciência é uma espécie de morte."  
Sócrates*

## AGRADECIMENTOS

A Professora Regina, pela oportunidade, confiança e orientação.

A Professora Fátima pelos ensinamentos, carinho e interesse.

Ao Professor Diogo Souza pela disponibilidade para com todos, sempre.

Aos membros da banca por aceitarem avaliar esse trabalho.

Aos Dr. Cláudio C. Mottin e Dr. Alexandre Padoin pelas amostras de tecido e pela disponibilidade em sanar as dúvidas que surgiram durante o trabalho.

Aos voluntários que aceitaram participar do trabalho.

A Rejane e equipe do COM sempre dispostos a colaborar e a Noris pela coleta do sangue.

A Cléia pela paciência e auxílio, sempre com muito carinho.

As amigas do laboratório 25, do qual sou anexo, agradeço a amizade de vocês.

Aos amigos que fiz no CME, obrigada por tudo.

Aos amigos do laboratório 21, pelo carinho, compreensão, risadas, choros, discussões (científicas ou não), pelo chimarrão e por segurarem a minha mão e me doarem seus ombros sempre que precisei.

A minha irmã porto-alegrense: Luciana Calabro, pela amizade e por todo o carinho.

Aos meus:

A minha tia Edigna, ao Max, ao Carlito, a Carmen, ao Tefo e a Luiza por serem um pouco da nossa família aqui em Porto Alegre.

Ao Jeferson, por estar ao meu lado nessa reta final.

Mãe Clélia, pai Inácio, irmã Marieli, cunhado Jackson, sobrinhos Pedro e Leonardo, obrigada por TUDO, apoio emocional e muitas vezes financeiro.

Ao Julio, meu filho, pelo carinho, compreensão apoio nas horas que eu estava pensando em desistir, por ser meu companheiro sempre, em qualquer situação! OBRIGADA MAIS QUE ESPECIAL PARA VOCÊ... EU TE AMO!

MUITO OBRIGADA!

## APRESENTAÇÃO

Esta tese será apresentada no formato de artigos científicos e organizada da seguinte forma:

### PARTE I

Resumo

Abstract.

Lista de abreviaturas.

Introdução contendo uma revisão bibliográfica sobre os aspectos que fundamentam este trabalho.

Objetivo geral e objetivos específicos do trabalho.

### PARTE II

Capítulo 1, Artigo publicado.

Capítulo 2, Manuscrito submetido.

Capítulo 3, Outros resultados.

### PARTE III

Discussão, contendo interpretação geral dos resultados apresentados nos três capítulos.

Conclusões finais.

Perspectivas.

### REFERÊNCIAS

Referências citadas na parte I e III, bem como as do capítulo 3.

### ANEXOS

## SUMÁRIO

<b>PARTE I</b> .....	VII
RESUMO.....	VIII
ABSTRACT.....	IX
LISTA DE ABREVIATURAS.....	X
<b>1 OBESIDADE</b> .....	11
<b>2 CIRURGIA BARIÁTRICA</b> .....	13
2.1 CIRURGIA BARIÁTRICA E DIABETES.....	15
<b>3 O QUE SÃO INCRETINAS</b> .....	20
3.1 PEPTÍDEO INSULINOTRÓPICO DEPENDENTE GLICOSE - GIP.....	21
3.2 PEPTÍDEO SEMELHANTE AO GLUCAGON - GLP-1.....	23
3.3 PROHORMÔNIO CONVERTASE 1/3 - PC1/3 e DIPEPDIDIL PEPTIDASE-IV - DPP-IV.....	25
<b>4 PROCESSO INFLAMATÓRIO - NF-<math>\kappa</math>B</b> .....	28
<b>5 RECEPTORES ATIVADOS POR PROLIFERADOR DE PEROXISSOMO- GAMA - PPAR-<math>\gamma</math></b> .....	30
<b>6 ÁCIDOS GRAXOS</b> .....	32
6.1 ÁCIDO OLEICO.....	33
6.2 ÁCIDO VACCÊNICO.....	35
6.3 ÁCIDO ELAIDICO.....	36
<b>7 S100B (S100 calcium binding protein B)</b> .....	39
<b>8 JUSTIFICATIVA</b> .....	41
<b>9 OBJETIVOS</b> .....	43
9.1 OBJETIVO GERAL.....	43
9.1.1 <b>Objetivo específico - Capítulo I</b> .....	43
9.1.2 <b>Objetivo específico - Capítulo II</b> .....	44
9.1.3 <b>Objetivo específico - Capítulo III</b> .....	44
<b>PARTE II</b> .....	45
Capítulo I.....	46
Capítulo II.....	54
Capítulo III.....	88
<b>PARTE III</b> .....	94
<b>10 DISCUSSÃO</b> .....	95
<b>11 CONCLUSÃO</b> .....	112
REFERÊNCIAS.....	114
ANEXOS.....	124

## **PARTE I**



## RESUMO

A obesidade juntamente com suas comorbidades vem aumentando em números assustadores. A cirurgia bariátrica associada com a qualidade dos alimentos consumidos é a mais eficaz opção para o tratamento da obesidade e as suas complicações, especialmente o diabetes tipo 2. O excesso de tecido adiposo pode desencadear uma inflamação crônica e sistêmica, ocasionando disfunção dos tecidos, entre eles o mesentérico, responsável por alojar diversas células secretoras de fatores que influenciam no metabolismo da glicose. **Objetivos:** O objetivo deste estudo foi investigar a expressão do RNA mensageiro (mRNA) de proglucagon, peptídeo insulínico dependente de glicose (GIP), prohormônio convertase 1/3 (PC1/3), e dipeptidil peptidase-IV (DPP-IV) em células jejuno de obesos mórbidos (OB) não diabéticos do tipo 2 diabetes (NDM2) e diabéticos tipo 2 (DM2), para determinar a base molecular da secreção das incretinas após a cirurgia bariátrica. Além disso, objetivamos avaliar os efeitos *in vitro* de MUFAs sobre a expressão do mRNA, imunoconteúdo e secreção de incretinas, bem como a relação entre a expressão de PPAR- $\gamma$  e NF- $\kappa$ B em células intestinais de pacientes obesos submetidos a cirurgia bariátrica. E com objetivo de identificar um biomarcador para DM2, dosamos níveis de S100B sanguíneo em indivíduos não obesos (NOB) NDM2 ou DM2, OB NDM2 ou DM2. **Métodos:** As amostras de mucosa do jejuno foram obtidas dos pacientes OB submetidos à cirurgia bariátrica. Pacientes NDM2: retirada de uma secção do jejuno a 60 centímetros distais ao ligamento de Treitz; e DM2: remoção de uma secção do jejuno a cerca de 100 cm distais ao ligamento de Treitz. A mucosa do jejuno foi analisada com ou sem tratamento com ácidos graxos oléico, elaidico ou vaccênico (50  $\mu$ M). O RNA total foi extraído usando Trizol. Foi realizada a quantificação por PCR em tempo real (RT-qPCR). As amostras foram sequenciadas para PC1/3 pela ACTGene Análises Moleculares Ltda. O imunoconteúdo de GIP e de peptídeo semelhante a glucagon-1 (GLP-1) foi quantificado em microscópio de fluorescência. A secreção de GIP, GLP-1 e S100B foi quantificada pela técnica de ELISA, utilizando KIT específico. **Resultados:** DM2 apresentaram diminuição na expressão PC1 / 3 mRNA (primer a,  $p = 0,014$ ; primer b,  $p = 0,048$ ). 36,5% não transcreveram o mRNA de PC1/3. NDM2 e indivíduos DM2 não mostraram significativa diferença na expressão do mRNA de proglucagon, GIP e DPP-IV. O imunoconteúdo de GLP-1 e GIP se encontraram diminuído em DM2, mas incubação com alta concentração de glicose estimulou esses depósitos. Nas incubações, ácido vaccênico estimulou a expressão de mRNA de GIP e proglucagon no jejuno de obesos NDM2 ( $p = 0,041$ ;  $p = 0,041$  respectivamente) e proglucagon em DM2 ( $p = 0,02$ ). O ácido oléico regulou negativamente a expressão de mRNA de DPP-IV em obesos NDM2 ( $p = 0,045$ ). Vaccênico aumentou significativamente o imuno conteúdo de GLP-1, mas não aumentou a sua secreção. Expressão basal de mRNA do PPAR- $\gamma$  foi baixa no jejuno dos OB DM2 e não foi modulada após tratamento com os ácidos graxos. DM2 apresentou aumento da relação de NF- $\kappa$ B/PPAR- $\gamma$  no jejuno. S100B se mostrou elevada nos pacientes NOB e OB DM2, comparando com os outros grupos. **Conclusões:** Os resultados sugerem que a bioativação de pro-GIP e proglucagon poderia estar prejudicada pela baixa expressão do mRNA de PC1/3 em células do jejuno de pacientes OB DM2. No entanto, após a cirurgia, altas concentrações de glicose nesta região do jejuno podem ativar este sistema. Os DM2 apresentaram um estado pró-inflamatório no jejuno indicado pelo aumento da razão NF- $\kappa$ B/ PPAR- $\gamma$ . Este efeito foi aumentado após tratamento com ácido vaccênico. Também este ácido graxo aumentou a quantidade intracelular de GLP-1, mas não estimulou a sua secreção. Diante dos resultados, sugerimos que a S100B seja mais investigada como um biomarcador para DM2.

## ABSTRACT

Obesity along with its comorbidities is increasing in alarming numbers. Bariatric surgery associated with the quality of food consumed is the most effective option for the treatment of obesity and complications thereof, especially diabetes type 2. Excess adipose tissue may trigger a chronic and systemic inflammation, causing dysfunction of tissues, including the mesenteric, responsible for housing various cells secreting factors that influence the metabolism of glucose. **Objectives:** The aim of this study was to investigate the expression of messenger RNA (mRNA) of proglucagon, glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP), prohormone convertase 1/3 (PC1/3), and dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV) in jejunal cells morbidly obese (OB) non-diabetic type 2 (NDM2) and type 2 diabetes (DM2), to determine the molecular basis of secretion of incretins after bariatric surgery. Furthermore, we aimed to assess the *in vitro* effects of MUFA on mRNA expression, and secretion of incretins immunoreactive as well as the relationship between the expression of PPAR- $\gamma$  and NF- $\kappa$ B in intestinal cells of obese patients undergoing bariatric surgery. And in order to identify a biomarker for DM2, we measured blood levels of S100B in non-obese individuals (NOB) NDM2 or DM2, OB NDM2 or DM2. **Methods:** The mucosa of the jejunum samples were obtained from patients undergoing bariatric surgery OB. Patients NDM2: removal of a section of the jejunum 60 cm distal to the ligament of Treitz; and DM2: removing a section of the jejunum approximately 100 cm distal to the ligament of Treitz. The jejunum was examined with or without treatment with fatty acids oleic, elaidic and vaccenic (50 mM). Total RNA was extracted using Trizol. Quantification by real time PCR was carried out (RT-qPCR). The samples were sequenced for PC1/3 by ACTGene Analysis Molecular Ltda. The immunoreactive GIP and glucagon-like peptide-1 (GLP-1) was quantified with a fluorescence microscope. The secretion of GIP, GLP-1 and S100B was quantified by ELISA using specific kits. **Results:** DM2 showed a decrease in PC1/3 mRNA expression (primer a,  $p = 0.014$ ; primer b,  $p = 0.048$ ). 36.5% did not transcribe mRNA PC1/3. NDM2 and DM2 subjects showed no significant difference in the expression of proglucagon mRNA, GIP and DPP-IV. The immunoreactive GLP-1 and GIP were decreased in DM2, but incubation with high glucose stimulated these deposits. All incubations with vaccenic acid stimulated GIP and proglucagon mRNA expression in jejunum NDM2 obese ( $p = 0.041$ ;  $p = 0.041$  respectively) in proglucagon and DM2 ( $p = 0.02$ ). Oleic acid negatively regulated DPP-IV expression of mRNA in obese NDM2 ( $p = 0.045$ ). Vaccenic significantly increased immune content of GLP-1, but did not increase secretion. Basal expression of PPAR- $\gamma$  mRNA was low in the jejunum of DM2 and is not modulated after treatment with fatty acids. DM2 presented an increase in NF- $\kappa$ B / PPAR- $\gamma$  in the jejunum. S100B showed high levels in NOB and OB DM2 patient compared to the other groups. **Conclusions:** The results suggest that the bioactivation of proglucagon and GIP could be hampered by the low mRNA expression of PC1/3 cells in the jejunum of obese T2DM patients. However, after surgery, glucose concentrations in this high jejunal region can activate this system. The DM2 showed a pro-inflammatory state in the jejunum indicated by increased levels of NF- $\kappa$ B/PPAR- $\gamma$ . This effect was increased after treatment with vaccenic acid. Also this fatty acid increased the intracellular amount of GLP-1, but did not stimulate secretion. Therefore, the results suggest that S100B is further investigated as a biomarker for DM2.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AG	Ácido Graxo
AGCL	Ácido Graxo de Cadeia Longa
AGT	Ácido Graxo <i>Trans</i>
AGTI	Ácido Graxo <i>Trans</i> Industrial
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementar
DM2	Diabetes Mellitus do Tipo 2
DPP-IV	Dipeptidil Peptidase - IV
EL	Ácido Elaidico
GIP	Peptídeo Insulitrófico Dependente de Glicose
GLP-1	Peptídeo Semelhante a Glucagon-1
IMC	Índice de Massa Corporal
MUFA	Ácido Graxo Monoinsaturado
NCGE	Neurônios e Células Gliais Entéricas
NDM2	Não Diabetes Mellitus do tipo 2
NFκ-B	Fator Nuclear <i>kappa</i> B
NOB	Não Obeso
OB	Obesos
OL	Ácido Oleico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PC1/3	Prohormonio Convertase 1/3
PCKS1	Gene da PC1/3
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PUFA	Ácido Graxo Poliinsaturado
RAGE	Receptores de Produtos de Glicação Avançada
RYGB	Roux-em-Y gastric bypass
SM	Síndrome Metabólica
SNC	Sistema Nervoso Central
SNE	Sistema Nervoso Entérico
SNP	Polimorfismos de um único nucleotídeo
SUS	Sistema Único de Saúde
TAM	Tecido Adiposo Mesentérico
VA	Ácido Vaccênico

## 1 OBESIDADE

A Organização Mundial da Saúde (OMS) alerta que a obesidade continua a aumentar em números alarmantes no planeta, e prevê que 2,3 bilhões de adultos no mundo todo estarão com sobrepeso e 700 milhões serão obesos em 2015 (WORLD, 2008).

A obesidade é caracterizada pelo acúmulo anormal ou excessivo de gordura no organismo, e comumente classificada em adultos por um índice simples: índice de massa corporal (IMC), que é definido pelo peso em quilos dividido pelo quadrado da sua altura ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ). Para a OMS quando o IMC é maior ou igual a  $30 \text{ kg}/\text{m}^2$  o indivíduo é classificado como obeso. Esse índice é utilizado para ambos os sexos e para todas as idades dos adultos (acima de 20 anos). No entanto, devem ser consideradas as peculiaridades de cada indivíduo (WORLD, 2012).

O sobrepeso e a obesidade são o quinto fator para risco das mortes globais. Pelo menos 2,8 milhões de adultos morrem a cada ano como resultado de excesso de peso ou obesidade. Além disso, 44 % dos casos de diabetes, 23% das doenças isquêmicas do coração e entre 7% e 41% de determinados cânceres são atribuídos ao excesso de peso e obesidade. Em 2008, mais de 1,4 bilhões de adultos (20 anos ou mais), estavam acima do peso, sendo que aproximados 200 milhões de homens e quase 300 milhões de mulheres eram obesos. No geral, mais de 10% da população adulta do mundo era obeso. No ano de 2011 tivemos um dado assustador, mais de 40 milhões de crianças, menores de cinco anos, estavam acima do peso, e dessas 30 milhões estão em países em desenvolvimento. A obesidade vem matando mais pessoas que a subnutrição (WORLD, 2012).

Uma das principais causas do aumento da taxa de obesidade é o desequilíbrio energético: são consumidas muito mais calorias do que são gastas. O desenvolvimento mundial, fez com que o estilo de vida das pessoas mudasse, por exemplo, como aumento da

ingestão de alimentos altamente energéticos, ricos em gorduras, produtos industrializados e *fast foods*, juntamente com o elevado sedentarismo por alterações nas formas de trabalho, modos de locomoção e o aumento da urbanização (ATANASOVA *et al*, 2012; SUZUKI *et al*, 2010).

De acordo com o NIH Consensus Development Conference 1991, em discussão sobre a cirurgia bariátrica, (GASTROINTESTINAL, 1992) foi adotada a premissa de que pacientes com um IMC  $\geq 40$  kg/m<sup>2</sup> ou aqueles com IMC  $\geq 35$  kg/m<sup>2</sup> que apresentam comorbidades graves, como doenças cardiopulmonares ou diabetes mellitus do tipo 2 (DM2), podem ser considerados candidatos cirúrgicos. Pinheiro e colaboradores (2012), afirmam que os pacientes DM2 têm dificuldade em aderir efetivamente os programas de redução de peso para melhora dos níveis glicêmicos, desta forma, visto os resultados promissores da cirurgia bariátrica para a melhora do DM2, esta seria uma alternativa para esses indivíduos.

No Brasil, houve um aumento significativo no número de cirurgias bariátricas financiadas pelo sistema público de saúde (Sistema Único de Saúde - SUS), de 63 procedimentos no ano de 2000, passou para 2.500 em 2006. Os números aumentaram assustadoramente em 2011, quando foram realizados 65.000 procedimentos bariátricos; a segunda mais alta contagem anual no mundo (BUCHWALS & OIEN, 2013). Em 2009, foi relatado que 77,1% dos indivíduos brasileiros com obesidade extrema tinham síndrome metabólica, sem dúvida, o processo inflamatório mais importante relacionado à obesidade (MONTEIRO JÚNIOR, 2009). Netto e colaboradores (2014) sugerem que o procedimento cirúrgico foi eficaz na redução precoce do estado pró-inflamatório em indivíduos com obesidade extrema. Hoje, o tratamento mais efetivo para a perda de peso e também para a melhora dos parâmetros bioquímicos, melhorando a síndrome metabólica em indivíduos obesos é a cirurgia bariátrica.

## 2 CIRURGIA BARIÁTRICA

A cirurgia bariátrica, conhecida também como cirurgia da obesidade e cirurgia de redução do estômago, tem por objetivo, reduzir o peso do paciente no qual a atividade física e dietas restritivas não são eficazes. Dado o fato de que todas as tentativas não-cirúrgicas na redução de peso têm procurado limitar ou reduzir a ingestão calórica, é interessante notar que as primeiras tentativas cirúrgicas focavam a má absorção e não a restrição calórica.

Hoje todos os procedimentos bariátricos podem ser categorizados como restritivos, mal-absortivos, ou uma combinação dos dois. Os procedimentos restritivos limitam o tamanho do estômago e, por conseguinte, reduzem a ingestão de alimentos. Procedimentos mal-absortivos reduzem a capacidade de absorção de nutrientes do intestino delgado por desviar 95% do estômago, todo o duodeno e uma porção do jejuno, entretanto os nutrientes podem ser absorvidos na porção remanescente do intestino delgado onde agora acontece a mistura da bile com o bolo alimentar. (RUBINO *et al*, 2010; ABELE & SHIKIORA, 2008).

O primeiro modelo dessa cirurgia foi realizada nos Estados Unidos, com o objetivo de redução de peso através do desvio do intestino jejuno-íleo (*bypass*), idealizado por Kremen e Liner em 1954, citado por Baker (2011) em sua revisão. Esse procedimento retirava mais de 90% de componentes do intestino delgado (jejuno e íleo), ocasionando uma má absorção intestinal, levando o paciente a evacuar altos índices de gordura (BAKER, 2011; HISTÓRIA, 2015). A partir de então muitas técnicas foram testadas para evitar os problemas decorrentes de tal intervenção. Muito comum era o paciente apresentar quadros de diarreia intensa, cálculo renal, falha hepática, entre outras reações adversas. Em 1966, foi desenvolvido o “*bypass*” gástrico, que formava uma bolsa gástrica de 50-60 mL evitando assim as complicações metabólicas e nutricionais apresentadas pelos pós operatórios dos modelos cirúrgicos anteriores (JOFFE, 1981; BAKER, 2011).

Ainda muitos estudos continuam em busca do melhor modelo para cada diferente situação metabólica. No entanto em 2004, Rubino & Marescaux, mostraram que a técnica mais eficiente e eficaz para a perda de peso era o *bypass* gástrico em Y de Roux (*Roux-en-Y gastric bypass - RYGB*). Kushner (2014) diz que essa cirurgia está entre as três mais realizadas no mundo e geralmente se adapta a maioria dos pacientes resultando numa maior e efetiva perda de peso.

A cirurgia bariátrica (gastroplastia) mais realizada no Brasil e no mundo atualmente é o *Bypass* Gástrico em Y de Roux ou Cirurgia de Fobi-Capella. . Nessa cirurgia, o estômago é reduzido a um tamanho aproximado de 30 - 40 ml, por meio da utilização de instrumentos chamados grampeadores cirúrgicos dividindo-o em dois, sendo que a maior parte é separada e não recebe mais alimento. Em seguida, o estômago reduzido é ligado diretamente ao intestino delgado (jejuno). O alimento ingerido irá assim percorrer 100 cm de jejuno (alça alimentar) para então receber as secreções digestivas vindas do restante do estômago, fígado e pâncreas (alça bilio-pancreática), na ligação entre a alça alimentar e a alça bilio-pancreática, chamada entero-anastomose. A partir daí, há mais 3 ou 4 metros de intestino pela frente, aonde ocorrerá a absorção de alimentos (alça comum). Como o trajeto do alimento é reduzido, sua absorção também diminui. Neste procedimento cirúrgico não é retirado nenhum pedaço de intestino (Figura 1) (RUBINO *et al*, 2010).

Esse modelo provoca a perda de 25-30% do peso inicial em cinco anos, juntamente com a melhora de várias comorbidades como DM2, hipertensão, apnéia do sono, dislipidemia, dando assim melhor qualidade de vida a esses indivíduos (VEST *et al*, 2013; BUCHWAL *et al*, 2004; ABELES & SHIKIORA 2008; HERRON & ROOHIPOUR, 2011).

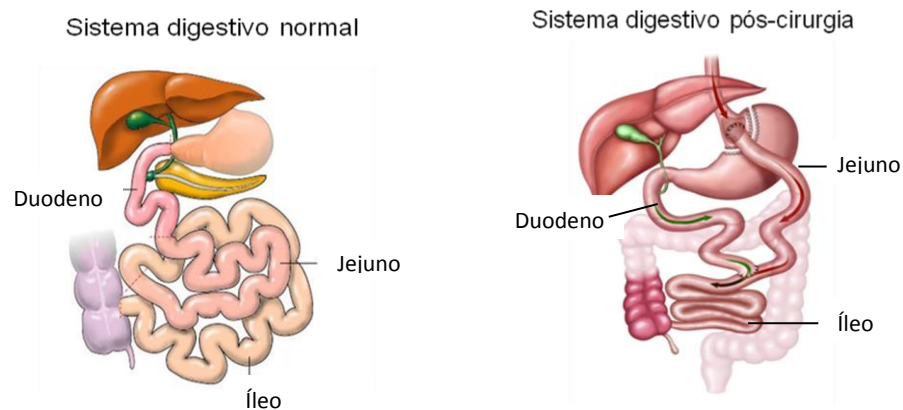


Figura 1: Ilustração mostrando que na RYGB, um grampeador cirúrgico é usado para criar uma pequena bolsa gástrica, vertical. A parte superior, que é completamente separado do remanescente gástrico, é anastomosada ao jejuno, enquanto o membro biliar excluído é anastomosado ao tubo alimentar. Após a cirurgia, alimentos ingeridos desviam cerca de 95% do estômago, todo o duodeno e uma porção do jejuno, mas a bile se mistura aos nutrientes apenas no jejuno distal e pode ser absorvida através da porção remanescente do intestino delgado. Figura adaptada do site: <http://sibleyweightloss.com/weight-loss-surgery/roux-en-y-gastric-bypass>

Evidências atuais sugerem que a cirurgia bariátrica está associada ao menor prazo para a perda de peso e indiretamente melhora nos níveis glicêmicos, comparando aos que fazem uso de medicação, quando se trata de pacientes DM2 com IMC de 30 a 35 kg/m<sup>2</sup> (MAGGARD-GIBBONS *et al*, 2013). Brethauer e colaboradores (2013), mostra que 50% dos pacientes por ele estudados, apresentaram melhora completa ou parcial por seis anos após a cirurgia. No entanto, os dados sobre o que acontece a longo prazo, os benefícios e os riscos, ainda são desconhecidos.

## 2.1 CIRURGIA BARIÁTRICA E DIABETES

O desenvolvimento da DM2 é causado pela combinação de fatores genéticos com o estilo de vida (RISÉRUS *et al*, 2009). Enquanto alguns desses fatores de risco podem ser controlados, como a dieta alimentar e a obesidade, há outros que são impossíveis de controlar, como a predisposição genética, o envelhecimento e o gênero feminino.

DM2 é uma doença caracterizada por persistentes níveis elevados de glicose sanguínea. Isso resulta da supressão prejudicada da secreção de glucagon e a resistência



adquirida pelos tecidos periféricos à insulina em resposta a ingestão de glicose (BOADA, 2012).

O músculo esquelético é o principal tecido estimulado pela insulina quando há glicose disponível, e, portanto é considerado o alvo primário nos estágios iniciais de resistência à insulina (MAHFOUZ *et al*, 2014). O declínio da função das células do pâncreas é o primeiro estágio para o desenvolvimento da DM2. Essa disfunção resulta na secreção diminuída de insulina juntamente com a insatisfatória supressão da secreção de glucagon (WEYER *et al*, 1999; BOADA, 2012) caracterizando a resistência periférica à insulina reduzindo as respostas metabólicas para a mesma.

É conhecido que indivíduos que apresentam resistência à insulina requerem mais desse hormônio circulante para promover a absorção de glicose pelos tecidos periféricos, exaurindo as células secretoras do pâncreas, desenvolvendo DM2 (BOADA, 2012). Estudos epidemiológicos indicam que aproximadamente 382 milhões de pessoas são afetadas por essa doença, no mundo, e a perspectiva é um aumento de 55% nesse número até 2035. Esses números são resultado da mudança no estilo de vida mundial, principalmente dieta e sedentarismo (GUARIGUATA *et al*, 2014).

Juntamente com o número de indivíduos DM2, a população caracterizada como obesa também tem aumentado significativamente nas últimas décadas. Na obesidade o excesso de gordura principalmente abdominal é o estopim para o desenvolvimento da resistência à insulina e conseqüentemente DM2 (PREIS *et al*, 2010; WEYER *et al*, 1999).

O excesso de tecido adiposo é responsável pela liberação de grandes quantidades e de uma variedade de adipocinas que alteram o metabolismo tecidual caracterizando um estado inflamatório, sendo que, pequenas alterações nos níveis séricos de adipocinas já são detectáveis em indivíduos pré-diabéticos (FÆRCH *et al*, 2014).

Atualmente, muitos cirurgiões bariátricos têm efetuado este procedimento para redução de peso paralelamente a remissão da diabetes. O que impulsiona a pesquisa sobre a ligação da cirurgia bariátrica com a melhora da glicemia, e a torna tão intrigante, é o fato de que se observa em pacientes obesos DM2, melhora dos níveis glicêmicos em curto prazo pós-cirurgia, antes mesmo que haja perda de peso significativa para explicar tal melhora. Estudos epidemiológicos apontam para uma média, que 80% desses pacientes deixam de fazer uso de hipoglicemiantes (MINGRONE *et al*, 2012; KASHYAP *et al*, 2013; LAFERRÈRE *et al*, 2008; RUBINO *et al*, 2010).

A eficácia do *bypass* gástrico na indução notável da perda de peso, e controle da diabetes constitui um "modelo experimental" para investigações científicas sobre os efeitos e regulação de vários hormônios gastrointestinais, bem como uma oportunidade para identificar, os mecanismos patogênicos subjacente a obesidade e DM 2 (RUBINO *et al*, 2004; LE ROUX *et al*, 2006). A cada ano surgem novas técnicas, objetivando a melhora da DM2 e outras comorbidades, bem como, a melhora os efeitos colaterais que essa mudança anatômica provoca no organismo (HERRON & ROOHIPOUR, 2011).

Muitos trabalhos mostram que há provas suficientes para se dizer que a cirurgia da obesidade é uma forma eficaz de tratamento para a DM 2, pelo menos na obesidade mórbida (RUBINO & GAGNER, 2002; RUBINO *et al*, 2010; SHUKLA *et al*, 2011; ARAÚJO *et al*, 2012; JØRGENSEN *et al*, 2012). Entretanto, pouco se sabe a respeito dos mecanismos moleculares envolvidos na melhora da diabetes.

A RYGB provoca grande mudança anatômica no trato gastrointestinal. O desvio do trânsito alimentar faz com que as células sejam estimuladas de forma diferenciada. O epitélio do trato gastrointestinal possui uma grande variedade de tipos celulares, incluindo as células enteroendócrinas, que constituem aproximadamente 1% dessa população (HARRISON *et al*, 2013; SUZUKI *et al*, 2010). O intestino delgado é um potente produtor de hormônios

envolvidos no metabolismo e sinalização orexígena e anorexígena. Trabalhos mostram que no intestino estão localizadas células enteroendócrinas secretoras de incretinas, as células K e L, respeitando um padrão de distribuição. Células K, produtoras do peptídeo insulínico dependente de glicose (GIP), se localizam em maior proporção no início do intestino delgado, do duodeno até jejuno proximal, a 60 cm do ligamento de Treitz. Já as células L são responsáveis pela secreção do peptídeo semelhante ao glucagon-1 (GLP-1), e se localizam proporcionalmente a partir dos 60 cm do ligamento de Treitz (HOLST, 2013; TAN & BLOOM, 2013). Entretanto, Rhee *et al* (2012), enfatiza que pouco se conhece sobre a distribuição dessas células endócrinas no intestino dos humanos, e muito menos sobre como o procedimento cirúrgico interfere na distribuição das células L e sua adaptação com o passar dos anos.

Atualmente se sabe que com as mudanças anatômicas provocadas pela cirurgia, o alimento é rapidamente entregue ao intestino delgado, e isso aumenta a estimulação de células L, o que resulta em aumento da secreção dos hormônios que melhoram a liberação de insulina e/ou a ação da insulina (RUBINO *et al*, 2010). Sabe-se que esse efeito imediato pós cirúrgico é um efeito hormonal, mas não está claro ainda os mecanismos moleculares envolvidos (RUBINO *et al*, 2004). É evidente que a exclusão de parte do intestino delgado no processo de digestão, é o que provoca a reversão do quadro diabético, e que o *bypass* gástrico é a técnica que promove melhoras efetivas para DM2 (HALUZÍK, 2013).

Rubino e Gagner (2002) e Rubino e colaboradores (2010) acreditam num efeito antiincretina (Figura 02) que seria bloqueado pelas mudanças anatômicas do estômago e intestino delgado. Considera que o intestino nunca foi alvo de especulações sobre a origem do DM2. Por ser o primeiro órgão a receber informações sobre a ingestão de alimentos, e ser um órgão endócrino, transmite esta informação através da secreção hormonal e da sinalização neuronal diretamente aos tecidos periféricos, assim como, para o cérebro, modulando e

controlando o metabolismo. Após uma super nutrição ocorre uma super estimulação na liberação de incretinas, acarretando conseqüentemente uma maior liberação de insulina, que com o tempo provoca disfunções neuroendócrinas. Com as mudanças anatômicas causadas pela intervenção cirúrgica, provavelmente o alimento provocaria menos estímulo sob a liberação de incretinas, o que normalizaria a secreção de insulina e isso geraria a "cura" da DM2.

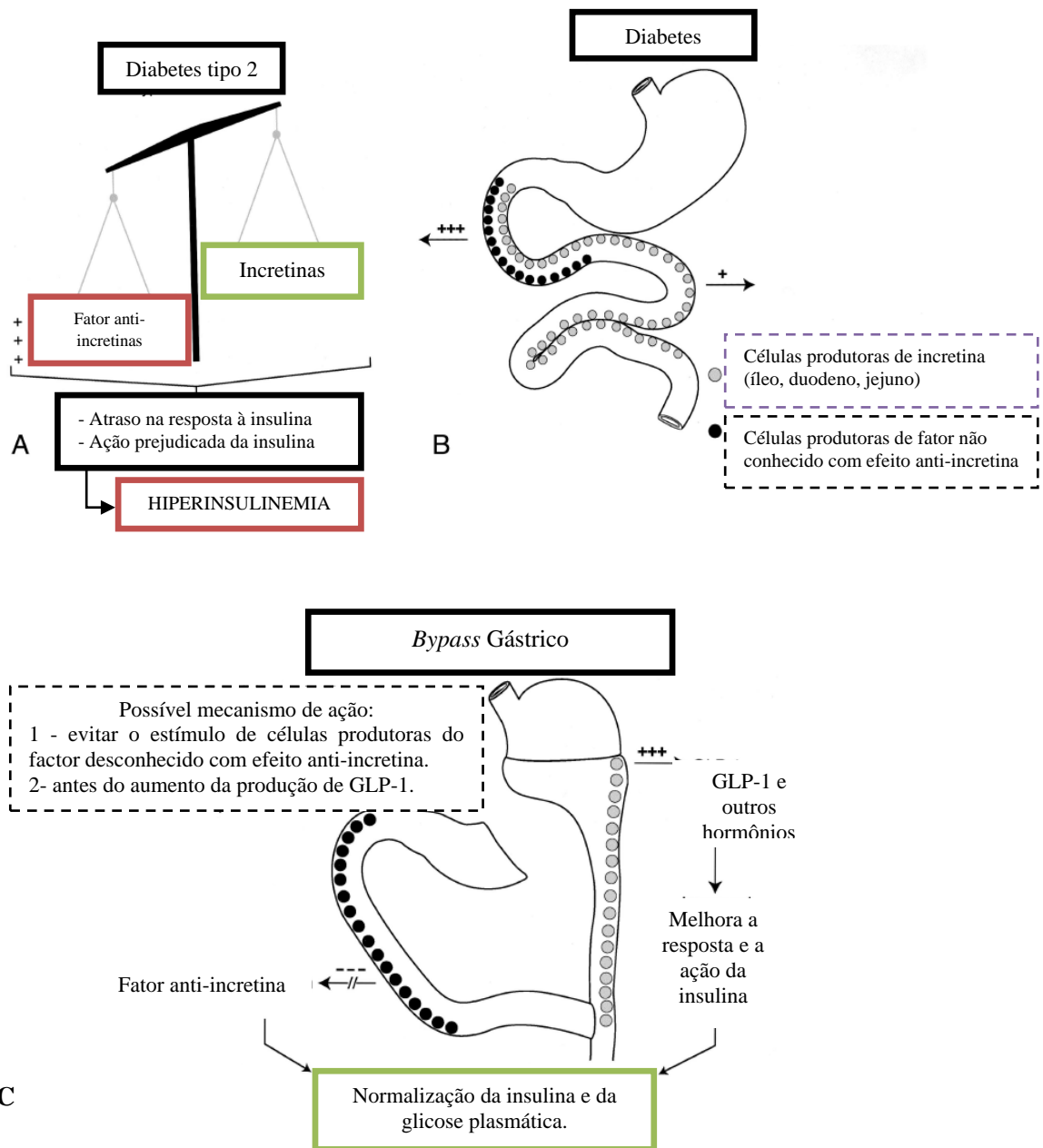


Figura 2: Especulamos que a diabetes do tipo 2 pode ser o resultado de um desequilíbrio no equilíbrio entre factores anti-incretinas e incretinas, o que eventualmente leva a resposta de insulina de ação retardada e insulina diminuída (A). Os factores anti-incretinas são produzidas em excesso provavelmente no intestino anterior proximal dos diabéticos (B). Como hipótese para o mecanismo responsável pelo controlo de diabetes após cirurgia gástrica (C). Adaptada de RUBINO *et al*, 2002.

Não descartando a hipótese "anti-incretina" de Rubino, outros trabalhos mostram que obesos diabéticos apresentam resistência a ação insulínica de GIP, no entanto eles possuem uma secreção aumentada dessa incretina comparando aos não diabéticos. Após a cirurgia os níveis de GIP foram normalizados em DM2, e em NDM2 continuaram normais (RHEE *et al*, 2012; RUBINO *et al*, 2004). GLP-1 mantém sua ação nos pacientes DM2, mas sua secreção está diminuída (BAGGIO & DRUCKER, 2007), entretanto Rhee *et al* (2012) em uma revisão literária apresenta diversos trabalhos que comprovam que após a cirurgia RYGB, o nível de GLP-1 secretado aumenta. Eles sugerem que esse aumento é reflexo das mudanças anatômicas que ocorrem no intestino, onde as células L são estimuladas diretamente pelo alimento promovendo maior secreção dessa incretina e causando um efeito anidiabetogênico, antes mesmo da perda significativa de massa corporal (RHEE *et al*, 2012).

Com esses dados, a linha mais forte de investigação tem como ponto chave o estímulo das células L, e a sua modulação pela alimentação. Sendo os pacientes OB DM2, resistentes a ação do GIP, a melhora da glicemia se daria pela exclusão do trânsito intestinal na parte onde há maior liberação dessa incretina. E o estímulo do alimento se daria diretamente na área onde estão mais presentes as células L, aumentando assim a liberação de GLP-1?

### **3 O QUE SÃO INCRETINAS?**

Incretinas são hormônios peptídicos derivados da mucosa intestinal, e quando liberados das células potencializam a liberação de insulina dependente de glicose, após a ingestão de alimentos. Em 1929, La Barre purificou um elemento que reduzia os níveis de glicose plasmática, a partir de extratos do intestino, e o nomeou: incretinas, do inglês (INtestine seCRETion INSulin). Apenas o peptídeo insulínico dependente de glicose (GIP) e o peptídeo semelhante ao glucagon-1 (GLP-1) têm mostrado ação fisiológica como

incretina. Elas são produzidas como pró-hormônios e precisam sofrer clivagem da enzima pró-hormônio convertase 1/3 (PC1/3) para se tornarem ativas (Figura 3). A ação insulinotrófica de GIP e GLP-1 é transitória, ambas são rapidamente inativadas pela ação da enzima dipeptidil-peptidase-IV (DPP-IV), que cliva a extremidade N-terminal que é eliminada pelos rins (YABE & SEINO, 2011).

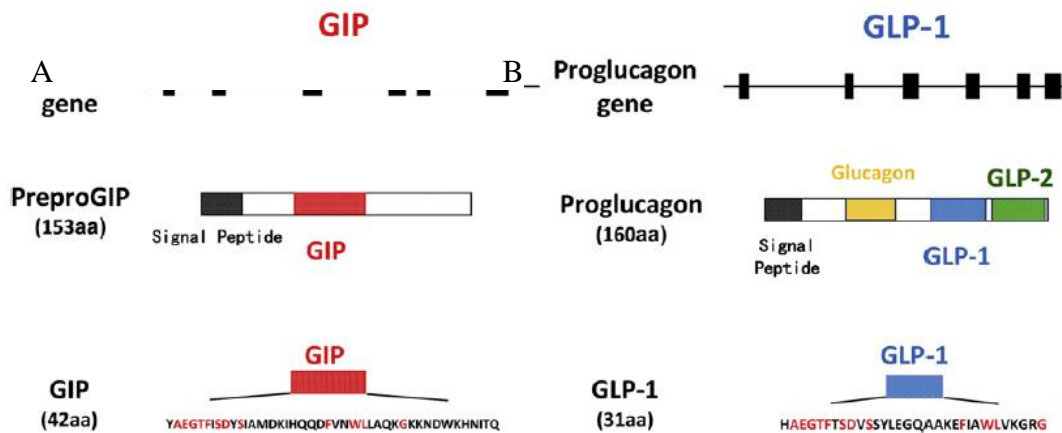


Figura 03: A) gene ProGIP, mRNA e proteína. GIP bioativo é gerado a partir de sua proteína precursora proGIP clivagem após a tradução em resíduos de arginina únicos que ladeiam GIP. B) Estrutura do gene de proglucagon, mRNA e proteína processada em tecidos específicos, no intestino, entre outros libera GLP-1. Em vermelho, semelhança entre os dois peptídeos (Figura adaptada de YABE & SEINO, 2011).

### 3.1 PEPTÍDEO INSULINOTRÓPICO DEPENDENTE GLICOSE - GIP

Em 1960, extratos da mucosa do intestino delgado superior de porcos foram utilizados como um tratamento para a diabetes. Anos mais tarde descobriu-se um polipeptídeo nomeado como "polipeptídeo inibitório gástrico (GIP)", devido ao seu efeito inibidor sobre a secreção de ácido gástrico em cães. GIP foi renomeado mais tarde "polipeptídeo insulinotrópico dependente glicose (GIP)", pois seu efeito inibitório gástrico foi considerado fraco (KIM & LEE, 2010).

GIP é sintetizado e liberado pelas células K, localizadas principalmente no duodeno e íleo. É um hormônio peptídico derivado de um grande peptídeo chamado pró-gip, um pró-

hormônio. Trabalhos comprovaram que o grande peptídeo de 153 aa sofre a clivagem, pela enzima PC1/3, liberando assim o GIP ativo com 42 aa. A sua ativação e liberação se dá através do estímulo do alimento, pela sua absorção e não pelo mero contato físico com a mucosa. Em humanos, ratos e porcos, o maior estímulo se dá pelos carboidratos (DIAKOIANNAKI *et al*, 2012). Mecanismos de sinalização intracelular de secreção GIP ainda não são claros, mas evidências incluem a ativação da adenil-ciclase, proteína quinase A (PKA) e a proteína quinase C (PKC) (CHO & KIEFFER, 2010). Xu e colaboradores (2007), mostrou em ratos hiperglicêmicos, uma diminuída expressão dos receptores para GIP, o que prejudicaria a ação insulínica dessa incretina. Em pacientes DM2, o GIP se apresenta, geralmente, com níveis elevados, embora a resposta esteja prejudicada caracterizando resistência à GIP (KIM & LEE, 2010; RASK *et al*, 2001).

As ações extrapancreáticas de GIP incluem adipogênese, proliferação de células progenitoras neurais e metabolismo ósseo (DUCKER & NAUCK, 2006). Também apresenta efeitos anabólicos diretos no tecido adiposo por estimular a importação de glicose, a síntese de ácidos graxos, a inibição da lipólise e da lipogênese. Muito se pesquisa sobre a relevância clínica ou fisiológica dessas ações extrapancreáticas em seres humanos (TAM *et al*, 2011). No entanto, Nasteska e colaboradores (2014), mostraram em ratos que a diminuição da secreção de GIP diminui a obesidade e o grau de resistência à insulina. Outro estudo também mostrou que a aplicação de GIP como um medicamento para baixar a glicemia é limitada devido à reduzida eficácia em humanos com DM2 e seus potenciais efeitos obesogênicos demonstrados por estudos com roedores. Entretanto, a redução na produção de GIP ou sua ação pode ser uma estratégia para reduzir a obesidade (CHO & KIEFFER, 2010). Segundo Spégel e colegas (2014), o GIP provoca uma diminuição nos níveis plasmáticos de aminoácidos ramificados (BCAA) e na produção de corpos cetônicos, sendo que, o aumento das concentrações destes metabolitos têm sido associadas com a obesidade e DM2.

### 3.2 PEPTÍDEO SEMELHANTE AO GLUCAGON - GLP-1

GLP-1 (Glucagon Like Peptide-1) foi a segunda incretina a ser descoberta. O gene do próglucagon codifica o glucagon e dois peptídeos que são 50% similares, e esses foram nomeados como glucagon-like peptide-1 e glucagon-like peptide-2. Com base na similaridade da sequência de aminoácidos com o glucagon, ambos os peptídeos foram testados para a atividade insulínica, mas apenas o GLP-1 foi capaz de estimular a secreção de insulina (BAGGIO & DURCKER, 2007).

O próglucagon é expresso nas células alfa pancreáticas, nas células L do intestino delgado e no trato solitário do tronco cerebral (SUZUKI *et al*, 2010). A transcrição é idêntica nos variados tipos celulares, mas o processamento pós-tradução é diferente. O GLP-1 é um produto proteolítico pós-tradução, tecido específico, do gene de próglucagon que é liberado a partir de células-L intestinais em resposta à ingestão de nutrientes, aumentando a secreção de insulina estimulada pela glicose. O processamento pós-tradução do próglucagon nas células L no sistema nervoso central libera glicetina, oximodulina, GLP-1, peptídeo de intervenção-2 e GLP-2 (KIM & LEE, 2010). O GLP-1 tem duas formas biologicamente ativas, o GLP-1(7-36) e de GLP-1 (7-37). A principal forma circulante em seres humanos é a forma de GLP-1 (7-36) (DAILEY & MORAN, 2013). Esse processamento acontece para ativar as ações de GLP-1, e a enzima necessária se chama pro-hormônio convertase 1/3, que também se localiza nas células L do intestino delgado (Figura 04).

GLP-1 é liberado em duas fases na circulação. A primeira 10 a 15 minutos após a ingestão do alimento, e a segunda 30 a 60 minutos. Este aumento instantâneo nos níveis de GLP-1 pode estar envolvido num circuito neuroendócrino. Esse eixo envolve um estímulo promovido pela chegada dos nutrientes ao estômago e duodeno, liberando o hormônio GIP, que atua através de vias vagais e estimula as células L para secretar o GLP-1. O sistema



nervoso entérico pode contribuir para este início da liberação de GLP-1 após uma refeição. O segundo pico de liberação é mais tardio e mais longo, acredita-se que esse seja estimulado pelo contato direto do alimento com as células L intestinais. Assim, os nutrientes no trato gastrointestinal têm a capacidade de estimular o GLP-1 diretamente e indiretamente através de mecanismos hormonais e neurais. No entanto, o GLP-1 é rapidamente degradado, após aproximadamente dois minutos de ação plasmática, pela enzima dipeptidil-peptidase- IV (DPP-IV) (DAILEY & MORAN, 2013; SUZUKI *et al*, 2010).

Em muitos indivíduos DM2 ou resistentes à insulina é observado que os níveis de GLP-1 estão diminuídos (KIM & LEE, 2010). Mas, Jacobsen e colaboradores (2012) mostra que após duas semanas de pós-operatório, existe um aumento considerável nos níveis de GLP-1 em resposta ao estímulo da glicose e uma refeição mista, tendo como reflexo melhora na sensibilidade à insulina. Salinari e seus colegas, 2014 encontraram resultados semelhantes em ratos diabéticos, mostrando o controle glicêmico após RYGB.

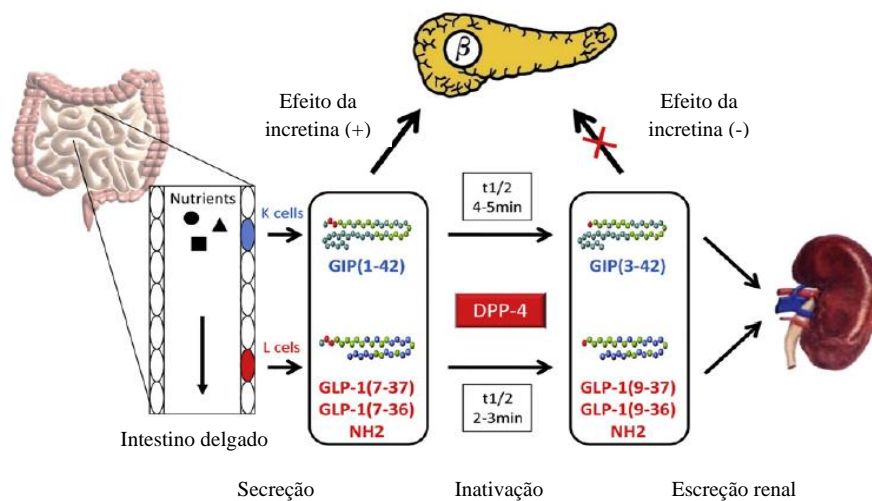


Figura 04: A) Secreção e metabolismo de GIP e GLP-1. GIP é secretado pelas células K da parte superior do intestino; O GLP-1 é secretado por células L do intestino inferior. GIP e GLP-1 assim que liberados na circulação passam por processamento proteolítico rapidamente por DPP-4, e, assim, são inativados e excretados a partir do rim. As incretinas GIP, intactas (1-42), e GLP-1 (7-37), e GLP-1 (7-36) amida, têm efeitos insulínotropícos nas células beta do pâncreas, ao passo que as incretinas GIP (3-42), e GLP-1 (9-37) e GLP-1 (9-36) amida e processadas por DPP-IV, perderam os seus efeitos insulínotropícos. (Figura adaptada de YABE & SEINO, 2011)

### 3.3 PRÓ-HORMÔNIO CONVERTASE 1/3 - PC1/3 e DIPEPTIDIL PEPTIDASE-IV - DPP-IV

Uma variedade de pró-hormônios necessitam ser processados intracelularmente para que estes tornem-se biologicamente ativos. O GIP e o GLP-1 são incretinas transcritas na forma de pró-hormônios, pró-gip e pró-glucagon. Ambas necessitam do auxílio da enzima a PC1/3, para fazer a sua ativação.

A pró-hormônio convertase 1/3 (PC1/3), representada pelo gene PCSK1 localizado no cromossomo 5, e composto por 14 éxons, é sintetizada na forma de zimogênio inativo (ProPC1/3 - 94kDa) no retículo endoplasmático. Rapidamente ocorre a clivagem do NH<sub>2</sub>-terminal, de forma autocatalítica, ainda no retículo endoplasmático; e um segundo processamento ocorre num compartimento pós-golgi e a região COOH-terminal é removida, parcial ou totalmente, transformando-a em uma forma muito mais ativa, mas também menos estável (PICKETT *et al*, 2013; CREEMERS *et al*, 2012). SNPs no gene PCSK1 são identificados e associado a obesidade e/ou DM2, por possuírem potencial efeito deletério na biossíntese, secreção e atividade catalítica da PC1/3 (N221D [rs6232], Q665E/S690T [rs6234/rs6235], Q665E [rs6234], and S690T [rs6235]) ((PICKETT *et al*, 2013).

É uma enzima expressa no cérebro, células neuroendócrinas e ainda em células enteroendócrinas, como as células-L intestinais. Essa enzima é responsável por uma grande quantidade de processamentos de proteínas e regulação das suas secreções (WARDMAN *et al*, 2010).

O GLP-1 é secretado pelas células-L intestinais em várias formas incluindo GLP-1(1-37) e GLP-1(1-36)NH<sub>2</sub>, que são formas inativas. Com a clivagem da porção amino terminal pela PC 1/3 elas são ativadas e se tornam biologicamente ativas: GLP-1(7-37) e GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> (Figura 05), possuindo assim a habilidade de estimular a secreção de insulina.

O GIP ativo, da mesma forma, é derivado da quebra do n-terminal de um precursor, pró-gip de 153 aminoácidos para 42-aminoácidos, (Figura 05) (BAGGIO& DURKER, 2007).

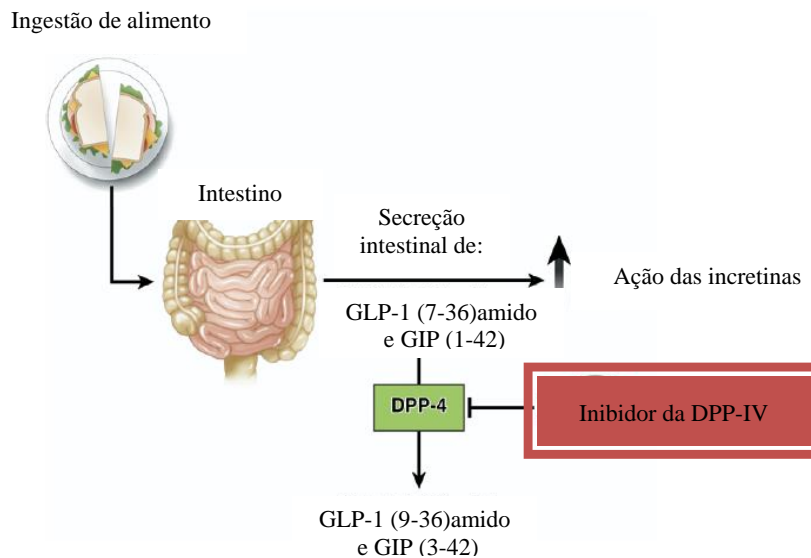


Figura 05: Bioativos GLP-1 (7-36) amida e GIP (1-42) são liberados a partir do intestino delgado após a ingestão de alimentos e reforçam o estímulo para secreção de insulina (ação incretina). DPP-IV converte rapidamente de GLP-1 e GIP em seus metabolitos inactivos GLP-1 (9-36) e GIP (3-42) *in vivo*. A inibição da DPP-IV evita a actividade de degradação de GLP-1 e GIP, aumentando assim a ação da incretina (Adaptado de BAGGIO & DRUKER, 2007).

Creemers e colegas (2012), sustentam que os hormônios processados pela PC 1/3 e secretados pelas células enteroendócrinas são um importante suporte principalmente na regulação da ingestão calórica durante o crescimento na infância. No entanto muitos trabalhos identificam polimorfismo (single nucleotide polymorphism - SNPs) no gene da PC 1/3, prejudicando a atividade e estabilidade da enzima. Esse evento pode estar associado a um grande risco de desenvolvimento da obesidade (MARTÍN *et al* , 2013; CREMEERS *et al*, 2012). Desde 1997 Jackson e colaboradores, tem ilustrado que SNPs impedem a "maturação" enzimática, prejudicando sua função e assim provocando disfunções intestinais, síndrome metabólica e obesidade precoce.

Os pró-hormônios insulínótróficos são dependentes da ação da PC 1/3 para serem biológicamente ativos, assim existe uma estreita ligação entre deficiência dessa enzima em indivíduos obesos e DM2. Frank e colaboradores, 2013, sugerem que mutações no gene PCSK1 provocam o desenvolvimento de diabetes insipidus em humanos.

Dessa forma podemos sugerir que pode haver a ligação no desenvolvimento de ambas, obesidade e DM2, a deficiência da enzima PC1/3, responsável pela ativação de diversos hormônios ligados a regulação de ingestão de alimentos e também no estímulo da liberação da insulina e captação da glicose sanguínea.

O GIP e o GLP-1 possuem um curto período de tempo em atividade. O GLP-1 é liberado na circulação seguindo duas fases: 10-15 minutos após ingestão do alimento e a segunda fase mais longa de 30-60 minutos; age por aproximadamente dois minutos e logo é inativado. O GIP da mesma forma age por pouco tempo no organismo. Em humanos saudáveis chega a aproximadamente sete minutos e cinco minutos em DM2 (YABE & SENIO, 2011; BAGGIO & DURCKER, 2007).

A rápida inativação dessas incretinas é realizada pela enzima DPP-IV, que também é conhecida como CD26. DPP-IV é expressa em múltiplos tecidos e células incluindo fígado, pâncreas sistema nervos central, intestino. Além disso também está presente na superfície do endotélio intestinal posicionado adjacente aos sítios de secreção de GIP e GLP-1 (BAGGIO & DURCKER, 2007). Por conta dessa ação de inativação de incretinas, DPP-IV vem sendo alvo de muitos medicamentos antidiabetogênicos. Inibidores de DPP-IV são muito utilizados no tratamento de DM2 fazendo assim com que GIP e GLP-1, principalmente GLP-1 se mantenham ativos por mais tempo. Stengel e colaboradores (2014) observam em indivíduos obesos uma correlação positiva entre níveis ativos de DPP-IV e IMC, contribuindo assim com a diminuição da ação de GLP-1, tanto na sua ação insulínótrófica como no papel anorexígeno.

#### 4 PROCESSO INFLAMATÓRIO - NFκ-B

A obesidade é caracterizada pelo excesso de tecido adiposo que é reconhecido por ampla capacidade endócrina, secretando diversos hormônios e citocinas. Esse excesso de tecido adiposo, especialmente quando se é referido ao excesso de adiposidade visceral, está fortemente associado com a resistência à insulina, hipertensão, dislipidemia, uma constelação de doenças geralmente incluídas sob o denominador “síndrome metabólica” (SM) (KREDEL & SIEGMUND, 2014). Um estado de inflamação crônica desempenha um papel crucial na patogênese da disfunção metabólica relacionada à obesidade. O tecido adiposo em humanos e modelos animais de obesidade são infiltrados por um grande número de macrófagos o que pode desencadear uma resposta inflamatória sistêmica e desenvolver a resistência à insulina seguida de DM2 (SCARPELLINI & TACK, 2012).

Estudos clínicos e epidemiológicos mostram a clara ligação entre o desenvolvimento de respostas inflamatórias de baixo grau e doenças metabólicas, particularmente na patogênese da obesidade e DM2. O excesso de massa adiposa está associada com o aumento dos níveis dos mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios, citocinas ou quimiocinas, tais como o factor de necrose tumoral (TNF), interleucinas (IL-4, IL-6, IL-1b, IL-10, IL-8), factor inibidor da migração de macrófagos, ou proteína -1 quimiotática de monócito (MCP-1) que são preditivos de desenvolvimento de DM2 (SCARPELLINI & TACK, 2012; PHARM *et al*, 2012).

Os tecidos adiposos, subcutâneo e visceral possuem características distintas quando se trata da produção de mediadores envolvidos em processo inflamatório. O tecido adiposo visceral, também chamado de tecido adiposo mesentérico (TAM), é um depósito biologicamente ativo promovendo a inflamação local. Em alguns casos esse tecido pode

chegar a recobrir 50% da superfície intestinal assim participando significativamente no estado inflamatório desse tecido (Figura 06).

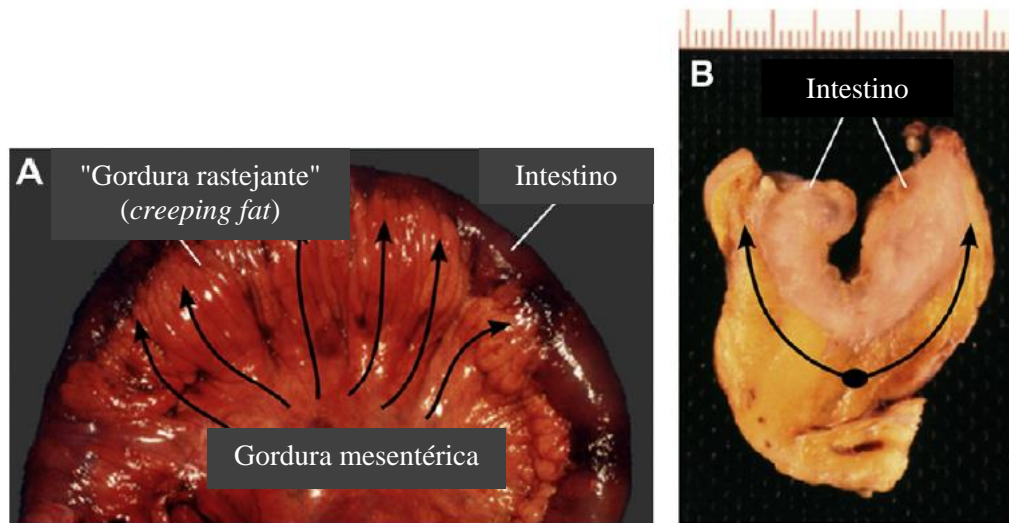


Figura 06: Aspecto macroscópico do envolvimento da gordura intestinal na doença de Crohn. (A, B) Os espécimes cirúrgicos exibem as extensões do tecido adiposo do mesentério que cobrem a superfície intestinal (setas). Esta cobertura do intestino pelo tecido adiposo corresponde a "progressiva de gordura" (*creeping fat*). (Adaptada de PHARM *et al*, 2012).

A produção de sinalizadores do estresse tecidual como IL-1b e TNF ativam um complexo proteico, o NFk-B (fator nuclear kappa B) que desempenha funções como fator de transcrição, promovendo a transcrição de citocinas associadas a respostas imunológicas favoráveis ao desenvolvimento da inflamação. É reconhecido que esses sinalizadores promovem a fosforilação dos inibidores kappa B (IkB) liberando NFk-B, que se direciona ao núcleo celular e promove a transcrição de fatores dele dependentes. Historicamente NFk-B é considerado mediador central das respostas imunes natas, atualmente, NFk-B é indicado como um regulador central de respostas ao estresse em diferentes condições, incluindo o estresse físico, oxidativo e exposição a certos produtos químicos, que também levam à ativação deste fator nuclear (LI & STARK, 2002).

Indivíduos obesos (OB) apresentam células adiposas com característica de hipertrofia, o que faz aumentar a produção e secreção de citocinas pró-inflamatória. A inflamação

intestinal provocada pelo excesso de tecido adiposo mesentérico está associada à disfunção tecidual, prejudicando diretamente as funções das células como a produção e secreção de incretinas, em especial GLP-1, relacionado ao metabolismo da glicose. Esse estado pode desencadear os primeiros sintomas da resistência a insulina, e posteriormente o desenvolvimento da DM2 (KREDEL & SIEGMUND, 2014).

## **5 RECEPTORES ATIVADOS POR PROLIFERADOR DE PEROXISSOMO- GAMA - PPAR- $\gamma$**

Receptores ativados por proliferador de peroxissomo (Peroxisome proliferator-activated receptor - PPAR) é uma subfamília de proteínas receptoras nucleares que agem como fatores de transcrição e regulam a expressão de diversos genes envolvidos na regulação de diversos processos biológicos (DESVERGNE & WAHLI, 1999; LEE *et al* 2003; CHAWLA *et al*, 2001). Eles estão divididos em três grupos: PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\beta$  /  $\delta$ , e PPAR- $\gamma$  que estão distribuídos em diversos tecidos. Agem controlando e regulando a expressão de genes envolvidos na regulação do metabolismo intermediário da glicose e dos lipídeos, homeostase metabólica, adipogênese, sensibilidade à insulina, resposta imune, crescimento e diferenciação celular (DESVERGNE & WAHLI, 1999; GUAN *et al* 2001; FAJAS *et al*, 2001) e ainda agem nos processos anti-inflamatórios (ROSEN & SPIEGELMAN, 2001).

A inflamação vem sendo um dos principais determinantes das comorbidades relacionadas ao sobrepeso e a obesidade, e isso reforça a hipótese que a ligação entre a nutrição, metabolismo e sistema imunológico, pode ser regulada por PPARs (ODEGAARD *et al*, 2007; HEVENER *et al* 2007). Os ácidos graxos ômega 3 e 6, eicosanóides e fosfolipídeos, foram identificados como ligantes endógenos dos PPARs. Embora muitos ácidos graxos sejam capazes de ativar as três isoformas de PPAR (GUAN *et al* 2001;

KLIEWER *et al*, 1997), existe certa seletividade. Cada PPAR se mostra mais ativado por um AG específico, por exemplo: o ácido linolênico age como agonista endógeno de PPAR- $\gamma$  no tecido adiposo, tecido linfóide, cólon, fígado e coração, ativando genes envolvidos em processos anti-inflamatórios (MONSALVE *et al* 2013).

O PPAR- $\gamma$  está mais presente no tecido adiposo, mas também é expresso em células do sistema imunológico (monócitos e macrófagos), na mucosa do cólon e do ceco, e da placenta e com menor expressão no músculo esquelético e fígado. No tecido adiposo branco e marrom, PPAR- $\gamma$  é essencial para a diferenciação dos adipócitos e promove acúmulo de lipídeos nessas células. Existem vários trabalhos mostrando que adipogênese, homeostase da glicose e metabolismo de lipídeos são os principais mecanismos onde se encontram a ação do PPAR- $\gamma$ . Além disso ele também está envolvido na melhora da resistência à insulina e desempenha um papel chave na inflamação e crescimento neoplásico (ROSEN & SPIEGELMAN, 2001).

Inúmeras pesquisas avaliam os efeitos dos agonistas de PPAR- $\gamma$  na prevenção do desenvolvimento de DM2. A ativação do PPAR- $\gamma$  parece aumentar a sensibilidade à insulina em adipócitos através do balanço e adequada secreção de adipocinas (adiponectina e leptina), e isso pode ser mediada, em parte, pelo estímulo direto do receptor sobre os genes que codificam fatores da via de sinalização da insulina (GRYGIEL-GÓRNIAK, 2014).

A DM2 está associada a um estado de inflamação crônica dos adipócitos, que secretam elevados níveis de citocinas. Estudos mostram que agonistas de PPAR- $\gamma$  podem inibir a expressão dessas citocinas. Curiosamente, a estimulação agonista-dependente de PPAR- $\gamma$  promove a ligação ao receptor nuclear de co-repressor (NCoR) e estabiliza associação com o promotor de NFk-B, conduzindo assim à repressão de genes inflamatórios em macrófagos (Figura 07) (WELTERS *et al*, 2004; SCHMIDT *et al*, 2010)



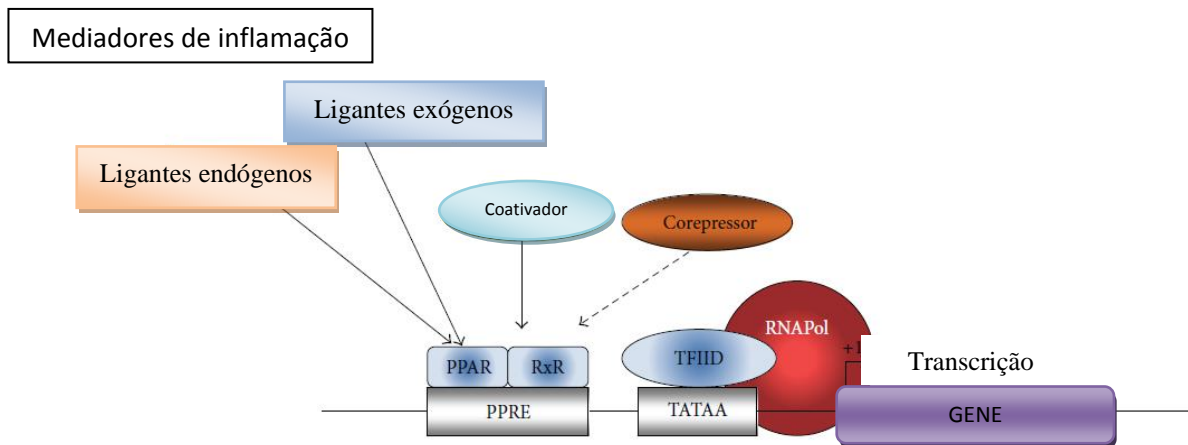


Figura 07: Mecanismos de transcrição do gene de PPAR. No estado inativado, o PPAR interage com o co-repressor, e este complexo tem atividade de desacetilase de histona, inibindo, assim, o processo de transcrição. Após a ligação do ligando exógeno (droga) ou ligando endógeno (ácidos gordos, prostaglandinas, etc.), com o PPAR é ativado e forma heterodimeros com RXR e recruta coativadores, que têm actividade de histona acetilase facilitar a transcrição de vários genes. (Adaptada de MONSALVE *et al*, 2013).

## 6 ÁCIDOS GRAXOS

Os Ácidos graxos são conhecidos por fornecerem gorduras e óleos, que são amplamente utilizados como fonte e armazenamento de energia. Apresentam um grupo carboxila e longas cadeias de hidrocarbonetos com ligações saturadas (não contém ligações duplas) ou insaturadas (contém uma ou mais ligações duplas) (NELSON & COX, 2002).

Harika e colaboradores (2013), estudando o consumo de ácidos graxos em 40 países, e comparando aos valores estabelecidos como saudáveis pelas organizações *Food and Agriculture Organization of the United Nations/The World Health Organization (FAO/WHO)*, e *Dietary Guidelines for Americans and European Society of Cardiology*, constataram que na maioria dos países o consumo médio de ácido graxo saturado (SFA) é maior do que o máximo recomendado, que é de 10%, e, enquanto na metade dos países, o consumo médio de ácido graxo poliinsaturado (PUFA) é menor do que o intervalo recomendado que é de 6-11%.

Como alvo desse estudo, elegemos três ácidos graxos, cada um com uma característica específica (Figura 08):

- Ácido oleico (ômega-9), insaturado com ligação dupla com configuração *cis* no carbono 9, (C18:1*cis*9).
- Ácido elaidico (*trans* industrial), insaturado com ligação dupla com configuração *trans* no carbono 9, (C18:1 *trans*9).
- Ácido Vaccênico (*trans* natural), insaturado com ligação dupla com configuração *trans* no carbono 11, (C18:1*trans*11).

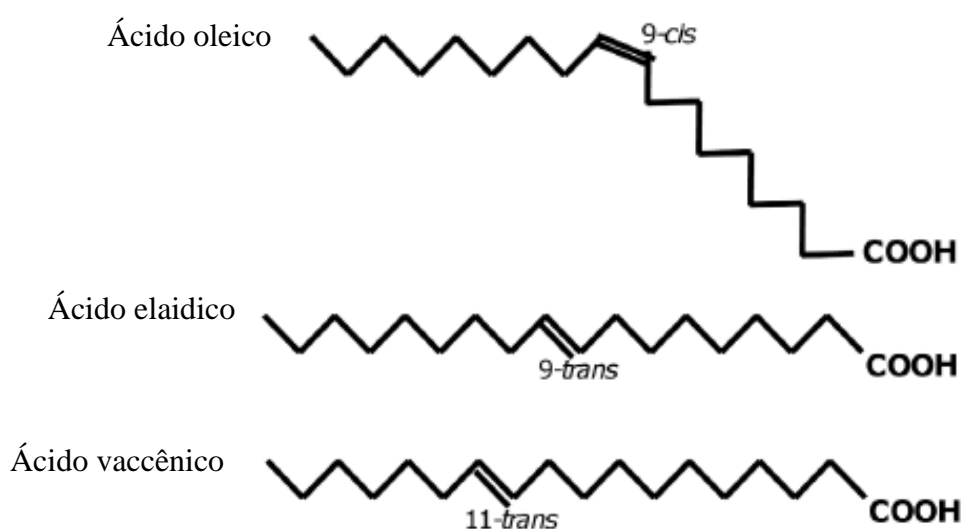


Figura 08: Estrutura dos ácidos graxos *cis* oleico, *trans* industrial elaidico e *trans* natural vaccênico (Adaptado de Brouwer *et al* 2011).

## 6.1 ÁCIDO OLEICO

O Ácido oleico (OL) tem sido utilizado numa variedade de estudos objetivando mostrar seu potencial benefício à saúde humana, principalmente no que diz respeito à obesidade e DM2. Dados nos mostram ao longo do tempo que o azeite de oliva, rico em ácido oleico, muito presente na dieta mediterrânea, melhora significativamente os níveis glicêmicos em indivíduos resistentes à insulina e pré-diabéticos (PANIAGUA *et al* , 2007).

Tsuchiya e colaboradores (2014) demonstrou que o ácido oleico reforça a sinalização da insulina e facilita a captação de glicose induzida por insulina em adipócitos. Isto pode representar um novo mecanismo subjacente *cis*-insaturados na melhoria da resistência à insulina.

Essa melhora pode estar relacionada com a modulação direta dos macronutrientes sobre a resposta insulínica provocada pelo GLP-1. Esse efeito do ácido oleico já foi demonstrado em enterócitos de animais (ratos Zucker - geneticamente obesos) e também em humanos, indivíduos saudáveis e pacientes DM2 (ROCA *et al*, 2001; THOMSEN *et al*, 1999, THOMSEN *et al*, 2003).

Após a cirurgia bariátrica as mudanças hormonais e a perda de peso melhoram a sensibilidade à insulina e diminuem o conteúdo de gordura visceral, entretanto, se o paciente continuar com uma dieta rica em ácidos graxos toda essa melhora regride novamente (SHAO-ZHUANG *et al*, 2012).

Foi observado o efeito de uma intervenção nutricional com dieta mediterrânea, rica em ômega-9 e fibras, em crianças obesas com síndrome metabólica. Velázquez-López e colaboradores (2014) constatou diminuição significativa na glicemia em jejum além do IMC e perfil lipídico destas crianças.

Outro estudo mostra que a dieta mediterrânea (MedDiet) usando azeite de oliva pode melhorar a disfunção endotelial, inflamação e estresse oxidativo na DM2. Assim podemos citar que dieta rica em ácido oleico melhora a disfunção endotelial e inflamação, concomitantemente aumenta as defesas antioxidantes e diminui o estresse oxidativo. No entanto, pela primeira vez, este estudo mostra que um MedDiet pode contrabalançar os efeitos negativos da hiperglicemia e melhorar a função endotelial diminuindo a inflamação, assim recuperando a ação protetora do GLP-1, não só, mas muito importante em DM2 (CERIELLO *et al*, 2014).

## 6.2 ÁCIDO VACCÊNICO

Ácido vaccênico (VA – C18:1 *trans*-11) é um ácido graxo *trans* natural e é chamado assim pois é produzido naturalmente no rúmem através da parcial biohidrogenação do ácido linolênico [C18:2] e  $\alpha$ -linolênico [C18:3]. VA é isômero posicional e geométrico do ácido oleico e perfaz 60-80% do total de gorduras *trans* dos ruminantes. Ele é consumido indiretamente em alimentos provenientes do gado, como carne, leite e queijos (MOZAFFARIAN *et al*, 2009, KUHNT *et al*, 2011).

O metabolismo do VA produz tanto ácido esteárico (18:0) por saturação ou *cis*9,*trans*11-ácido linolenico conjugado (*c*9, *t*11-CLA) por dessaturação. VA é precursor endógeno da síntese do *c*9, *t*11-CLA através da ação da enzima  $\delta$ 9-desaturase, que está presente em humanos e animais (MOHANKUMAR *et al*, 2012).

Muito tem se falado dos riscos a saúde, associados com o consumo de dietas com grandes quantidades de gorduras *trans* comerciais e hidrogenadas, mas pouco elucidado ainda está o papel das gorduras *trans* dos ruminantes. Recentes estudos têm mostrado que VA está relacionado com a redução da incidência de doenças do coração, câncer e também obesidade (WANG & LEE, 2015). Essa função benéfica do VA pode ser via as ações do seu precursor CLA *c*9,*t*11, relacionado com processos anti-inflamatórios (KUHNT *et al*, 2011).

LIM e colegas, 2014, usando cultura celular de adenocarcinoma, mostrou que o VA inibiu a proliferação das células. E esse resultado sugere que VA pode exercer um efeito anticarcinogênico direto nas células de adenocarcinoma mamário humano. Outro fato relevante que podemos citar é a transformação de VA pela enzima  $\delta$ 9-desaturase que libera CLA, pois, evidências indicam que suplementação com VA resulta no aumento de CLA no tecido adiposo, diminuindo os níveis de IL-10, indicando uma ação antiinflamatória para VA (WANG *et al*, 2008; MOHANKUMAR *et al*, 2012).

Mohankumar e colaboradores, 2012 utilizando modelos animais (ratos Zucker fa/fa) submetidos a uma dieta com VA, não obtiveram nestes, a obesidade exacerbada, indução a resistência à insulina e alterações metabólicas. Além disso, encontraram algumas alterações positivas, como o tamanho diminuído dos adipócitos, proporcionando níveis mais elevados de IL-10, uma proteína antiinflamatória.

Wang e colaboradores em 2012 sugerem que a suplementação dietética de VA pode aumentar a expressão do gene de PPAR- $\alpha$  e PPAR- $\gamma$  a nível intestinal, e, uma correspondente abundância de PPAR- $\gamma$  em ratos, está associada a uma ação antiinflamatória.

### 6.3 ÁCIDO ELAIDICO

Existem duas principais fontes de ácidos graxos *trans*: a industrialização dos óleos vegetais produzindo a gordura vegetal hidrogenada, e o *trans* natural produzido no rúmen de bovinos, o ácido vaccênico. AGs *trans* industrial são produzidos durante a hidrogenação parcial de óleos vegetais, dos quais o ácido elaídico é o predominante (BROUWER *et al*, 2010). Com o efeito da hidrogenação parcial os alimentos processados industrialmente podem conter até 50% de ácido graxo *trans*, principalmente o ácido elaídico (9-octadecenoico *trans* ácido, t9-C18:1). Em contraste, alimentos de origem bovina, como carne e leite, apresentam menores quantidades de AG *trans*, (1-8%) (Craig-Schmidt, 2006; Kraft *et al*, 2006). Até agora, vários estudos têm demonstrado que o consumo a longo prazo de ácido graxo *trans* aumenta o risco de doenças cardiovasculares, DM2, inflamação sistêmica e obesidade abdominal (WU & SHAH, 2014). O consumo desse ácido graxo *trans* industrial se dá através de produtos alimentares processados, como margarinas, alimentos fritos, produtos instantâneos, de padarias e confeitarias. A hidrogenação artificial confere a esses ácidos

graxos uma estabilidade maior, evitando a sua rancificação e prolongando o tempo de prateleira dos alimentos (KUHNT *et al* , 2011)

Honors e colaboradores, em 2014, avaliaram o consumo de AG por 5.869 homens e 6.657 mulheres através de recordatórios alimentares, e concluiu que a ingestão média de *trans* e de ácidos graxos saturados são mais elevados do que os níveis recomendados, apesar de ter observado que a ingestão de ácidos graxos *trans*, como percentagem de energia, diminuiu em 30% em homens e mulheres. Isto representa uma diminuição maior do que o observado em gordura total, ácidos graxos saturados (SFAs), e os ácidos graxos mono-insaturados (MUFAS).

Um dado que merece destaque é a flora intestinal, esses microrganismos são expostos a todos os alimentos que são consumidos, incluindo PUFAs e ácidos graxos *trans* (AGT). Uma dieta rica em gordura é conhecida por reduzir os níveis populacionais dessas bactérias benéficas do intestino, como os lactobacilos e bifidobactérias, o aumento do teor lipopolisacarídeos no soro, e induzir a SM (Zhang *et al*, 2010). Contudo, Wu e Shah (2014), observaram *in vitro* que ácido eláidico não apresenta efetiva inibição no crescimento e viabilidade dos principais lactobacillus encontrados na flora intestinal.

Park e colaboradores (2014) mostram em peixe zebra, que o consumo aumentado de AG *trans* está relacionado com a inflamação de macrófagos induzindo a produção de espécies reativas de oxigênio. Esses animais suplementados com ácido eláidico, após 20 semanas, apresentaram estado de inflamação crônica e dano hepático, no entanto, sem notável aumento do peso corporal. Contudo, a inflamação foi tão agressiva levando os animais a morte precocemente.

Estudo com ratos JCR:LA-cp, caracterizados por apresentarem anormalidades imunológicas similares aos seres humanos obesos, mostram que quando alimentados com ácido eláidico apresentaram maior liberação de IL-6 em resposta ao aumento da proliferação

de células T sugerindo que o ácido eláidico facilita a inflamação e pode diminuir a capacidade de células T na regulação da resposta inflamatória (RUTH *et al*, 2010).

É conhecida a relação do estado inflamatório de indivíduos obesos com o desenvolvimento de resistência a insulina e DM2, no entanto Lovejoy e colaboradores (2002), mostram que o ácido eláidico não tem qualquer efeito sobre a secreção ou sensibilidade à insulina em indivíduos magros saudáveis. Após quatro semanas de dieta enriquecida com este ácido graxo, estes indivíduos não exibiram qualquer mudança nesses parâmetros.

Corroborando com esse dado, uma pesquisa com mulheres na pós-menopausa com uma dieta rica em AG *trans* industrial por 16 semanas não teve efeito mensurável em qualquer parâmetro relacionado ao diabetes, mas aponta que uma exposição de maior duração a esse tipo de dieta pode ser necessária para afetar a sensibilidade à insulina. Além disso, pode ser difícil separar os efeitos do consumo industrial dos AG *trans* por estar associado a um estilo de vida pouco saudável, com alto consumo de *fast-food* (BENDSEN *et al*, 2011). Tardy e colegas (2008), reforçam essa linha de pensamento mostrando que as dietas enriquecidas em MUFAs *trans* de origem industrial ou produtos lácteos não prejudicaram a sensibilidade à insulina muscular em ratos Wistar. No entanto, pode-se sugerir que a ativação do NFκ-B pela exposição a estes ácidos graxos, deve-se a configuração *trans* da dupla ligação (HOMMELBERG *et al*, 2010).

Há evidências que mesmo ratos consumindo uma dieta com baixa quantidade de gordura, mas sendo o ácido eláico o principal componente, ocorre o aumento de gordura visceral principalmente hepática, em proporções à níveis alcançados em uma dieta rica em AG saturado. Sugerindo que isso pode induzir a uma leve resistência à insulina (DORFMAN *et al*, 2009).

## 7 S100B (S100 calcium binding protein B)

Um das principais características da obesidade é o excesso de tecido adiposo, esse tecido apresenta inflamação crônica de baixa intensidade, que é um evento patológico implicado na mediação da resistência à insulina. S100B é uma proteína encontrada nos humanos e modelos animais em níveis aumentados em situações de doenças neurológicas e traumas (BUCKMAN *et al*, 2014). S100B é expressa em astrócitos, determinados tipos de células neuronais, células de Schwann, melanócitos, condrócitos, adipócitos, miofibras esqueléticas e alguns outros tipos celulares. Muito se sabe da sua atuação no sistema nervoso (SN), mas pouco ainda se descobriu sobre a sua distribuição e regulação fisiológica no tecido adiposo (BUCKMAN *et al*, 2014). Essa proteína está envolvida em uma série de episódios bioquímicos, por exemplo: regulação da proliferação e apoptose celular, metabolismo energético, inflamação, entre outros (DONATO *et al*, 2013).

S100B pode atuar como fator neurotrófico ou citocina inflamatória quando se liga ao receptor de produtos de glicação avançada (RAGE). A evidência de que S100B atue como uma citocina derivada do tecido adiposo é demonstrada pela correlação positiva dos níveis circulantes dessa proteína com o IMC de humanos evidenciando que o eixo de S100B-RAGE pode ser um importante regulador de inflamação crônica do tecido adiposo na obesidade. Essa disfunção do tecido adiposo na obesidade contribui para o desenvolvimento da resistência à insulina. (BUCKMAN *et al*, 2014).

No entanto, não podemos perder de vista que o tecido intestinal é inervado pelo complexo e extenso sistema nervoso entérico (SNE), com a presença de neurônios e células da glia, distribuídos pelos dois principais plexos que auxiliam no controle das funções intestinais. Com o passar do tempo ficou cada vez mais claro que esses neurônios e essas células gliais entéricas (NCGE) estão ativamente envolvidos na regulação da homeostase,



motilidade e processos inflamatórios no intestino (CERIELLO *et al*, 2014). No intestino humano apenas a S100B é específica e fisiologicamente expressa pelos NCGE, e essas células são ativadas por meio de insultos inflamatórios, fazendo assim a síntese e a liberação de citocinas no intestino. Recentes descobertas mostram um exacerbado nível circulante de S100B que se relaciona com o intestino inflamado. Como já foi citado, a sinalização de S100B para RAGE, em concentrações micromolares, proporcionam a fosforilação de NFκ-B ativando-o que por sua vez leva a transcrição de diferentes citocinas e proteínas como iNOS (Inducible nitric oxide synthase). Outras investigações demonstraram que NCGE e S100B estão diretamente envolvidos em doenças inflamatórias do intestino, principalmente região da mucosa duodenal (CERIELLO *et al*, 2014).

No entanto, é observado que esse aumento nos níveis circulantes de S100B durante a obesidade, pode ser revertido pela perda de peso, em ratos (BUCKMAN *et al*, 2014). Assim podemos considerar S100B como um marcador para determinados processos patológicos.

## 8 Justificativa

O alarmante aumento da população obesa em todo o mundo vem chamando a atenção dos pesquisadores, principalmente no que diz respeito às comorbidades, em especial a DM2. Por este motivo, muitos cirurgiões bariátricos têm desenvolvido multi-modalidades e modernas técnicas para a cirurgia metabólica. Tem sido observado que após a cirurgia bariátrica ocorre a remissão do quadro diabético destes indivíduos, aproximadamente 80% dos casos, tem interrupção do uso de medicamentos antes da perda significativa de peso (MOTTIN *et al*, 2008). Acredita-se que a alteração anatômica e conseqüentemente fisiológica seja a explicação primeira para a melhora da glicemia e outros parâmetros clínicos e metabólicos. Entretanto, não existem explicações bioquímicas suficientes para estas alterações metabólicas. Desta forma, muitos cirurgiões ainda não apóiam este procedimento para a “cura” da diabetes. Muitas sociedades como American Diabetes Association (ADA), European Association for Study of Diabetes (EASD), Diabetes UK, Chinese Diabetes Society (CDS) e British Obesity & Metabolic Surgery Society (BOMSS) e muitas outras organizações se reúnem periodicamente para estudar a validação da técnica cirúrgica como modalidade de tratamento ou cura da diabetes. Para tanto, é necessário conhecer do ponto de vista molecular, a região do intestino a qual, após a cirurgia, passa a receber o alimento ingerido pelo paciente. Como esta porção do intestino é modulada e quais nutrientes podem ser moduladores ainda são questões em aberto. Além disso, em se tratando de indivíduos obesos, o aspecto inflamatório é de relevância, tanto do ponto de vista sistêmico quanto local, no próprio intestino, pois a liberação de incretinas depende da modulação enteroendócrina promovida pelo alimento.

Centralizando no Brasil, a situação não é diferente, o diagnóstico de síndrome metabólica está cada vez mais presente nas clínicas e hospitais, 80% dos indivíduos obesos

também são diagnosticados com DM2. Especialmente no sul do país, a alimentação rica em carne bovina, leite e derivados, e de produtos industrializados, contém grandes quantidades de ácidos graxos monoinsaturados *cis* ou *trans*, por exemplo, ácido vaccênico, elaidico e oleico. Com a intervenção cirúrgica, ocorre uma mudança anatômica no sistema digestivo, mudando o curso natural do alimento que agora chega numa região mais distante do duodeno. Nesta nova condição, os componentes dos alimentos estimulam diferentes células endócrinas que passam a liberar seus hormônios com diferente intensidade.

Entendemos dessa forma que desvendar as modulações, sinalizações e alterações moleculares que expliquem a brusca melhora na glicemia dos indivíduos obesos diabéticos, submetidos à cirurgia bariátrica, são altamente justificáveis e de alto grau de relevância científica, pois para a validação da cirurgia bariátrica como intervenção de cura desta patologia é necessário não só conhecer os resultados clínicos e dados epidemiológicos, mas a explicação molecular.

## 9 OBJETIVOS

### 9.1 OBJETIVO GERAL

Analisar no jejuno de indivíduos obesos grau III, NDM2 e DM2 submetidos a RYGB a expressão de mRNA de GIP, proglucagon, PC1/3, DPP-IV, PPAR- $\gamma$  e NF-kB, basal e modulada por glicose e ácidos graxos monoinsaturados (*cis* ou *trans*) bem como o imunoconteúdo e secreção de GIP e GLP-1, e relacionar com processo inflamatório da mucosa intestinal através de um marcador biológico, a proteína S100B.

#### 9.1.1 Objetivos específicos - Capítulo I:

Analisar e quantificar a expressão relativa basal de mRNA de GIP, proglucagon, DPP-IV e PC1/3, em mucosa intestinal de OB NDM2 e DM2 submetidos a RYGB,.

Analisar e quantificar a expressão relativa de mRNA de GIP, proglucagon, DPP-IV e PC1/3, em mucosa intestinal de OB NDM2 e DM2 submetidos a RYGB, após a incubação *in vitro* com altas concentrações de glicose.

Detectar e quantificar o imunoconteúdo de GIP e GLP-1 ativos nas células K e L, respectivamente, após incubação *in vitro* das amostras da mucosa intestinal de OB NDM2 e DM2 em meio contendo alta concentração de glicose.

### 9.1.2 Objetivos específicos - Capítulo II

Analisar e quantificar a expressão relativa de mRNA de GIP, proglucagon, DPP-IV, PC1/3, PPAR- $\gamma$  e NF-kB, em mucosa intestinal de OB NDM2 e DM2 submetidos a RYGB, após incubação *in vitro* com 50  $\mu$ M de ácido graxo, oléico, elaidico ou vaccênico.

Detectar e quantificar o imuno conteúdo de GIP e GLP-1 ativos nas células K e L, respectivamente, após incubação *in vitro* das amostras da mucosa intestinal de OB NDM2 e DM2 em meio contendo 50  $\mu$ M de ácido oléico ou vaccênico.

Quantificar por ELISA o nível de secreção de GIP e GLP-1, no meio de incubação após tratamento das células da mucosa intestinal de OB NDM2 e DM2 com ácido oleico ou vaccêncio.

### 9.1.3 Objetivos específicos - Capítulo III

Mensurar o nível de S100B circulante em OB NDM2 e DM2 e comparar com os níveis plasmáticos de indivíduos NOB NDM2 e DM2.

**PARTE II**



# *Obesity Associated with Type 2 Diabetes Mellitus Is Linked to Decreased PC1/3 mRNA Expression in the Jejunum*

**Francieli Rohden, Cintia S. Costa, Thais O. Hammes, Rogério Margis, Alexandre V. Padoin, Cláudio C. Mottin & Regina Maria Guaragna**

## **Obesity Surgery**

The Journal of Metabolic Surgery and Allied Care

ISSN 0960-8923  
Volume 24  
Number 12

OBES SURG (2014) 24:2075-2081  
DOI 10.1007/s11695-014-1279-x





**Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer Science +Business Media New York. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at [link.springer.com](http://link.springer.com)".**



# Obesity Associated with Type 2 Diabetes Mellitus Is Linked to Decreased PC1/3 mRNA Expression in the Jejunum

Francieli Rohden · Cintia S. Costa · Thais O. Hammes · Rogério Margis · Alexandre V. Padoin · Cláudio C. Mottin · Regina Maria Guaragna

Published online: 16 May 2014  
 © Springer Science+Business Media New York 2014

## Abstract

**Background** Bariatric surgery is the most effective therapeutic option for obesity and its complications, especially in type 2 diabetes. The aim of this study was to investigate the messenger RNA (mRNA) gene expression of proglucagon, glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP), prohormone convertase 1/3 (PC1/3), and dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV) in jejunum cells of the morbidly obese (OB) non type 2 diabetes mellitus (NDM2) and type 2 diabetes mellitus (T2DM), to determine the molecular basis of incretin secretion after bariatric surgery.

**Methods** Samples of jejunal mucosa were obtained from 20 NDM2 patients: removal of a section of the jejunum about 60 cm distal to the ligament of Treitz and 18 T2DM patients: removal of a section of the jejunum about 100 cm distal to the ligament of Treitz. Total RNA was extracted using TRIzol. Reverse transcription quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) was carried out. Samples were sequenced to PC1/3 by ACTGene Análises Moleculares Ltd. Immuno content was quantified with a fluorescence microscope.

**Results** T2DM showed decreased PC1/3 mRNA expression in the primers tested (primer a,  $p=0.014$ ; primer b,  $p=0.048$ ). Many patients (36.5 %) did not express PC1/3 mRNA. NDM2 and T2DM subjects showed nonsignificantly different proglucagon, GIP, and DPP-IV mRNA expression. The immuno contents of glucagon-like peptide-1 and GIP

decreased in T2DM jejunum, but incubation with high glucose stimulated the immuno contents.

**Conclusions** The results suggest that bioactivation of pro-GIP and proglucagon could be impaired by the lower expression of PC1/3 mRNA in jejunum cells of obese patients with T2DM. However, after surgery, food could activate this system and improve glucose levels in these patients.

**Keywords** Glucagon-like peptide-1 · Glucose-dependent insulinotropic peptide · Dipeptidyl peptidase-IV · Prohormone convertase · Type 2 diabetes mellitus · Morbidly obese

## Abbreviations

GIP	Glucose-dependent insulinotropic peptide
GLP-1	Glucagon-like peptide-1
PC1/3	Prohormone convertase 1/3
DPP-IV	Dipeptidyl peptidase-IV
mRNA	Messenger RNA
RT-qPCR	Reverse transcription quantitative real-time polymerase chain reaction
T2DM	Type 2 diabetes mellitus
NDM2	Non type 2 diabetes mellitus
OB	Obese
NOB	Nonobese

F. Rohden · C. S. Costa · T. O. Hammes · R. M. Guaragna (✉)  
 Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS, Rua Ramiro Barcelos  
 2600 – anexo, CEP 90.035-003 Porto Alegre, RS, Brazil  
 e-mail: rguaragna@terra.com.br

R. Margis  
 Departamento de Biofísica, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

A. V. Padoin · C. C. Mottin  
 Centro de Obesidade e Síndrome Metabólica, Hospital São Lucas,  
 PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil

## Introduction

Obesity is becoming a worldwide epidemic. It is a major risk factor for cardiovascular disease and is directly linked to the development of type 2 diabetes (World Health Organization Global Infobase, [www.who.int/mediacenter](http://www.who.int/mediacenter)). Bariatric surgery is the most effective therapeutic option for reduction

of weight and its related complications in individuals with severe obesity ( $\text{BMI} \geq 40 \text{ kg/m}^2$ ) [1–4]. Postoperative changes in gastrointestinal anatomy and function help normalize the metabolic syndrome parameters [5–9], owing to the removal of part of the gastrointestinal tract which has important endocrine activity [10]. These endocrine cells produce, among other substances, glucose-dependent insulintropic peptide (GIP), secreted in the duodenum and proximal jejunum by K cells, and glucagon-like peptide-1 (GLP-1), synthesized and released by L cells from the medium jejunum to rectum [4]. These are key modulators of insulin secretion, glucose homeostasis, and gastric emptying [11–13].

The precursors of GIP and GLP-1 are cleaved by the enzyme prohormone convertase 1/3 (PC1/3), which is the intestinal K and L-cells, respectively [14, 15]. The action of incretins is completed by the cleavage of N-terminal peptides by a tissue and serum dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV) [16, 17].

GLP-1 release was found to be lower in obese (OB) compared to nonobese (NOB) subjects [18]. Studies have demonstrated that GIP secretion remains unchanged, but plasma concentrations of GLP-1 decreased in type 2 diabetes mellitus (T2DM) subjects [19, 20]. GLP1 secretion decreased in obese individuals with T2DM, affecting the incretin signaling process on satiety. GLP-1 promotes retardation of gastric emptying by stimulating insulin release, inhibition of gastric acids, thereby regulating the passage of nutrients through the gastrointestinal tract [6]. Other studies showed that serum levels of GLP-1 increased considerably in obese T2DM and obese non type 2 diabetes mellitus (NDM2) patients after bariatric surgery [3, 10, 21], and clinical data showed improved glyce-mic control in these individuals [1, 8]. It is possible that food intake after surgery directly stimulates the L-cells in the medium jejunum to release GLP-1 [5, 6, 22].

The aim of this work was to investigate the basal pattern of messenger RNA (mRNA) expression of proglucagon, GIP, PC1/3, and DPP-IV in jejunum cells of obese patients with NDM2 and T2DM. So, mRNA levels of these genes of interest were assessed to determine the molecular basis of incretin secretion intended for the metabolic alterations in morbidly obese subjects who underwent bariatric surgery.

## Materials and Methods

### Samples

Proximal jejunum mucosal samples were obtained from 20 OB NDM2 patients (control group) and 18 OB T2DM patients, who underwent bariatric surgery in COM/PUCRS, Brazil. A section of the jejunum about 60 cm distal to the ligament of Treitz was removed from OB NDM2 patients and a section about 100 cm from T2DM OB patients. Proximal

jejunum mucosal samples of nine NOB and NDM2 patients (eutrophic control) were collected 30 cm distal to the ligament of Treitz, as in a routine endoscopic investigation. Experiments were approved by the ethics committee of the Federal University of Rio Grande do Sul (no. 2007949), and all subjects were informed on the aim of the study and signed the informed consent form.

### Analysis of Human Gene Expression

The collected samples were immediately immersed in TRIzol reagent (Invitrogen, Darmstadt, Germany). Approximately 2  $\mu\text{g}$  of total RNA was added to each cDNA synthesis reaction using the SuperScript II-TEN preamplification system (Invitrogen). Reactions were performed at 42 °C for 1 h using the first T23V (5'TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTV). Reverse transcription quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) amplification was carried out using specific primer pairs for proglucagon (precursor of GLP-1), GIP, DPP-IV, prohormone convertase (PC1/3) primers “a” and “b,” and the internal control  $\beta$ -actin. We reported that the primers of PC1/3, selected by GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) did not detect the mRNA of PC1/3 in all patients. We tested two primers (indicated a and b) that were able to anneal and amplify the cDNA produced in some patients (Table 1). RT-qPCRs were carried out in an Applied Biosystem-7500 real-time cyclor. Reaction settings comprised an initial denaturation step of 5 min at 95 °C, followed by 40 cycles of 15 s at 95 °C, 10 s at 60 °C, 15 s at 72 °C, and 35 s at 60 °C; samples were held for 15 s at 95 °C for annealing and then heated for 1 min to 60 °C with a ramp of 0.1 °C/s to acquire data to produce the denaturing curve of the amplified products. RT-qPCRs were carried out in a final volume of 20  $\mu\text{l}$ , composed of 10  $\mu\text{l}$  reverse transcript of each sample diluted 10 to 100 times, 2  $\mu\text{l}$  of 10 $\times$  PCR buffer, 1.2  $\mu\text{l}$  of 50 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.1  $\mu\text{l}$  of 5 mM dNTPs, 0.4  $\mu\text{l}$  of 10  $\mu\text{M}$  primer pairs, 4.25  $\mu\text{l}$  of water, 2.0  $\mu\text{l}$  of SYBR Green (1:10,000 Molecular Probe), and 0.05  $\mu\text{l}$  of Platinum Taq DNA Polymerase (5 U/ $\mu\text{l}$ ) (Invitrogen).

### Gene Sequencing of PC1/3

Samples were sequenced by ACTGene Análises Moleculares Ltd. (*Centro de Biotecnologia*, UFRGS, Porto Alegre, Brazil) using the automatic sequencer ABI Prism 3100 Genetic Analyzer armed with 50-cm capillary sets and POP6 polymer (Applied Biosystems). DNA templates (60 ng) were labeled with 2.5 pmol of the primer (PC1/3, Table 1) and 3 ml of BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100 (Applied Biosystems) in a final volume of 10 ml. Labeling reactions were performed in a GeneAmp PCR System 9700 thermocycler (Applied Biosystems) with an initial denaturing step of 96 °C for 3 min followed by 25 cycles of 96 °C for

**Table 1** Oligonucleotides used in RT-qPCR reactions, 5' to 3'

Gene	Forward primer	Reverse primer
$\beta$ -Actin	5' CCACGAAACTACCTTCAACTCC 3'	5' TCATACTCCTGCTGCTGCTTGCTGATCC 3'
PC1/3 a	5' GACCTCTTCTCAGCCAGAGC 3'	5' GACACCAGGGTGTTCCTT 3'
PC1/3 b	5'AGAGGGGTGGAGAAGATGGT3'	5' GCTTTGGCGGTGAGTTTTTA 3'
GIP	5' AACCCAGCGATGAAGATTT 3'	5' TGAGGCAGGTGCTAAGTGAA 3'
Proglucagon	5' GCCAGGGACTTTATAAACTGGT 3'	5' AAGCAATGTGGCCTCAGAAT 3'
DPP-IV	5' TCCTTATTCATGGAACAGCAGA 3'	5' TGAAGTGGCTCATGTGGGTA 3'

10 s, 55 °C for 5 s, and 60 °C for 4 min. Labeled samples were purified by 75 % isopropanol precipitation followed by 60 % ethanol rinsing. Precipitated products were suspended in 10 ml Hi-Di formamide (Applied Biosystems), denatured at 95 °C for 5 min, ice-cooled for 5 min, and electroinjected in the automatic sequencer. Sequencing data were collected using Data Collection v 1.0.1 software (Applied Biosystems) designed with the following parameters: Dye Set “Z,” Mobility File “DT3100POP6{BDv3}v1.mob,” BioLIMS Project “3100\_Project1,” Run Module 1 “StdSeq50\_POP6\_50cm\_cfv\_100,” and Analysis Module 1 “BC-3100SR\_Seq\_FASTA.saz.”

#### Incubation with High Glucose

Samples were collected during surgery and were immediately immersed in ice-cold Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) with 0.65 mM dithiothreitol (DCT, Sigma), 1 % bovine serum albumin (BSA; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 10 ml/l penicillin/streptomycin (Sigma), 9.05 mM NaHCO<sub>3</sub> (Synthi), and 20 mM HEPES (Sigma) [23]. Sliced sample (400  $\mu$ m) produced in chopper, was washed in a 12-well culture plate containing 1 ml of the same solution per well. After removing the HBSS, 1 ml of DMEM (Gibco) was added supplemented with 10 ml/l penicillin/streptomycin, 1 mg/ml hydrocortisone (Sigma), 4 ng/ml insulin (Sigma), 5 ng/ml nerve growth factor (Sigma), and 0.1 % BSA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) [23] without (control) or with 11 mM glucose. Slices were incubated for 2 h at 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub>. Each treatment was incubated in triplicate. After incubation, the medium was removed and 300  $\mu$ l of TRIzol was added for RNA extraction.

#### Gene Expression Analysis

We quantified gene expression using the 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> (threshold cycle) method [24]. For each sample, analyzed in quadruplicate, a  $\Delta$ Ct value was obtained by subtracting the  $\beta$ -actin Ct value from the Ct of the gene of interest. OB NDM2 (control group) patients were used as the calibrator group. All genes were analyzed taking this patient group as a reference, to calculate the relative  $\Delta\Delta$ Ct for each gene.

#### Immunohistochemistry

Samples were collected during surgery and were immediately immersed in ice-cold HBSS with 0.65 mM dithiothreitol (DCT, Sigma), 1 % BSA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 10 ml/l penicillin/streptomycin (Sigma), 9.05 mM NaHCO<sub>3</sub> (Synthi), and 20 mM HEPES (Sigma) [23]. Subsequently, the tissue was fixed with 4 % paraformaldehyde (Sigma) for 2 h at room temperature and washed six times for 10 min with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4). Then, the tissues were embedded in a freezing medium (Tissue-Tek) and cut in a cryostat (Leica). On glass slides, the tissues following were permeabilized with PBS supplemented with 1 % Triton X-100 for 3 h at room temperature. For primary incubation, the GIP and GLP-1 antibodies were used at 1:3,000 dilution in PBS plus 1 % Triton X-100 overnight. Afterwards, the slices were washed with PBS plus 1 % Triton X-100 for 2 h and divided into six washes for 20 min. Finally, the slices were incubated in the dark for 1 h at 37 °C with the secondary antibodies diluted at 1:500 in PBS plus 1 % Triton X-100, conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) for GIP (green fluorescence) and rhodamine for GLP-1 (red fluorescence). The slices were washed for 2 h, and soon, the laminas were mounted with UltraCruz™ Mounting Medium. The image was observed under a fluorescence microscope (Olympus IX70). Quantification of immunohistochemical content was assessed by the Cell-M program and was expressed in arbitrary values.

#### Statistical Analysis

Statistical analysis of anthropometric and biochemical parameters of OB NDM2 and T2DM patients were calculated using the independent-samples *T* test with representation of standard deviation ( $\pm$ SD). Glucose levels only were calculated using the nonparametric Mann-Whitney *U* test, with 95 % confidence interval. Mean glucose levels in the blood pre- and postsurgery were compared using the paired-samples *T* test with a significance value of  $p \leq 0.05$ .

Exponential median values for each gene mRNA expression and immuno content, in the jejunum, were compared

between the two patient groups using the nonparametric Mann-Whitney *U* test, with 95 % confidence interval.

## Results

Individuals who participated in the study were divided into two groups: NDM2 and T2DM, characterized in Table 2. All analyses quantify the mRNA expression in the jejunum of these patients. We observed no statistical difference in mRNA expression of proglucagon, GIP, and DPP-IV between obese NDM2 and T2DM patients (Table 3). However, the obese T2DM subjects presented significantly low PC1/3 mRNA expression, when we analyzed this expression with both primers. Many patients (36.5 %) did not expressed mRNA of PC1/3 at these conditions. We confirm by gene sequencing that the cDNA generated in the jejunum of obese NDM2 and T2DM patients is 99 % similar with human PC1/3 variables.

The study of eutrophic individuals demonstrated that the jejunum at 30 cm from the Treitz ligament expresses only GIP (median 0.641 (0.061–119.19) and DPP-IV (median 1.577 (0.004–25.99) mRNA.

Immunohistochemistry revealed intracellular presence of GIP and GLP-1 in the jejunum sections 60 and 100 cm distal of the ligament of Treitz in both patient groups. Only the cells K and L were immunoreactive for GIP and GLP-1, respectively (Fig. 1). Moreover, GIP and GLP-1 immuno contents of the jejunum of T2DM patients revealed to be significantly less compared those of NDM2 patients' jejunum (Table 4).

As shown in Table 5, high glucose levels stimulated PC1/3 mRNA expression, in the jejunum section in T2DM. Also, after incubation with high glucose, the immuno contents of GLP-1 jejunum cells of T2DM patients increased significantly (Table 4). We observe that the values reach like those of NDM2 subjects. The immuno contents of GIP increased significantly in the NDM2 group after 2 h of glucose incubation, but remained low in the T2DM group.

## Discussion

Obesity is a pathological state that involves other comorbidities, in particular T2DM [25]. OB and T2DM individuals have shown an immediate improvement in the levels of glucose after the surgical procedure, which allowed a reduction in the administration of antidiabetic drugs [1, 2, 4, 26–28] before weight loss [9]. There is an anatomical change in the gastrointestinal tract of individuals who undergo surgery, and this would involve the secretion of peptides associated with insulin secretion, such as GIP and GLP-1 [29]. After surgery, the jejunum receives previously ingested food, and we assume that this will stimulate cells for transcription, synthesis, release, and inactivation of incretins.

**Table 2** Anthropometric and biochemical parameters of morbidly obese NDM2 and T2DM patients

Data	NDM2 group (n=20)	T2DM group (n=18)
Age (years) <sup>a</sup>	33.88±9.84	46.67±10.23
BMI (kg/m <sup>2</sup> ) <sup>a</sup>	50.43±9.54	53.41±8.37
Waist (cm) <sup>a</sup>	135.64±14.31	140.89±15.62
Hip (cm) <sup>a</sup>	145.36±11.28	150.89±12.97
HDL (mg/dl) <sup>a</sup>	48.25±12.83	51.33±15.23
LDL (mg/dl) <sup>a</sup>	112.43±28.91	124±38.12
TG (mg/dl) <sup>a</sup>	136.5±62.44	174.67±43.41
CT (mg/dl) <sup>a</sup>	188.69±31.33	215.44±37.46
Glucose (mg/dl) <sup>b</sup>	92.5 (85.42–99.69)	111 (83.8–206.4)
Insulin(μU/ml) <sup>a</sup>	44.1±45.88	27.6±12.01

<sup>a</sup>Data show mean±SD

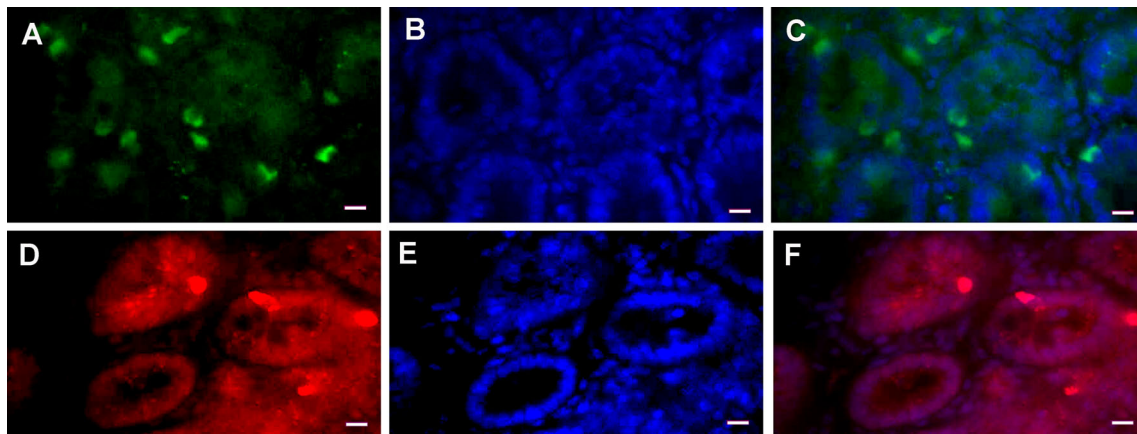
<sup>b</sup>Data show median (95 % confidence interval)

It is related that OB patients present low release of GLP-1 compared with NOB patients, when the jejunum has contact with the food [3, 30, 31]. Therefore, our team of surgeons removed 60- and 100-cm sections of the bowel of obese NDM2 and T2DM patients, respectively, in order to improve the secretion of incretins, especially GLP-1. It is proposed that this procedure improves T2DM clinical parameters [3, 10]. Initially, in basal conditions, we observed that the jejunum mucosal cells of NDM2 and T2DM patients expressed no different relative proglucagon, GIP, and DPP-IV mRNA levels. Thus, diabetes control cannot be justified by the mRNA levels of proglucagon, GIP, and DPP-IV in proximal jejunum cells, or else, this is not justified by the transcriptional

**Table 3** GIP, proglucagon, DPP-IV, and PC1/3 mRNA expression in the jejunum of morbidly obese NDM2 and T2DM subjects

Gene	NDM2 (n=20)	T2DM (n=18)	<i>P</i> value
GIP	1.9 (0.01–37.56) n=17	1.22 (0.10–33.73) n=12	NS
Proglucagon	0.8 (0.2–16.27) n=14	1.6 (0.08–5.24) n=13	NS
DPP-IV	3.42 (0.001–49.19) n=16	1.99 (0.08–14.03) n=15	NS
PC1/3 a	1.06 (0.45–21.01) n=8	0.2 (0.14–4.74) n=7	<i>p</i> =0.014
PC1/3 b	1.02 (0.78–1.25) n=3	0.55 (0.17–0.92) n=6	<i>p</i> =0.048

Sections 60 and 100 cm from the Treitz ligament were obtained from obese NDM2 and T2DM patients, respectively. Samples were collected during surgery and were immediately immersed in TRIzol reagent. To compare the expression pattern of mRNA in the jejunum of obese NDM2 and T2DM subjects, figures were normalized against β-actin (ΔCt) and calibrated against the mean of NDM2 mRNA patients (2<sup>-ΔΔCt</sup>). To compare NDM2 and T2DM, *p* values were calculated using the nonparametric Mann-Whitney *U* test. Values were expressed as median and 95 % confidence interval. Statistical significance was at *p*≤0.05



**Fig. 1** Representative images of the presence of GIP and GLP-1 in mucosa cells of the jejunum of OB and NDM2 individual. All images were captured with a magnification of  $\times 20$ . Sample processing is described in “Materials and Methods.” **a** and **d** represent the fluorescent

marking of GIP (green) and GLP-1 (red), respectively, within the endocrine granules. **b** and **e** show labeling in the nuclei (blue). **c** and **f** demonstrate the merged images: **a** and **b**, **d** and **e**. Scale 50  $\mu\text{m}$

control of these genes. However, the bioactivation of incretins may be the focus of investigation because approximately 39 % of all patients do not express PC1/3 mRNA in the jejunum. We confirmed by gene sequencing that the cDNA generated in the jejunum of obese NDM2 and T2DM patients was 99 % similar to human PC1/3. Failure to detect any signal in other patients may be the result of mutations in the annealing region of the primer or of other mRNA gene processing of PC1/3. A gene mutation codifying a human congenital PC1/3 deficiency has been described; the syndrome is characterized by obesity and small intestine dysfunction [15, 32–35]. Jackson et al. [34, 35] and Frank et al. [31], suggested that this gene mutation caused a failure of enzyme maturation. These results show that PC1/3 has an important role in human metabolic

and endocrine disease. Decreased signal or mutation of PC1/3 could play a key role in the pathophysiological basis of incretin deficiency in obese T2DM patients, because this enzyme is responsible for the bioactivation of proglucagon and GIP precursor. In addition, T2DM patients with a functional gene expression showed a decreased PC1/3 mRNA expression in basal conditions compared to those with NDM2. This fact may explain a posttranslational control of GLP-1 and GIP levels in diabetic patients. In analyzing mRNA expression of eutrophic subjects, it was only the expression of GIP and DPP-IV was observed. There was no signal for proglucagon and PC1/3 mRNA in this region of the jejunum. This is a molecular justification to the surgical cut to be greater than 60 cm distal of the ligament of Treitz.

**Table 4** Immuno content of GIP and GLP-1 in jejunum cells of obese NDM2 and T2DM patients, at time 0 and after incubation with or without high glucose for 2 h

	$t=0$	Control	High glucose
GIP			
NDM2	59.3 (47.0–97.0)	93.43 <sup>a</sup> (73.84–115.88)	122.5 <sup>a,b</sup> (107.5–153.7)
T2DM	45.54 <sup>c</sup> (29.16–61.2)	57.7 <sup>a,c</sup> (35.2–153.3)	57.5 <sup>c</sup> (27.9–172.7)
GLP-1			
NDM2	71.83 (51.4–133.4)	98.8 (74.13–114.13)	119 <sup>a</sup> (71.5–164.5)
T2DM	49.08 <sup>c</sup> (37.10–70)	66.03 <sup>a,c</sup> (42.23–96.27)	82.22 <sup>a,b,c</sup> (46.87–123.08)

Sections at 60 and 100 cm from the Treitz ligament were obtained from obese NDM2 ( $n=20$ ) and T2DM ( $n=18$ ) patients, respectively. Proximal jejunum samples collected during surgery were analyzed at time 0 ( $t=0$ ) either incubated with or without 11 mM glucose for 2 h. Each analysis was performed in triplicate. After, the tissues were fixed with paraformaldehyde, embedded in a freezing medium, cut in a cryostat, and incubated with primary and secondary antibodies (see “Materials and Methods”). The secondary antibodies were conjugated with FITC for GIP (green fluorescence) and rhodamine for GLP-1 (red fluorescence). The image was observed under a fluorescence microscope (Olympus IX70). Quantification of immunohistochemical content was assessed by the Cell-M program, and it was expressed in arbitrary values. To compare glucose treatment with control and  $t=0$ ,  $p$  values were calculated using the nonparametric Mann-Whitney  $U$  test. Values were expressed as median and 95 % confidence interval. Statistical significance was at  $p \leq 0.05$

<sup>a</sup> Statistically different from  $t=0$   
<sup>b</sup> Statistically different from control  
<sup>c</sup> Statistically different from NDM2

**Table 5** GIP, proglucagon, DPP-IV, and PC1/3 mRNA expression in the jejunum of obese NDM2 and T2DM patients after incubation with or without high glucose for 2 h

Gene		Control	High glucose
PC1/3	NDM2	0.85 (0.10–10.16)	0.6 (0.3–0.6)
	T2DM	0.95 (0.41–1.51)	15.69 (6.47–21.16)*
DPP-IV	NDM2	1.22 (0.10–39.77)	0.25 (0.11–0.70)
	T2DM	0.79 (0.28–1.66)	1.94 (0.19–8.53)
Proglucagon	NDM2	0.74 (0.12–18.87)	0.43 (0.29–0.76)
	T2DM	1.21 (0.16–2.01)	0.69 (0.33–0.98)
GIP	NDM2	0.9 (0.10–13.12)	1.24 (0.33–2.22)
	T2DM	1.5 (0.23–2.36)	0.43 (0.09–0.74)

Sections at 60 and 100 cm from the Treitz ligament were obtained from obese NDM2 ( $n=20$ ) and T2DM patients ( $n=18$ ) patients, respectively. Proximal jejunum samples collected during surgery were incubated with or without 11 mM glucose (see “Materials and Methods”). Each treatment was incubated in triplicate. After incubation, the medium was removed and TRIzol was added for RNA extraction. To compare the expression pattern of mRNA in the jejunum of obese NDM2 and T2DM subjects, figures were normalized against  $\beta$ -actin ( $\Delta$ Ct) and calibrated against the mean of control treatment mRNA ( $2^{-\Delta\Delta$ Ct}). To compare glucose treatment and control,  $p$  values were calculated using the nonparametric Mann-Whitney  $U$  test. Values were expressed as median and 95 % confidence interval

\* $p \leq 0.05$  (statistically significant)

It has already been reported that bariatric surgery normalized glucose serum levels in T2DM patients [4, 36, 37], and this was observed in our patients 3 months later. After surgery, the food acts directly on cells of the jejunum located 60–100 cm from the ligament of Treitz. Thus, food components, such as glucose, can modulate the synthesis and release of incretins. We observed that higher concentrations of glucose (11 mM) significantly increased in vitro the mRNA expression of the enzyme PC1/3 in jejunum cells. This could explain the major GLP-1 secretion after surgery in T2DM patients and the improvement of glycemia [3, 4, 22]. This could be by PC1/3 bioactivation of GLP-1, which stimulates insulin secretion, through the entero pancreatic axis [38].

Quantification of intracellular immuno contents, at the moment of surgery, proved that T2DM patients present less bioactive GIP and GLP-1 than those with NDM2. This result corroborates with the low PC1/3 mRNA expression found in these patients at this time. The in vitro effect of high glucose in jejunum cells demonstrated an upregulation of the enzyme responsible for the bioactivation of GIP and GLP-1. In our study, jejunum cells stimulated with high glucose increased PC1/3 mRNA expression and intracellular content of GIP and GLP-1 in NDM2 and T2DM patients, respectively.

At basal conditions, in sections 100 cm distal of the ligament of Treitz, jejunum cells received more macronutrients as fatty acids than glucose; in general, carbohydrate digestion and glucose absorption occur before they have passed beyond

the duodenum and upper jejunum [30]. After surgery, digestion of carbohydrates increases glucose concentration in the gut region farther away. A new condition is established: the endocrine jejunum cells suffer new modulation.

In conclusion, obese T2DM presents decreased expression of PC1/3 mRNA in the jejunum that can interfere on the bioactivation of incretins. This low expression could be linked to this mutation or transcriptional control. We suggest that after surgery, T2DM normalizes the GLP-1 levels and glycemia through the direct action of diet components (glucose) on the modulation of PC1/3 in proximal jejunum cells. However, the present study has a limitation: the jejunum sections of the three patient groups were collected at different levels. Therefore, the results could be associated to different cellular distributions of endocrine cells along the human gut. But, based on our findings, we assumed that the region of the human jejunum, from NDM2 and T2DM individuals (60 or 100 cm far from the Treitz ligament, respectively) contains L and K cells because the tissue expressed proGIP and proglucagon mRNA, and we detected immuno content of both insulinotropic peptides. The results suggest that PC1/3, coexpressed with ProGIP and proglucagon in the K and L cells, could determine a difference between the jejunum of the NDM2 and T2DM individuals. In eutrophic patients, the expression of GIP and DPP-IV alone, in the upper small intestine, reveals abundant occurrence of K cells in this region. Further studies are needed to investigate PC1/3 polymorphism for obesity treatment and to clarify the downregulation of PC1/3 expression in diabetic individuals and the nonexpression of this enzyme in some obese individuals.

**Acknowledgments** We thank CNPq for the financial support.

**Conflict of Interest** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Brethauer SA, Aminian A, Romero-Talamás H, et al. Can diabetes be surgically cured? Long-term metabolic effects of bariatric surgery in obese patients with type 2 diabetes mellitus. *Ann Surg.* 2013;258:628–37.
- Abbatini F, Rizzello M, Casella G, et al. Long-term effects of laparoscopic sleeve gastrectomy, gastric bypass, and adjustable gastric banding on type 2 diabetes. *Surg Endosc.* 2010;24:1005–10.
- Salinari S, Bertuzzi A, Guidone C, et al. Insulin sensitivity and secretion changes after gastric bypass in normotolerant and diabetic obese subjects. *Ann Surg.* 2013;257:462–8.
- Jorgensen NB, Jacobsen SH, Dirksen C, et al. Acute and long-term effects of Roux-en-Y gastric bypass on glucose metabolism in subjects with type 2 diabetes and normal glucose tolerance. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012;303:E122–31.
- Beckman LM, Beckman TR, Earthman CP. Changes in gastrointestinal hormones and leptin after Roux-en-Y gastric bypass procedure: a review. *J Am Diet Assoc.* 2010;110:571–84.

6. Beckman LM, Beckman TR, Sibley SD, et al. Changes in gastrointestinal hormones and leptin after Roux-en-Y gastric bypass surgery. *J Parenter Enteral Nutr.* 2011;35:169–80.
7. Varela EJ. Bariatric surgery: a cure for diabetes? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2011;14:396–401.
8. Hamza N, Abbas MH, Darwish A, et al. Predictors of remission of type 2 diabetes mellitus after laparoscopic gastric banding and bypass. *Surg Obes Relat Dis.* 2011;7:691–6.
9. Raghow R. Bariatric surgery-mediated weight loss and its metabolic consequences for type-2 diabetes. *World J Diabetes.* 2013;4(3):47–50.
10. Jacobsen SH, Olesen SC, Dirksen C, et al. Changes in gastrointestinal hormone responses, insulin sensitivity, and beta-cell function within 2 weeks after gastric bypass in non-diabetic subjects. *Obes Surg.* 2012;22:1084–96.
11. Rondas D, D'Hertog W, Overbergh L, et al. Glucagon-like peptide-1: modulator of  $\beta$ -cell dysfunction and death. *Diabetes, Obes Metab.* 2013;15(3):185–92.
12. Ranganath LR. The entero-insular axis: implications for human metabolism. *Clin Chem Lab Med.* 2008;46(1):43–56.
13. Hellstro PM, Slund ENA, Edholm T, et al. GLP-1 suppresses gastrointestinal motility and inhibits the migrating motor complex in healthy subjects and patients with irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil.* 2008;20:649–59.
14. Gautier JF, Fetita S, Sobngwi E, et al. Biological actions of the incretins GIP and GLP-1 and therapeutic perspectives in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Metab.* 2005;31:233–42.
15. Martín MG, Lindberg I, Solorzano-Vargas RS, et al. Congenital proprotein convertase 1/3 deficiency causes malabsorptive diarrhea and other endocrinopathies in a pediatric cohort. *Gastroenterology.* 2013;145:138–48.
16. Ducker DJ. Incretin action in the pancreas: potential promise, possible perils, and pathological pitfalls. *Diabetes.* 2013;62:3316–23.
17. Burcelin R, Thorens B. Incretins: what is known, new and controversial in 2013? *Diabetes Metab.* 2013;39(2):89–93.
18. Damholt AB, Bucham AM, Kofod H. Glucagon-like-peptide-1 secretion from canine L-cells is increase by glucose-dependent-insulinotropic peptide but unaffected by glucose. *Endocrinology.* 1998;139:2085–91.
19. Rubino F, Marescaux J. Effect of duodenal-jejunal exclusion in a non-obese animal model of type 2 diabetes a new perspective for an old disease. *Annal of surgery.* 239 (1); 2004.
20. Gautier JF, Fetita S, Sobngwi E, et al. Biological actions of the incretins GIP and GLP-1 and therapeutic perspectives in patients with of type 2 diabetes. *Diabetes Metab.* 2005;31:233–42.
21. Brethauer SA, Aminian A, Romero-Talamás H. Can diabetes be surgically cured? Long-term metabolic effects of bariatric surgery in obese patients with type 2 diabetes mellitus. *Ann Surg.* 2013;258:628–37.
22. Romero F, Nicolau J, Flores L. Comparable early changes in gastrointestinal hormones after sleeve gastrectomy and Roux-En-Y gastric bypass surgery for morbidly obese type 2 diabetic subjects. *Surg Endosc.* 2012;26:2231–9.
23. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method. *Methods.* 2001;25:402–8.
24. Guh DP, Zhang W, Bansback N, et al. The incidence of comorbidities related to obesity and overweight: a systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health.* 2009;9:88.
25. Lee W, Chen C, Chong K. Changes in postprandial gut hormones after metabolic surgery: a comparison of gastric bypass and sleeve gastrectomy. *Surg Obes Relat Dis.* 2011;7:683–90.
26. Lee W, Hur KY, Lakadawala M. Gastrointestinal metabolic surgery for the treatment of diabetic patients: a multi-institutional international study. *J Gastrointest Surg.* 2012;16:45–52.
27. Mottin CC, Padoin AV, Schroer CE, et al. Behavior of type 2 diabetes mellitus in morbid obese patients submitted to gastric bypass. *Obes Surg.* 2008;18:179–81.
28. Falkén Y, Hellstrom PM, Holst JJ. Changes in glucose homeostasis after Roux-en-Y gastric bypass surgery for obesity at day three, two months, and one year after surgery: role of gut peptides. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96:2227–35.
29. Ranganath LR, Beety JM, Morgan LM, et al. Attenuated GLP-1 secretion in obesity: cause or consequence. *Gut.* 1996;38:916–9.
30. Ranganath L, Norris F, Morgan L, et al. Inhibition of carbohydrate-mediated glucagon-like peptide-1 (7-36)amide secretion by circulating non-esterified fatty acids. *Clin Sci.* 1999;96:335–42.
31. Frank GR, Fox J, Candela N, et al. Severe obesity and diabetes insipidus in a patient with PCSK1 deficiency. *Mol Genet Metab.* 2013;110(1–2):191–4.
32. Choquet H, Stijnen P, Creemers JW. Genetic and functional characterization of PCSK1. *Methods Mol Biol.* 2011;768:247–53.
33. Creemers JWM, Choquet H, Stijnen P, et al. Heterozygous mutations causing partial prohormone convertase 1 deficiency contribute to human obesity. *Diabetes.* 2012;61(2):383–90.
34. Jackson RS, Creemers JWM, Ohagi S, et al. Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. *Nat Genet.* 1997;16:303–6.
35. Jackson RS, Creemers JWM, Farooqi IS, et al. Small-intestinal dysfunction accompanies the complex endocrinopathy of human proprotein convertase 1 deficiency. *J Clin Invest.* 2003;112:1550–60.
36. Jiménez A, Casamitjana R, Flores L, et al. GLP-1 and the long-term outcome of type 2 diabetes mellitus after Roux-en-Y gastric bypass surgery in morbidly obese subjects. *Ann Surg.* 2013;257:894–9.
37. Ezcurra M, Reimann F, Gribble FM, et al. Molecular mechanisms of incretin hormone secretion. *Curr Opin Pharmacol.* 2013;13:1–6.
38. Benzinou M, Creemers JWM, Choquet H, et al. Common nonsynonymous variants in PCSK1 confer risk of obesity. *Nat Genet.* 2008;40(8):943–5.



Elsevier Editorial System(tm) for Metabolism  
Manuscript Draft

Manuscript Number: METABOLISM-D-14-00925

Title: Vaccenic acid, a trans fatty acid, increased NFK-B mRNA and immunocontent of incretins but it no stimulated GLP-1 secretion in jejunum proximal of morbdly obese T2DM.

Article Type: Research Paper

Corresponding Author: Ms. Francieli Rohden, MS

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal do Rio Grande do sul

First Author: Francieli Rohden, MS

Order of Authors: Francieli Rohden, MS; Leo Anderson M Martins, Phd; Cíntia S Costa, Ms; Cláudia Tansini, Ms; Rogério Margis, Phd; Alexandre V Padoin, Phd; Cláudio C Mottin, Phd; Regina M Guaragna, Phd

Suggested Reviewers: Bárbara Dal Molin Netto  
barbaradmnetto@gmail.com

Britta Siegmund  
britta.siegmund@charite.de

Juan A. Paniagua González  
japaniguag@yahoo.es

Opposed Reviewers:

Dear reviewers,

Our research introduces new features on the expression of mRNA incretins in jejunal submitted ND2 and DM2 obese bariatric surgery. In vitro study, incubation with fatty acids could alter the expression of GIP and GLP-1 that are closely related to the improvement of diabetes mellitus type 2 after cirurgia obesity. but that the release of this incretin was not affected by treatment with MUFAs. However, the degree of tissue inflammation as indicated by NFk-B leads us to propose that would be directly related to decreased secretion of these hormones.

I declare to view to publication of this article in the magazine that all authors have read and agreed with the results and are aware of the submission of articles for the magazine.

Also declare, considering the ethical commitment that this article has not been published or submitted to any other journal or medium for publication..

Thanks for the opportunity and attention!

Francieli Rohden

And the principal results are:

Vaccenic acid increased proglucagon mRNA in L cells after two hours of treatment.

Oleic acid down regulated DPP-IV mRNA expression in obese NDM2.

Vaccenic increased GLP-1 immune contents but did not increase its secretion.

PPAR- $\gamma$  mRNA expression was low in T2DM jejunum after fatty acid treatment.

T2DM present increased ratio of NFk-B/PPAR $\gamma$  in jejunum.

1 Vaccenic acid, a *trans* fatty acid, increased NFK-B mRNA and immunocontent of  
2 incretins but it no stimulated GLP-1 secretion in jejunum proximal of morbdly obese  
3 T2DM.

4

5 Francieli Rohden MS<sup>1</sup>; Leo Meira PhD<sup>1</sup>; Cíntia Santos Costa, MS<sup>1</sup>; Claudia Tansini  
6 MS<sup>1</sup>; Rogério Margis PhD<sup>2</sup>; Alexandre V Padoin PhD<sup>3</sup>; Cláudio C Mottin PhD<sup>3</sup>; Regina  
7 Maria Guaragna PhD<sup>1</sup>.

8 <sup>1</sup> Departamento de Bioquímica, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

9 <sup>2</sup> Departamento de Biofísica, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

10 <sup>3</sup> Centro de Obesidade e Síndrome Metabólica, Hospital São Lucas, PUCRS, Porto  
11 Alegre, RS, Brazil.

12

13 Correspondence to:

14 Regina Maria Guaragna

15 Address: Departamento de Bioquímica. ICBS. UFRGS.

16 Rua Ramiro Barcelos 2600 – anexo

17 CEP 90.035-003. Porto Alegre. RS. Brazil.

18 e-mail: [rguaragna@terra.com.br](mailto:rguaragna@terra.com.br)

19 Tel: 55 51 3308 5546 or 55 51 3308 5539

20 FAX number: 55 51 3308 5540

21

22

23

24

25

26

27 Abstract

28 Bariatric surgery associated with food quality is effective in the improvement for  
29 obesity and its comorbidities, particularly Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM).

30 Objectives: To evaluate the in vitro effects of MUFAS on mRNA expression,  
31 immunocontent and secretion of incretins as well as the relation between PPAR $\gamma$  and  
32 NFk-B expression in intestinal cells of obese patients undergoing bariatric  
33 surgery. Methodology: intestinal mucosa samples were collected during surgery and  
34 were incubated with oleic, elaidic and vaccenic acid. This tissue was analyzed by real-  
35 time PCR, immunohistochemistry and ELISA. Results: Vaccenic acid stimulated GIP  
36 mRNA expression in jejunum of obese NDM2 (p = 0.041) and increased proglucagon  
37 mRNA expression in obese NDM2 (p= 0.041) and T2DM (p = 0.02). Oleic acid down  
38 regulated DPP-IV mRNA expression in obese NDM2 (p = 0.045). Vaccenic  
39 significantly increased GLP-1 immune contents but did not increase its secretion.  
40 PPAR- $\gamma$  mRNA expression was low in T2DM jejunum after fatty acid treatment and  
41 T2DM present increased ratio of NFk-B/PPAR $\gamma$  in jejunum. Conclusion: T2DM has a  
42 jejunum proinflammatory state that is increased with vaccenic acid. Vaccenic acid  
43 increased intracellular content of GLP-1 but did not stimulate its secretion. This fatty  
44 acid decreased the content of GIP in both patients jejunum group.

45

46 Key words: obese, incretins, bariatric surgery, metabolic syndrome, fatty acid.

47

48

49

50

51

- 52 Abbreviations
- 53 T2DM - type 2 diabetes mellitus
- 54 MUFA - monounsaturated fatty acid
- 55 mRNA - messenger RNA
- 56 PPAR $\gamma$  - peroxisome proliferator activated gamma
- 57 NF $\kappa$ -B - nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
- 58 PCR - polymerase chain reaction
- 59 GIP - glucose-dependent insulintropic peptide
- 60 GLP-1 - glucagon-like peptide-1
- 61 PC 1/3 - prohormone convertase 1/3
- 62 IL-1 - interleukin-1
- 63 TNF - tumor necrosis factor
- 64 TFA - *trans* fatty acid
- 65 DPP-IV - dipeptidyl-peptidase amino peptidase IV
- 66
- 67
- 68
- 69
- 70
- 71
- 72
- 73
- 74
- 75
- 76

77 1 Introduction

78           The number of obese or overweight increased by 70% in three decades. Half of  
79 obese people in the world are concentrated in 10 countries, precisely those with large  
80 population masses, such as India, China and Brazil; and the United States top the list  
81 [1]. The obesity is a major risk factor for cardiovascular disease and is directly linked to  
82 the development of type 2 diabetes mellitus (T2DM) [2]. Gonzalez, 2010 comments that  
83 obesity and overweight are related to various causes of death [3].

84           In individuals with severe obesity ( $BMI \geq 40 \text{Kg/m}^2$ ), bariatric surgery is the most  
85 effective therapeutic option for reduction of weight and its attendant complications, like  
86 type 2 diabetes [4-6]. This can be explained by the redirection of intestine and exclusion  
87 of part of the gastro-intestinal tract (duodenum and proximal jejunum which has  
88 important endocrine activity [7,8].

89           K-cells and enteroendocrine L-cells are responsible for secretion of incretins  
90 glucose-dependent insulintropic peptide (GIP) and glucagon-like peptide-1 (GLP-1).  
91 These peptides are key modulators of insulin secretion, glucose homeostasis, and gastric  
92 emptying [9,10].

93           The pro-GIP gene, expressed in K cells, is secreted in the bioactive form (GIP)  
94 into a part of the duodenum and proximal jejunum [11]. It induces the release of insulin  
95 by pancreatic  $\beta$ -cells, acting as mediators of the entero-insular axis. GLP-1 is a product  
96 of post-translational cleavage of the peptide pro-glucagon, synthesized and released by  
97 L-cells of the ileum, colon, rectum, pancreatic  $\alpha$ -cells and nervous system [12].

98           GIP and GLP-1 are secreted by these specialized cells, in response to food  
99 stimulus, especially glucose and fatty acids [13] in the small intestine [14]. These  
100 peptides require cleavage of an arginine residue to become bioactive, and this is carried  
101 out by the prohormone convertase 1/3 (PC1/3) [15]. These hormones have a very short

102 t<sub>1/2</sub>, 1-2 min, after which they are inactivated by the enzyme dipeptidyl-peptidase  
103 amino peptidase IV (DPP-IV), responsible for breakage at the N terminal that inhibits  
104 binding with the peptide receptor [11,16].

105 It is known that obesity is associated with an inflammatory state, and it is suggested that  
106 inflammation could be involved in pathophysiological developing T2DM [17]. The  
107 number of studies is increasing and significant evidence shows that nuclear factor  
108 kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-κB) is an important pathogenic  
109 mediator in on inducing obesity and the development of insulin resistance [18]. NF-κB  
110 has been considered as a way of pro-inflammatory signaling to be activated by  
111 proinflammatory cytokines, such as interleukin (IL-1) and tumor necrosis factor (TNF).  
112 Accordingly, selective inhibition of the NF-κB function in liver and adipose tissue  
113 protects against insulin resistance in animals nutritional and genetic models of obesity  
114 [19].

115 The peroxisome proliferator activated (PPARs) receptors are transcriptional  
116 factors that belongs to the family of nuclear receptors. They are characterized by their  
117 pattern of tissue distribution by such metabolic function. [21]. Although PPARs are  
118 involved in the development of adipose tissue, evidence indicates that their activation is  
119 linked to increased sensibility to insulin [22]. Study of intestinal inflammation in mice  
120 shows that PPAR-γ, inhibit the expression of several cytokines in monocytes and  
121 macrophages primarily by inhibiting the NF-κB activation [20].

122 The patient jejunum, after surgery, receives ingested food at distance 60-100 cm  
123 of the ligament of Treitz, which stimulates cells for transcription, synthesis, releasing  
124 and inactivation of incretins, because these are physiologically stimulated by physical  
125 contact with the food in the intestinal lumen [23,24] . However, little is known about the  
126 effect of food on production, release and activation of these incretins in jejunum of



127 obese non type 2 diabetes mellitus (NDM2) and obese type 2 diabetes mellitus (T2DM).  
128 It is possible that after surgery, fatty acids, glucose and other elements of the foods can  
129 directly modulate the K and L-cells of the jejunum medium to release GIP and GLP-1 in  
130 the serum of healthy and T2DM individuals [25].

131         The aim of this work was to study the effect of commons fatty acids found in the  
132 diet on production, release and activation of jejunum incretins. Among fatty acids, three  
133 are particularly important: oleic acid, a monounsaturated *cis*-chain (18:1 *9cis*) fatty acid,  
134 elaidic acid, a monounsaturated fatty acid with a *trans* configuration (C18: 1 9 *trans*),  
135 that is obtained from the industrial hydrogenation of oleic fatty acid, and vaccenic acid  
136 (C18:1 11*trans*), found naturally in ruminant fats produced by microbial hydrogenation  
137 activity in the rumen. The least is the major trans-monounsaturated fatty acid in  
138 ruminant fat food products (milk, yoghurt, cheese, butter and meats). Different fatty  
139 acids and glucose in the diet can initiate the response of incretins, eg. gastric inhibitory  
140 polypeptide (GIP) and glucagon-like peptide 1 (GLP-1), in the serum of healthy and  
141 T2DM individuals [23,24,26].

142         In summary, the aim of this study was to evaluate the effect of cis or trans  
143 monounsaturated fatty acids on GIP, proglucagon, PC1/3 and DPP-IV mRNA  
144 expression and intracellular content, as well as release of GIP and GLP1 in proximal  
145 jejunum cells of the NDM2 and T2DM morbidly obese. Moreover, to evaluate mRNA  
146 expression of the genes of PPAR- $\gamma$  and NFk-B in tissue.

147

## 148 2 Materials and Methods

### 149 2.1 Samples

150         Proximal jejunum mucosa samples were obtained from 15 morbidly obese  
151 NDM2 patients and from 15 morbidly obese T2DM patients who underwent bariatric

152 surgery at COM/PUCRS, Brazil. Experiments were approved by the ethical committee  
153 of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (n° 2007949), and all subjects were  
154 informed about the aim of the study and signed the informed consent form. Obese  
155 patients NDM2 had the section of the jejunum at 60 cm from the Treitz ligament and  
156 obese T2DM had the section at 100 cm.

157         The weight of these patients was stable over at least the last year and they had  
158 good health despite obesity. The extensive clinical and laboratory data routinely  
159 collected for each patient is shown in Table 1.

160

## 161         2.2 Incubation of the jejunum with fatty acids

162         Samples were collected during surgery and were immediately immersed in ice-  
163 cold HBSS with 0.65 mm dithiothreitol (DCT; Sigma), BSA (Sigma Chemical Co., St.  
164 Louis, MO) 1%, penicillin/streptomycin (Sigma) 10 mL/liter, NaHCO<sub>3</sub> (Synthi) 9.05  
165 mm, hepes (Sigma) 20 mm [27]. Slices 400µm thick were produced in a McILWAIN  
166 Tissue Chopper [28], and washed in a 12-well culture plate containing 1mL of the same  
167 solution per well.

168         After removing the HBSS the slices were incubated with 1mL of DMEM  
169 (Gibco) supplemented with penicillin/streptomycin 10 mL/liter, hydrocortisone (Sigma)  
170 1mg/mL, insulin (Sigma) 4 ng/mL, nerve growth factor (Sigma) 5ng/ml, BSA (Sigma  
171 Chemical Co., St. Louis, MO) 0.1% without (control) or with 50 µM of oleic acid  
172 (C18:1 *9c*), or elaidic acid (C18:1 *9t*), or vaccenic acid (C18:1 *11t*) [27]. Slices were  
173 incubated either for 15, 30, 120 or 240 min at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Each fatty acid  
174 treatment was incubated in triplicate.

175

## 176         2.3 Cellular viability

177 Cell viability was evaluated by MTT assay, a colorimetric assay based on the  
178 ability of viable cells to reduce a soluble yellow tetrazolium salt [3-(4,5-  
179 dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyl tetrazolium bromide] (MTT) (Sigma Inc., Saint  
180 Louis, MO, USA) to a blue formazan crystal by mitochondrial succinate dehydrogenase  
181 activity. The MTT assay assesses cell viability by measuring cellular redox  
182 environment.

183 Slices jejunum tissue were incubated without (control) or with fatty acids like  
184 cited before. The cellular viability of these slices was determined at zero, 2 and 4 hours  
185 of incubation with 1 mg/mL MTT. When the cellular viability was decreased blue  
186 crystals were formed. They were dissolved in dimethyl-Sulfoxide (DMSO, Sigma Inc.,  
187 Saint Louis, MO, USA) and the absorbance was measured at 560 and 650 nm using a  
188 spectrophotometric micro titer plate reader (Spectra Max 190, Molecular Devices).

189

#### 190 2.4 Analysis of human gene expression

191 After incubation the medium was removed and the tissue sample was  
192 immediately immersed in 300 µl of TRIzol reagent (Invitrogen, Darmstadt, Germany)  
193 for RNA extraction. Approximately 2 µg of total RNA were added to each cDNA  
194 synthesis reaction using the SuperScript II-TEN preamplification system (Invitrogen).  
195 Reactions were performed at 42°C for 1h using the first T23V (5 'TTT TTT TTT TTT  
196 TTT TTT TTT TTV). Quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) amplification  
197 was carried out using specific primer pairs for proglucagon (precursor of GLP-1), GIP,  
198 dipeptidilpeptidase-IV (DPP-IV), prohormone convertase (PC1/3), PPAR-γ, NFK-β and  
199 internal control β-actin. The sequences of the primers used are listed in Table 2. qRT-  
200 PCRs were carried out in an Applied Biosystem-7500 real-time cycler. Reaction  
201 settings were composed of an initial denaturation step of 5 minutes at 95°C, followed by

202 40 cycles of 15 s at 95°C, 10s at 60°C, 15s at 72°C and 35s at 60°; samples were held  
203 for 15s at 95°C for annealing and then heated from 1 minute to 60°C with a ramp of  
204 0.1°C/s to acquire data to produce the denaturing curve of the amplified products. qRT-  
205 PCRs were carried out in 20µl final volume composed of 10µl reverse transcription of  
206 each sample diluted 40 to 100 times, 2µl of 10x PCR buffer, 1.2µl of 50mM MgCl<sub>2</sub>,  
207 0.1µl of 5mM dNTPs, 0.4µl of 10µM primer pairs, 4.25µl of water, 2.0µl of SYBR  
208 green (1:10.000 Molecular Probe), and 0.05µl of Platinum Taq DNA polymerase (5  
209 U/µl) (Invitrogen).

210

## 211 2.5 Gene expression analysis

212 We quantified gene expression using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (threshold cycle) method [29].  
213 For each sample, analyzed in quadruplicate, a  $\Delta Ct$  value was obtained by subtracting  
214 the  $\beta$ -actin CT value from the CT of the gene of interest. NDM2 control group (NDM2  
215 obese jejunum without treatment) was used as the calibrator group. All genes were  
216 analyzed taking this experimental group as a reference, to calculate the relative  $\Delta\Delta Ct$   
217 for each gene.

218

## 219 2.6 Immunohistochemistry

220 After jejunum incubation with fatty acids the medium was removed and the  
221 tissue sample was immediately fixed with 4% paraformaldehyde (Sigma) for 2 hours at  
222 room temperature and then washed six times for 10 minutes with PBS pH 7.4. Then, the  
223 tissues were crioprotected with 30% sucrose were embedded in freezing medium  
224 (Tissue-Tek) and cut in a cryostat (Leica). On glass slides, the tissues following were  
225 permeabilized with PBS supplemented with 1% Triton X-100 for 3 hours at room  
226 temperature. For primary incubation the GIP and GLP-1 antibodies (Santa Cruz) were

227 used at 1:3000 dilution in PBS plus 1% Triton-X100 overnight. Afterwards, the slices  
228 were washed with PBS plus 1% Triton X-100 for 2 hours, divided into six washes of 20  
229 minutes. Finally, the slices were incubated in the dark for 1 hour at 37°C with the  
230 secondary antibodies diluted 1:500 in PBS plus 1% Triton X-100 conjugated with  
231 fluorescein isothiocyanate (FITC) for GIP (green-fluorescent) and rhodamine for GLP-1  
232 (red-fluorescent). The slices were washed for 2 hours and soon the laminas were  
233 mounted with UltraCruz<sup>TM</sup> Mounting Medium, containing DAPI nuclei marker (blue).  
234 The image was observed under a fluorescent microscope (Olympus IX70).  
235 Quantification of immunohistochemical content was assessed by the Cell-M program  
236 and was expressed in arbitrary values.

237

## 238 2.7 Enzyme Immunoassay - EIA

239 GIP and GLP-1 released from jejunum tissue into the culture medium increased  
240 by inhibitor of DPP-IV (10 $\mu$ M), KR-62436 hydrate Sigma, was detected by Enzyme  
241 Immunoassay. We used the protocol indicated by the manufacturer (General Protocol  
242 for Enzyme Immunoassay Kit - Phoenix Pharmaceuticals, Inc.). The spectrophotometric  
243 reading was made in micro titer plate reader (Spectra Max 190, Molecular Devices).

244

## 245 2.8 Statistical analysis

246 Statistical analysis of anthropometric and biochemical parameters of morbidly  
247 obese patients NDM2 and T2DM were calculated using the independent sample test-T  $\pm$   
248 SD. Glucose levels only were calculated using the non-parametric U Mann-Whitney  
249 test, with confidence interval 95%.

250 Exponential median values for each gene mRNA expression, imuno content,  
251 GIP and GLP-1 secretion of jejunum were compared between the experimental groups  
252 using the non-parametric U Mann-Whitney test, with confidence interval 95%.

253 One way ANOVA and Turkey post-hoc test were used to compare cell viability  
254 results. Differences in expression either between control and treated samples or obese  
255 NDM2 and T2DM were considered statistically significant at  $p \leq 0.05$ . SPSS 18.0  
256 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was used for the analyses.

257

### 258 3 Results

259 Jejunum collected during surgery were sliced with chopper and after incubated  
260 with food elements to investigate the expression of genes involved with the regulation  
261 of enteroinsulin axis. Hence we felt it necessary to test jejunum cell viability, using the  
262 MTT assay. We tested three times of incubation (t=0, t=2 and t=4 hours). The post hoc  
263 test showed no difference between time 0 and time 2 h, but viability was significantly  
264 increased between 2 and 4 hours of incubation ( $p=0.011$ ) (data not shown). Treatment  
265 with fatty acids (50  $\mu$ M) did not modify cell viability at all times studied ( $p=0.799$ ). The  
266 cell was adapted to the incubation system and the viability remained until 4 hours of  
267 incubation and fatty acids were not toxic at this concentration. The integrity and  
268 metabolic activity of these cells after cross section tissue and incubation time was tested  
269 by immunoassays of GIP and GLP-1. We can observe in figure 1.

270 Proximal jejunum, at 60 cm (of NDM2) and at 100 cm (of T2DM) from Treitz  
271 ligament, have K and L cells but in different proportion, thus we test the effect of  
272 nutrients, especially fatty acids (50  $\mu$ M) on mRNA expression of GIP, proglucagon,  
273 PC1/3 and DPP-IV of jejunum of these patients (NDM2 and T2DM) (Table 3).  
274 Vaccenic acid stimulated GIP mRNA expression only in jejunum of obese NDM2 ( $p =$

275 0.041) and increased proglucagon mRNA expression in both jejunum of obese NDM2  
276 ( $p= 0.041$ ) and T2DM ( $p = 0.02$ ). Oleic acid down regulated DPP-IV mRNA expression  
277 of NDM2 obese ( $p = 0.045$ ), but the same was not observed in the jejunum of obese  
278 T2DM. Elaidic acid did not produce any statistical differences in the GIP, proglucagon,  
279 PC1/3 and DPP-IV mRNA expression in jejunum of obese NDM2 and T2DM.

280         After, we test the effect of monounsaturated fatty acids on PPAR- $\gamma$  and NFK-B  
281 mRNA expression in NDM2 and T2DM jejunum (table 4). The PPAR- $\gamma$  mRNA  
282 expression of NDM2 and T2DM jejunum was not modulated by oleic, elaidic and  
283 vaccenic acid after two hours of treatment. But when compared the PPAR- $\gamma$  mRNA  
284 expression between NDM2 and T2DM jejunum, we observed that T2DM showed  
285 significantly lower expression of this gene, and all fatty acids used do not modulated  
286 this expression. PPAR- $\gamma$  mRNA expression stayed lower in T2DM jejunum.

287         Jejunum NFK-B mRNA expression was not modulated by monounsaturated  
288 fatty acids, in both patients groups. But when we compared NDM2 and T2DM, we  
289 observed that T2DM jejunum NFK-B mRNA expression was increased after vaccenic  
290 acid treatment. Also, T2DM showed major ratio NFK-B / PPAR- $\gamma$  of mRNA  
291 expression in all situations, including in control conditions and fatty acids incubations.  
292 T2DM jejunum express proportionally more NFK-B than PPAR- $\gamma$ , especially when the  
293 jejunum was treated with vaccenic acid (figure 2).

294         We observed that vaccenic and oleic acid had effect on mRNA expression of  
295 incretins and related enzymes. Then, we test the immune content of GIP and GLP-1 at  
296 time zero (before incubation) and after 15, 30, 120 and/or 240 minutes of incubation  
297 with oleic or vaccenic acid (50  $\mu$ M).

298         We observe that NDM2 jejunum can modulated GIP intracellular content when  
299 this tissue was incubated with oleic and vaccenic acid (50  $\mu$ M) for two hours (table 5

300 and table 6). Both fatty acids decreased the immune contents of GIP in NDM2 jejunum.  
301 GIP immune contents of T2DM jejunum was not modulated by 50  $\mu$ M of these fatty  
302 acids and GIP intracellular level in T2DM jejunum stayed minor than NDM2 after  
303 vaccenic acid incubation. GLP-1 immune content do not change significantly in  
304 NDM2 jejunum after oleic and vaccenic acid treatment (table 5 and 6). However,  
305 vaccenic acid increased significantly GLP-1 immune contents in T2DM jejunum (table  
306 6). T2DM jejunum presents significantly more GLP-1 content than NDM2 jejunum  
307 when incubated with oleic acid (table 5). When compared both patients groups, T2DM  
308 jejunum presents high GLP-1 intracellular level when treated by oleic acid (table 5) and  
309 low GIP intracellular level when treated by vaccenic acid for two hours (table 6).

310 We can see that vaccenic acid modulated the levels of incretins in jejunum tissue  
311 of NDM2 and T2DM; the modulation continues after 2 h of incubation. Then, we test  
312 minor times, 15 and 30 min of incubation with vaccenic acid 50  $\mu$ M. After this time, we  
313 removed the fatty acid and completed the incubation until 2 h.

314 Vaccenic acid increased immediately the immune content of GIP (figure 3) and  
315 GLP-1 (figure 4) when the jejunum of T2DM was incubated by 15 or 30 min with this  
316 fatty acid; after complete 2 h with removal of vaccenic acid, the content still remains  
317 significantly elevated. This fatty acid stimulated the intracellular content of these  
318 peptides in the actives form. Then, we tested by EIA the secretion of GIP and GLP-1  
319 after 15 and 30 min of incubation with vaccenic acid 50  $\mu$ M (table 7). GIP secretions  
320 was stimulated by vaccenic acid in jejunum of obese T2DM, but was not altered in  
321 NDM2 jejunum, at 15 or 30 min of incubation. However, GLP-1 secretion was not  
322 stimulated by this fatty acid in jejunum of NDM2 and T2DM, at these minor times.  
323 Vaccenic acid can increase the intracellular content of GLP-1 but it cannot stimulate its  
324 secretion, GLP-1 stayed inside cell. Also, in both obese patients jejunum, at 60 or 100



325 cm from Treitz ligament, the level of GLP-1 secreted was low when compared with the  
326 level of GIP (table 7).

327

#### 328 4 Discussion

329 The gut, initially thought to be a digestive and absorptive organ, is currently  
330 considered the largest endocrine organ in the body. Enteroendocrines cells yield and  
331 liberate polipeptides with important role in food ingestion and in glycemic homeostasis  
332 [30]. In the last years, the neuroendocrine role of the gut in energy homeostasis is one  
333 of expanding scientific study essentially motivated by the pandemic obesity and type 2  
334 diabetes mellitus (T2DM) [31]. The biosynthesis and secretion of these bioactive  
335 peptides are stimulated by different components of diet. It is related that the  
336 composition of macronutrients in the diet can directly modulate postprandial response  
337 of insulin secretion, mediated by secretion of incretins such as GIP and GLP-1[32].

338 There is a great discussion about the fatty acids composition present in the diet,  
339 especially cis or trans isomers monounsaturated fatty acids. There is continuing  
340 disagreement regarding the possible beneficial or even detrimental effects of trans fatty  
341 acids (TFA) on health [33]. TFA deriving from industrially hydrogenated oils such as  
342 elaidic acid (C18:1t9) have been associated with an increased risk of cardiovascular  
343 disease [34]. In contrast, vaccenic acid (C18:1t11) one TFA naturally occurring  
344 predominant in ruminant fat (milk fat and meat), was shown not to impair vascular  
345 function and even can elicit either neutral or beneficial health effects on blood lipid. The  
346 observational and interventional studies concerning the feeding of dairy food enriched  
347 with vaccenic acid on human health are also limited. Tardy, et al, 2011, showed that  
348 healthy volunteers who received a diet rich in vaccenic acid had a positive correlation  
349 between the risk of developing diabetes at the age and BMI [34]. Nevertheless, the oleic

350 acid, a cis isomer of monounsaturated fatty acids, have no effect or decrease plasma  
351 lipid levels [35], either reverse both inflammation and impairment of insulin signaling  
352 induced by palmitate treatment in skeletal muscle cells [36]. The improvement of  
353 insulin sensitivity observed in many studies, has suggested the daily use of this fatty  
354 acid for the management of T2DM. But little is known about the mechanism of this  
355 intervention.

356 Obesity is a major risk factor for cardiovascular disease and development of type  
357 2 diabetes. Bariatric surgery is the most effective therapeutic option for reduction of  
358 weight and its related complications like T2DM [37]. After surgery, due to anatomical  
359 change in gastrointestinal tract, the jejunum receives previously ingested food, and this  
360 would involve the secretion of peptides associated with insulin secretion, such as GIP  
361 and GLP-1 [38]. Therefore, our team of surgeons removed 60 and 100 cm sections of  
362 the bowel of obese NDM2 and T2DM, respectively, in order to improve the secretion of  
363 incretins, especially GLP-1 and consequently improve T2DM clinical parameters. Then,  
364 the proposal of this study was to evaluate the effect of cis or trans monounsaturated  
365 fatty acids on transcription, synthesis, secretion and inactivation of incretins and genes  
366 expression of PPAR- $\gamma$  and NFk-B, both associated with inflammation, in proximal  
367 jejunum cells of NDM2 and T2DM morbidly obese individuals, submitted to bariatric  
368 surgery.

369 The direct action of nutrients, especially elaidic acid has a neutral effect, or this  
370 fatty acid does not modulate the transcription of genes studied on proximal jejunum  
371 cells of NDM2 and T2DM patients. Industrial *trans* fatty acid association with  
372 detrimental effects on health it is not appear to be by this metabolic pathway.

373 However, oleic and vaccenic acid provoked some effects, even, related with  
374 diabetic diagnosis or not. In NDM2 oleic acid decreases expression of DPP-IV, the

375 ubiquitous enzyme responsible to inactivation of incretins. This result may suggest an  
376 increased serum level of GIP and GLP-1 after ingestion of a diet rich with this fatty  
377 acid. Also, this fatty acid induced a decreased in the intracellular content of GIP and  
378 GLP-1, after two hours with oleic acid treatment of jejunum cells, like postprandial  
379 conditions. This is a positive effect of this fatty acid in obese non diabetic individuals,  
380 the same was not observed in diabetics patients. Vaccenic acid, a ruminant trans fatty  
381 acid, modulated the mRNA expression of GIP and proglucagon, but differently in both  
382 obese patients. In NDM2 patients, vaccenic acid increased GIP mRNA transcription and  
383 decreased the content of this peptide in K cells in postprandial state. NDM2 jejunum, at  
384 60 cm from Treitz ligament, was modulated by vaccenic acid the GIP metabolism in the  
385 cells K. T2DM jejunum patients was modulated by vaccenic acid, but a level of GLP-1  
386 metabolism. Vaccenic acid increased proglucagon mRNA and immune content of GLP-  
387 1 in L cells after two hours of treatment. In jejunum, at 100 cm from ligament of Treitz,  
388 this trans fatty acid interfere at proglucagon metabolism.

389         These results increased perspectives in to study vaccenic acid on the modulation  
390 of the synthesis and secretion of incretins, since many studies have reported that the  
391 plasma concentrations of GLP-1 are decreased in T2DM whereas GIP levels remain  
392 unchanged [39,40].

393         After that, when testing in the jejunum diabetic, short exposure times to vaccenic  
394 acid, we observed an increase of the intracellular content of GIP and GLP-1  
395 immediately in the first 15 minutes and this content remains high up to 2 hours, even  
396 with the removal of this fatty acid. However, only in T2DM jejunum, vaccenic acid  
397 increased GIP secretion. GLP-1 liberation was not stimulated by vaccenic acid in both  
398 obese patients. The increased intracellular content observed at early incubation was not

399 accompanied with secretion. Also, the quantity of GLP-1 liberated was minor than GIP  
400 in both jejunum, at 60 or 100 cm from Treitz ligament.

401         There is related that T2DM individuals have low-grade inflammation [41]. It has  
402 been reported that natural or synthetic agonists of PPARs may be regulate immune  
403 function in different inflammatory disease. The PPAR- $\gamma$  isoform is widely expressed in  
404 the intestinal tissue and agonists for this isoform have beneficial effects on intestinal  
405 damage [42,43]. PPAR- $\gamma$  activation inhibits inflammation by suppressing inflammatory  
406 gene expression, firstly inhibiting the expression of chemokines genes and direct  
407 inhibition of NFk-B activation on the promoters. The proinflammatory transcription  
408 factor NFk-B play a central role in immune and inflammatory responses. It is the major  
409 target for PPAR- $\gamma$  to suppress inflammation [44,45]. NFk-B mediates the inflammatory  
410 responses in many tissues and its activation significantly contributes to development of  
411 many disorders. In our model of study, mRNA transcription of genes related to  
412 inflammation response, PPAR- $\gamma$  and NFk-B was not modulated by fatty acids  
413 monounsaturated studied, even in obese NDM2 and T2DM jejunum. The  
414 monounsaturated fatty acids were not agonists of PPAR- $\gamma$  in jejunum of these patients.  
415 However, T2DM revealed mRNA level of PPAR- $\gamma$  gene significantly minor than  
416 NDM2. This result could indicate an inflammatory process in obese T2DM jejunum.  
417 Moreover, vaccenic acid stimulated NFk-B mRNA expression in T2DM jejunum when  
418 compared with NDM2. Obese T2DM jejunum presents major mRNA ratio of NFk-B/  
419 PPAR- $\gamma$ , especially when the jejunum was treated with vaccenic acid. The inflammatory  
420 state of diabetic jejunum could be impaired by vaccenic acid.

421         We suggest that the increased of proglucagon mRNA and intracellular content of  
422 GLP-1 with no significant secretion of this incretin may be associated with diabetes and  
423 the low inflammatory process installed in this patients.

424 In addition, before bariatric surgery, at basal conditions, proximal jejunum cells  
425 (60-100 cm distal from the ligament of Treitz) received more macronutrients as fatty  
426 acids than glucose; after surgery a new condition is established: the endocrine jejunum  
427 cells suffer new modulation. The L and K cells of obese jejunum patients are stimulate  
428 by digestive food in a new condition. After surgery, digestion of carbohydrates  
429 increases glucose concentration in the gut region farther away; resulting an increased  
430 liberation of GLP-1 by diabetics individuals. Perhaps, in vivo, the supplementation with  
431 vaccenic acid for a longer period could increase the content but also the secretion of  
432 GLP-1 by jejunum cells, because it is related that vaccenic acid could improves insulin  
433 resistance [45], through the indirect effects of CLA. Wang 2008 shows, in mice, that  
434 supplementation with vaccenic increases in 6.5 times the amount of CLA in the fat  
435 tissue [46]. Wang 2012 has shown that in rats supplemented diet VAC increases the  
436 expression of PPAR- $\gamma$  and PPAR- $\alpha$ , during the 8-week study [47].

437 In conclusion, the jejunum of obese subjects with diabetes type 2 have originally  
438 a low inflammatory process, modulated by the level of PPAR- $\gamma$  and NF $\kappa$ -B, which  
439 could be provoked by the quality of food, like monounsaturated fatty acids, *cis* or *trans*,  
440 studied in this research. The proinflammatory state could be associated with the  
441 liberation of incretins GLP-1 and GIP, with insulinotropic action. The insulin resistance  
442 begins at intestinal level with the food quality.

443

444 Conflict of interest: The authors have declared no conflict of interest.

445

446 Acknowledgments: This work was supported by Conselho Nacional de  
447 Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

448 5 References

449 [1] Marie N, Fleming T, Robinson M, et al. Global, regional, and national prevalence of  
450 overweight and obesity in children and adults during 1980—2013: a systematic analysis

451 for the Global Burden of Disease Study 2013. The Lancet, Volume 384, Issue 9945,  
452 Pages 766 - 781, 30 August 2014. doi:10.1016/S0140-6736(14)60460-8.  
453  
454 [2] World health statistics 2012. I. World Health Organization. ISBN 978 92 4 156444  
455 1.  
456  
457 [3] Gonzalez AB, Hartge P, Cerhan JR, et al. Body-Mass Index and Mortality among  
458 1.46 Million White Adults. N Engl J Med. 2010; 363(23): 2211–2219.  
459  
460 [4] Blackstone R, Bunt JC, Cortés MC, et al. Type 2 diabetes after gastric bypass:  
461 remission in five models using HbA1c, fasting blood glucose, and medication status.  
462 Surgery for Obesity and Related Diseases 2012; 8(5):548-555.  
463  
464 [5] Haluzík M. Bariatric Surgery and the Mechanism of Diabetes Remission: Are We  
465 Getting There? J Clin Endocrinol Metab 2013; 98(11):4336–4338.  
466  
467 [6] Sala P C, Torrinhas RS, Heymsfield SB, et al. Type 2 Diabetes Mellitus: A Possible  
468 Surgically Reversible Intestinal Dysfunction. Obes surg 2012; 22:167–176.  
469  
470 [7] Beckman LM, Beckman TR, Sibley SD, et al. Changes in gastrointestinal Hormones  
471 and Leptin After Roux-en-Y Gastric Bypass Surgery. Journal of Parenteral and Enteral  
472 Nutrition 2011; 35 (2), 169-180.  
473  
474 [8] Hollanda A, Jiménez A, Corcelles R, et al. Gastrointestinal hormones and weight  
475 loss response after Roux-en-Y gastric bypass. Surgery for Obesity and Related Diseases  
476 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.soard.2014.01.022>.  
477  
478 [9] Rondas D, D'Hertog W, Overberg L, et al. Glucagon-like peptide-1: modulator of  $\beta$ -  
479 cell dysfunction and death. Diabetes, Obesity and Metabolism 2013; 15 (3): 185–192.  
480  
481 [10] Edholm T, Degerblad M, Gryba CK. Differential incretin effects of GIP and GLP-1  
482 on gastric emptying, appetite, and insulin-glucose homeostasis. Neurogastroenterol  
483 Motil 2010; 22, 1191–e315.  
484  
485 [11] Yabe D, Yutaka S. Two incretin hormones GLP-1 and GIP: Comparison of their  
486 actions in insulin secretion and  $\beta$  cell preservation. Progress in Biophysics and  
487 Molecular Biology 2011; 107:248-256.  
488  
489 [12] Dockray GJ. Enteroendocrine cell signalling via the vagus nerve. Current Opinion  
490 in Pharmacology 2013; 13:954–958.  
491  
492 [13] Ezcurra M, Reimann F, Gribble FM, et al. Molecular mechanisms of incretin  
493 hormone secretion. Current Opinion in Pharmacology 2013; 13:922–927.  
494  
495 [14] Habib AM, Richards P, Rogers GJ, et al. Co-localisation and secretion of  
496 glucagon-like peptide 1 and peptide YY from primary cultured human L cells.  
497 Diabetologia 2013; 56:1413–1416.  
498

- 499 [15] Martín GM, Lindberg I, Solorzano–Vargas RS, et al. Congenital Proprotein  
500 Convertase 1/3 Deficiency Causes Malabsorptive Diarrhea and Other Endocrinopathies  
501 in a Pediatric Cohort. *Gastroenterology* 2013;145:138–148.  
502
- 503 [16] Burcelin R, Thorens B. Incretins: what is known, new and controversial in 2013?  
504 *Diabetes Metab* 2013; 39(2):89-93.  
505
- 506 [17] Hevener AL, Febbraio MA and the Stock Conference Working Group. The 2009  
507 Stock Conference Report: Inflammation, Obesity and Metabolic Disease. *obesity*  
508 *reviews* 2010; 11, 635–644.  
509
- 510 [18] Lee BC, Lee J. Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in  
511 the development of obesity-induced insulin resistance. *Biochim Biophys Acta* 2014;  
512 1842(3):446-62.  
513
- 514 [19] Daynes RA, Jones DC. Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity.  
515 *Nat Rev Immunol* 2002; 2(10):748-59.  
516
- 517 [20] Byrav P, Medhi B, Prakash A, et al. Comparative evaluation of different doses of  
518 PPAR-g agonist alone and in combination with sulfasalazine in experimentally induced  
519 inflammatory bowel disease in rats. *Pharmacological Reports* 2013, 65, 951-959.  
520
- 521 [21] Grygiel-Górniak B. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands:  
522 nutritional and clinical implications-a review. *Nutrition Journal* 2014; 13:17.  
523
- 524 [22] Tavares V, Hirata MH, Hirata RDC. Receptor Ativado por Proliferadores de  
525 Peroxissoma Gama (PPAR $\gamma$ ): Estudo Molecular na Homeostase da Glicose,  
526 Metabolismo de Lipídeos e Abordagem Terapêutica. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2007;  
527 51/4:526-533.  
528
- 529 [23] Evans S, Pamuklar Z, Rosko J, et al. Gastric bypass surgery restores meal  
530 stimulation of the anorexigenic gut hormones glucagon-like peptide-1 and peptide yy  
531 independently of caloric restriction. *Surg Endosc.* 2012; 26(4): 1086–1094.  
532
- 533 [24] YanW, Polidori D, Yieh L, et al. Effects of Meal Size on the Release of GLP-1 and  
534 PYY After Roux-en-Y Gastric Bypass Surgery in Obese Subjects With or Without Type  
535 2 Diabetes. *Obes surg* 2014; 24:1969–1974.  
536
- 537 [25] CP Hansen CP, Berentzen TL, Halkjaer J, et al. Intake of ruminant trans fatty acids  
538 and changes in body weight and waist circumference. *European Journal of Clinical*  
539 *Nutrition* 2012; 66, 1104–1109.  
540
- 541 [26] Crespo CS, Cachero AP, Jiménez PL, et al. Peptides and food intake. *Frontiers for*  
542 *endocrinology* 2014; 5(58).  
543
- 544 [27] Damholt AB, Bucham AM, Kofod H. Glucagon-like-peptide-1 secretion from  
545 canine L-cells is increase by glucose-dependent-insulinotropic peptide but unaffected by  
546 glucose. *Endocrinology* 1998; 139: 2085-91.  
547

- 548 [28] Gahwiler BH, Capogna M, Debanne D, McKinney RA, Thompson SM,  
549 Organotypic slice cultures: a technique has come of age. *Trends Neurosci* 1997; 20:  
550 471-7  
551
- 552 [29] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-  
553 Time Quantitative PCR and the  $2^{\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* 2001; 25: 402–8.
- 554 [30] Osborn O, Olefsky JM. The cellular and signaling networks linking the immune  
555 system and metabolism in disease. *Nature medicine* 2012; 18(3).  
556
- 557 [31] Dockray GJ. Enteroendocrine cell signalling via the vagus nerve. *Current Opinion*  
558 *in Pharmacology* 2013, 13:954–958.  
559
- 560 [32] Diakogiannaki E, Gribble FM, Reimann F, et al . Nutrient detection by incretin  
561 hormone secreting cells. *Physiology & Behavior* 106 (2012) 387–393.  
562
- 563 [33] Hansen CP, Berentzen TL, Halkjaer J. Intake of ruminant trans fatty acids and  
564 changes in body weight and waist circumference. *European Journal of Clinical*  
565 *Nutrition* 2012; 66, 1104–1109.  
566
- 567 [34] Tardy AL, Morio B, Chardigny JM, et al. Ruminant and industrial sources of trans-  
568 fat and cardiovascular and diabetic diseases *Nutrition Research Reviews* 2011; 24,  
569 111–117.  
570
- 571 [35] Dashti N, Feng Q, Franklin FA. Long-term effects of cis and trans  
572 monounsaturated (18:1) and saturated (16:0) fatty acids on the synthesis and secretion  
573 of polipoprotein A-I- and apolipoprotein B-containing lipoproteins in HepG2 cells. *J.*  
574 *Lipid Res* 2000; 41: 1980–1990.  
575
- 576 [36] Coll T, Eyre E, Rodríguez-Calvo R, et al. Muscle Cells Resistance and  
577 Inflammation in Skeletal Oleate Reverses Palmitate-induced Insulin. *The journal of*  
578 *biological chemistry* 2008; 283(17) 11107–11116.  
579
- 580 [37] Raghov R. Bariatric surgery-mediated weight loss and its metabolic consequences  
581 for type-2 diabetes. *World J Diabetes* 2013; 15; 4(3): 47-50.  
582
- 583 [38] Salinari S, Bertuzzi A, Guidone C, et al. Insulin Sensitivity and secretion Changes  
584 After Gastric Bypass in Normotolerant and Diabetic Obese Subjects. *Ann Surg*  
585 2013;257: 462–468.  
586
- 587 [39] Duca FA, Sakar Y, Covasa M. The modulatory role of high fat feeding on  
588 gastrointestinal signals in obesity. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2013; 24:1663–  
589 1677  
590
- 591 [40] Rohden F, Costa CS, Hammes TO, et al. Obesity Associated with Type 2 Diabetes  
592 Mellitus Is Linked to Decreased PC1/3 mRNA Expression in the Jejunum. *Obes*  
593 *Surg* 2014; 5(16).  
594
- 595 [41] Ding S, Chi MM, Scull BP, et al. High-fat diet: bacteria interactions promote  
596 intestinal inflammation which precedes and correlates with obesity and insulin resistance  
597 in mouse. *PLoS One*. 2010; 16;5(8):12191.



598  
599 [42] Monsalve FA, Pyarasani RD, Delgado-Lopez F, et al. Peroxisome Proliferator-  
600 Activated Receptor Targets for the Treatment of Metabolic Diseases. Hindawi  
601 Publishing Corporation Mediators of Inflammation 2013, 549627, 18 pages.  
602  
603 [43] Tontonoz P, Spiegelman BM. Fat and Beyond: The Diverse Biology of PPAR $\gamma$ .  
604 Annu. Rev. Biochem. 2008; 77:289–312.  
605  
606 [44] Rousseaux C, Lefebvre B, Dubuquoy L, et al. Intestinal antiinflammatory effect of  
607 5-aminosalicylic acid is dependent on peroxisome proliferator-activated receptor-g.  
608 JEM, 2005; 201(8):1205–1215.  
609  
610 [45] Mohankumar SK, Hanke D, Siemens L, et al. Dietary supplementation of trans-11-  
611 vaccenic acid reduces adipocyte size but neither aggravates nor attenuates obesity-  
612 mediated metabolic abnormalities in fa/fa Zucker rats. British Journal of Nutrition,  
613 doi:10.1017/S000711451200339X.  
614  
615 [46] Wang Y, Lu J, Ruth MR, et al. Trans-11 Vaccenic Acid Dietary Supplementation  
616 Induces Hypolipidemic Effects in JCR:LA-cp Rats1,2. J. Nutr 2008; 138: 2117–2122.  
617  
618 [47] Wang Y, Jacome-Sosa MM, Ruth MR, et al. The intestinal bioavailability of  
619 vaccenic acid and activation of peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  and - $\beta$  in a  
620 rodent model of dyslipidemia and the metabolic syndrome. Mol. Nutr. Food Res 2012,  
621 56, 1234–1246.  
622  
623 6.000 words.

**Table 1** : Anthropometric and biochemical parameters of morbidly obese patients NDM2 and T2DM.

<b>Data</b>	<b>NDM2 Group</b> n=15	<b>T2DM Group</b> n=15
Age (years)	35 ± 6.20	42.66 ± 13.35
BMI(Kg/m <sup>2</sup> )	49.82 ± 8.66	47.89 ± 7.35
HDL (mg/dL)	48.2 ± 14.41	55.33 ± 11.72
LDL (mg/dL)	76.4 ± 48.07	123.17 ± 29.78
TG (mg/dL)	134.6 ± 24.4	130 ± 73.34
CT (mg/dL)	181.8 ± 15.85	217 ± 50.64
Glucose (mg/dL)	91.2 ± 4.15	184.33 ± 77.49

**Table 2:** Oligonucleotides used in qRT-PCR reactions, 5' to 3'.

<b>Gene</b>	<b>Forward primer</b>	<b>Reverse primer</b>
<b><math>\beta</math>-actin</b>	5' CCACGAAACTACCTTCAACTCC 3'	5' TCATACTCCTGCTGCTGCTTGCTGATCC 3'
<b>PC 1/3</b>	5' GACCTCTTCTCAGCCAGAGC 3'	5' GACACCAGGGTGTTCCTT 3'
<b>GIP</b>	5' AACCCAGCGATGAAGATTT 3'	5' TGAGGCAGGTGCTAAGTGAA 3'
<b>proglucagon</b>	5' GCCAGGGACTTTATAAACTGGT 3'	5' AAGCAATGTGGCCTCAGAAT 3'
<b>DPP- IV</b>	5' TCCTTATTCATGGAACAGCAG A 3'	5' TGAAGTGGCTCATGTGGGTA 3'
<b>PPAR-<math>\gamma</math></b>	5' AGGCCATTTTCTCAAAC 3'	5' AGAAATGCTGGAGAAGTCAACA 3'
<b>NFK-B</b>	5' ACCCTGACCTTGCCTATT 3'	5' GGGCTTTACTGTCATAGATGG 3'

**Table 3:** Effect of oleic, elaidic and vaccenic acid on GIP, proglucagon, DPP-IV and PC1/3 mRNA expression in jejunum of morbidly obese subjects NDM2 and T2DM.

GENE		Control	Oleic acid	Elaidic acid	Vaccenic acid
<b>PC 1/3</b>	NDM2	0.8471 (0.10-10.16)	0.3955 (0.06-1.95)	0.8859 (0.05-19.43)	1.9979 (0.33-10.03)
	T2DM	0.9045 (0.39-1.44)	0.6402 (0.32-0.70)	0.8334 (0.35-2.92)	0.6174 (0.14-1.22)
<b>DPP-IV</b>	NDM2	1.2214 (0.10-39.77)	0.2412* (0.10-3.41)	0.3404 (0.12-10.18)	1.3304 (0.23-21.09)
	T2DM	0.3331 (0.12-0.70)	0.2561 (0.14-0.65)	0.3509 (0.11-0.76)	0.3852 (0.21-0.42)
<b>GLP-1</b>	NDM2	0.7358 (0.12-18.87)	0.5099 (0.11-6.54)	0.6380 (0.11-4.58)	2.6055* (0.40-21.68)
	T2DM	1.5965 (0.22-2.66)	1.6321 (0.99-4.63)	1.7446 (0.94-4.54)	2.3177* (1.66-3.06)
<b>GIP</b>	NDM2	0.8975 (0.10-13.12)	0.7157 (0.11-1.64)	0.8996 (0.48-14.29)	1.8923* (1.03-16.88)
	T2DM	1.5941 (0.12-2.57)	1.6721 (0.78-7.55)	1.7684 (0.92-2.03)	1.2332 (0.82-1.72)

NDM2 obese patients were sectioned at 60 cm from the Treitz ligament (n= 5) and T2DM obese at 100 cm (n=6). Tissue samples were collected during surgery, sliced and incubated (see Material and methods) without (control) or with 50  $\mu$ M of oleic acid (C18:1 *9c*), or elaidic acid (C18:1 *9t*), or vaccenic acid (C18:1 *11t*) for 240 min at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Control and each fatty acid treatment were incubated in triplicate. After incubation the medium was removed and TRIzol added for RNA extraction. To compare the expression pattern of mRNA in jejunum after treatment with fatty acid of obese subjects NDM2 and T2DM, figures were normalized against  $\beta$ -actin ( $\Delta$ Ct) and calibrated against the mean of control NDM2 mRNA expression ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ). To compare fatty acid treatment with control, *p* values were calculated using the non-parametric U Mann-Whitney test.

Values were expressed as median and confidence interval 95%

\* Statistically significant  $p \leq 0.05$

**Table 4:** Effect of oleic, elaidic and vaccenic acid on PPAR- $\gamma$  and NFK-B mRNA expression in obese NDM2 and T2DM jejunum.

GENE		Control	Oleic acid	Elaidic acid	Vaccenic acid
<b>PPAR- <math>\gamma</math></b>	NDM2	0.9476 (0.13-17.06)	0.3383 (0.15-4.87)	1.1996 (0.29-7.38)	1.8265 (0.12-4.31)
	T2DM	0.0395 <sup>a</sup> (0.00-0.12)	0.0226 <sup>a</sup> (0.005-0.05)	0.0373 <sup>a</sup> (0.01-0.10)	0.0185 <sup>a</sup> (0.01-0.07)
<b>NFK -B</b>	NDM2	1.0823 (0.38-2.63)	1.5811 (0.51-5.02)	1.7975 (0.50-7.32)	0.9485 (0.06-2.05)
	T2DM	1.0833 (0.75-4.08)	1.4051 (0.47-5.39)	1.4459 (0.01-0.10)	3.5100 <sup>a</sup> (1.58-5.10)

NDM2 obese patients were sectioned at 60 cm from the Treitz ligament (n= 5) and T2DM obese at 100 cm (n=6). Tissue samples were collected during surgery, sliced and incubated (see Material and methods) without (control) or with 50  $\mu$ M of oleic acid (C18:1 *9c*), or elaidic acid (C18:1 *9t*), or vaccenic acid (C18:1 *11t*) for 240 min at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Control and each fatty acid treatment were incubated in triplicate. After incubation the medium was removed and TRIzol added for RNA extraction. To compare the expression pattern of mRNA in jejunum after treatment with fatty acid of obese subjects NDM2 and T2DM, figures were normalized against  $\beta$ -actin ( $\Delta$ Ct) and calibrated against the mean of control NDM2 mRNA expression ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ). To compare obese subjects NDM2 and T2DM, *p* values were calculated using the non-parametric U Mann-Whitney test.

Values were expressed as median and confidence interval 95%.

NS= when compared fatty acids treatments with control

<sup>a</sup> When compared obese subjects NDM2 and T2DM; Statistically significant  $p \leq 0.05$

**Table 5:** Immuno contents of GIP and GLP-1 in jejunum cells of NDM2 and T2DM obese after incubation with or without oleic acid 50  $\mu$ M for 2 hours.

	Control 2h of incubation	Oleic acid 50 $\mu$ M 2h of incubation
<b>GIP</b>		
NDM2	109.39 ( $\pm$ 10,68)	74.99 ( $\pm$ 19.17) <sup>*</sup>
T2DM	89.42 ( $\pm$ 12.35)	91.38 ( $\pm$ 25.04)
<b>GLP-1</b>		
NDM2	60.46 ( $\pm$ 15.10)	63.91 ( $\pm$ 13.20)
T2DM	88.1 ( $\pm$ 33.48)	103.31 ( $\pm$ 26.06) <sup>#</sup>

NDM2 obese (n=5) patients were sectioned at 60 cm from the Treitz ligament and T2DM obese (n=5) at 100 cm. Proximal jejunum samples collected during surgery were analyzed after incubation without (control) or with oleic acid 50  $\mu$ M for 2 hours at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Each analyzes were performed in triplicate. After, the tissue were fixed with paraformaldehyde, embedded in freezing medium, cut in a cryostat and incubated with primary and secondary antibodies second materials and methods. The secondary antibodies were conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) for GIP (green-fluorescent) and rhodamine for GLP-1 (red-fluorescent). The image was observed under a fluorescent microscope (Olympus IX70). Quantification of immunohistochemical content was assessed by the program Cell-M, and it was expressed in arbitrary values. To compare oleic acid treatment with control or between NDM2 and T2DM, *p* values were calculated using the non-parametric U Mann-Whitney test. Values were expressed as media  $\pm$  SD. Statistically significant for *p*  $\leq$  0.05.

\* Statistically different from control; # statistically different from NDM2

**Table 6:** Immuno contents of GIP and GLP-1 in jejunum cells of NDM2 and T2DM obese after incubation with or without vaccenic acid 50  $\mu$ M for 2 hours.

	Control 2h of incubation	Vaccenic acid 50 $\mu$ M 2h of incubation
<b>GIP</b>		
NDM2	128.45 ( $\pm$ 7.46)	101.99( $\pm$ 2.56) <sup>*</sup>
T2DM	86.48 ( $\pm$ 24.98)	77.02 ( $\pm$ 31.92) <sup>#</sup>
<b>GLP-1</b>		
NDM2	113.34 ( $\pm$ 8.31)	119.97 ( $\pm$ 3.46)
T2DM	79.08 ( $\pm$ 23.17)	110.69 ( $\pm$ 23.99) <sup>*</sup>

NDM2 obese (n=5) patients were sectioned at 60 cm from the Treitz ligament and T2DM obese (n=4) at 100 cm. Proximal jejunum samples collected during surgery were analyzed after incubation without (control) or with vaccenic acid 50  $\mu$ M for 2 hours at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Each analyzes were performed in triplicate. After, the tissue were fixed with paraformaldehyde, embedded in freezing medium, cut in a cryostat and incubated with primary and secondary antibodies second materials and methods. The secondary antibodies were conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) for GIP (green-fluorescent) and rhodamine for GLP-1 (red-fluorescent). The image was observed under a fluorescent microscope (Olympus IX70). Quantification of immunohistochemical content was assessed by the program Cell-M, and it was expressed in arbitrary values. To compare vaccenic acid treatment with control or between NDM2 and T2DM, *p* values were calculated using the non-parametric U Mann-Whitney test. Values were expressed as media  $\pm$  SD. Statistically significant for *p*  $\leq$  0.05.

\* statistically different from control; # statistically different from NDM2

\*significantly different from control

#significantly different from NDM2

**Table 7:** GIP and GLP-1 secretion in NDM2 and T2DM jejunum after 15 or 30 min of incubation with vaccenic acid 50  $\mu$ M.

Time of incubation	Secretion	Control	Vaccenic acid
	<b>GLP-1</b>	ng/mL	ng/mL
15 min	NDM2	9.19 ( $\pm$ 14.90)	12.43 ( $\pm$ 7.03)
	T2DM	13.28 ( $\pm$ 15.03)	30.05 ( $\pm$ 31.28)
30 min	NDM2	31.57 ( $\pm$ 38.47)	125.39 ( $\pm$ 186.81)
	T2DM	87.16 ( $\pm$ 125.08)	47.26 ( $\pm$ 29.97)
	<b>GIP</b>	ng/mL	ng/mL
15 min	NDM2	11170 ( $\pm$ 7437)	10110 ( $\pm$ 9795)
	T2DM	8326 ( $\pm$ 8665)	61735 ( $\pm$ 18232) *
30 min	NDM2	23942 ( $\pm$ 21505)	13822 ( $\pm$ 14832)
	T2DM	24526 ( $\pm$ 24016)	102863 ( $\pm$ 42307)*

NDM2 obese (n=3) jejunum were sectioned at 60 cm from the Treitz ligament and T2DM obese (n=3) at 100 cm. Proximal jejunum samples collected during surgery were incubated in culture medium (DMEM) increased by inhibitor of DPP-IV, without (control) or with vaccenic acid 50  $\mu$ M for 15 or 30 min at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>, second materials and methods. Each analyzes were performed in triplicate. After this time, GIP and GLP-1 secreted by jejunum cells of NDM2 and T2DM were analyzed by EIA kit. To compare vaccenic acid treatment with control, *p* values were calculated using t test for independent samples. Values were expressed as media  $\pm$  SD. Statistically significant for *p*  $\leq$  0.05.

\*significantly different from control



Figure 1

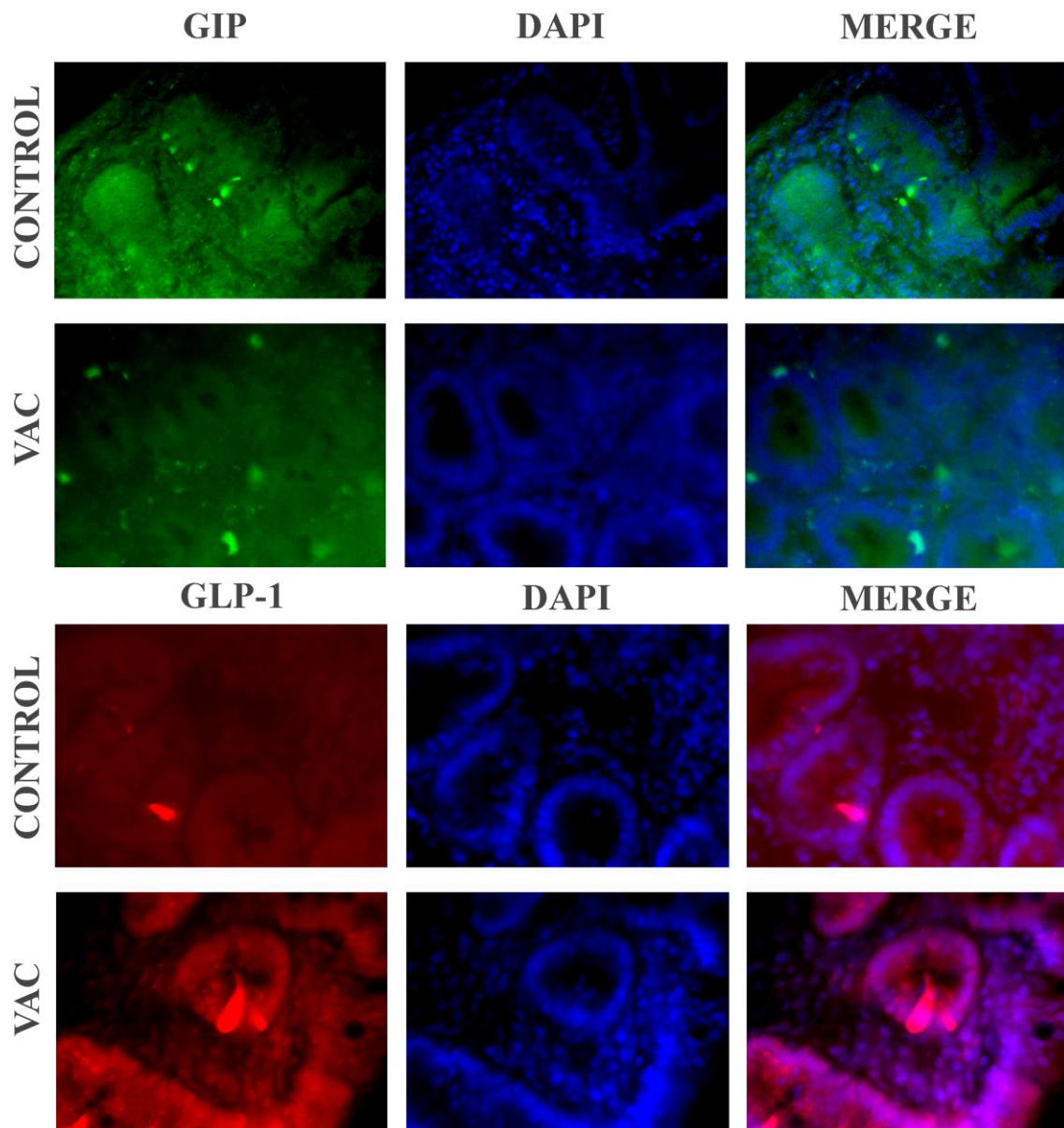
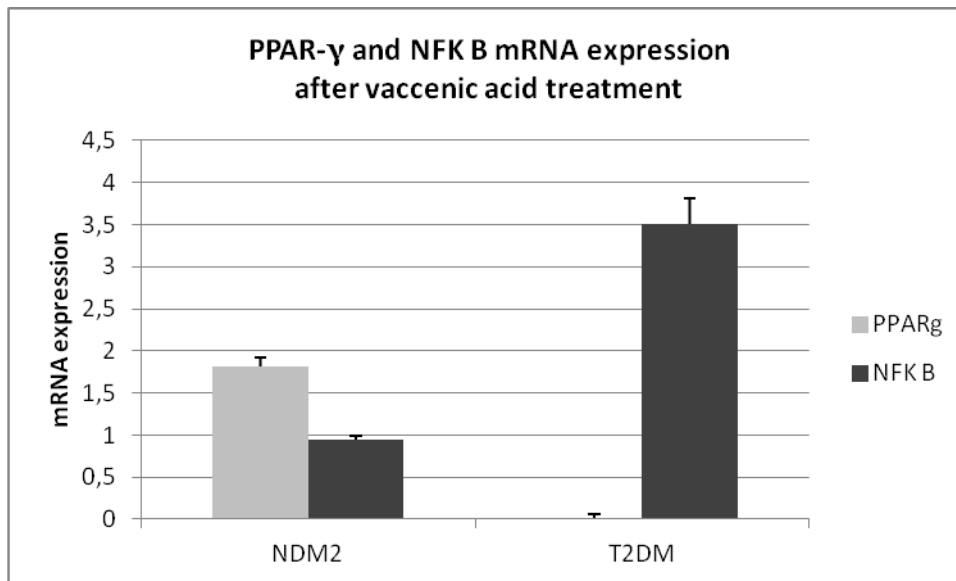


Fig 1. Representative images integrity and metabolic activity of the cells after cross-section of the tissue and the time of incubation with vaccenic acid detected by immunoassays GIP and GLP-1 in cells of the mucosa of the jejunum and OB NDM2 individual. All images were captured at a magnification of  $\times 20$ . Sample processing is described in "Materials and Methods". Represent GIP fluorescent labeling (green) and GLP-1 (red), within the granules of the endocrine system. And show labeling in the nuclei (blue). Last shown for the merged images.

**Figure 2:** Comparison of PPAR- $\gamma$  and NFK B mRNA expression in obese NDM2 and T2DM jejunum after vaccenic acid treatment.



NDM2 obese patients were sectioned at 60 cm from the Treitz ligament (n= 5) and T2DM obese at 100 cm (n=6). Tissue samples were collected during surgery, sliced and incubated (see Material and methods) without (control) or with 50  $\mu$ M of vaccenic acid (C18:1 *11t*) for 240 min at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Control and fatty acid treatment were incubated in triplicate. After incubation the medium was removed and TRIzol added for RNA extraction. To compare the expression pattern of mRNA in jejunum after treatment with fatty acid of obese subjects NDM2 and T2DM, figures were normalized against  $\beta$ -actin ( $\Delta$ Ct) and calibrated against the mean of control NDM2 mRNA expression ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ). To compare obese subjects NDM2 and T2DM, *p* values were calculated using the non-parametric U Mann-Whitney test (values were expressed in table 4). Values were expressed as median and confidence interval 95%.



## **S100B elevated in patients diagnosed with type 2 diabetes mellitus, we suggested as a biomarker?**

### **Introduction**

The association of inflammatory state with obesity and insulin resistance was described for many authors (SCARPELLINI, TACK, 2012; KREDEL, SIEGMUND, 2014). Obesity is a chronic inflammation significantly associated with increased plasma concentration of C-reactive protein (CRP), interleukin-6 (IL-6) and plasminogen-activator inhibitor-1 (PAI-1) (PHARM *et al*, 2012). The inflammatory site where begin the process of inflammation in obesity and type 2 diabetes mellitus (T2DM), may be in endothelium (SCARPELLINI, TACK, 2012, PHARM *et al*, 2012).

S100B is a secretory protein which is implicated in the regulation of protein phosphorylation, transcription factors,  $Ca^{+2}$  homeostasis and glucose metabolism (DONATO *et al*, 2014). Adipose tissue appears to be an important source of serum S100B as in nervous tissue therefore, S100B is linked to the regulation of energy metabolism (BUCKMAN *et al*, 2014). The secretion of S100B from adipocytes is reduced by insulin and activated by stress or fasting (GONÇALVES, *et al* 2010). Also, a recent study showed a positive correlation between body mass index (BMI) and serum S100B levels ( CELIKBILEK, 2014). Therefore, an increased in adipose tissue or changes in metabolism of insulin, such as insulin resistance, probably exerts increased levels of S100B.

Type 2 diabetes is the leading cause of cardiovascular diseases, increased morbidity and mortality. The increase in blood glucose, dyslipidemia and hypertension are risk factors that increase atherosclerosis in T2DM, which is associated with chronic inflammation and vascular endothelium dysfunction (BUCKMAN *et al*, 2014).

In this study we measured S100B serum levels in a health subjects and patients non obese with T2DM and patients obese NDM2 and T2DM. The aim was to determine a good biomarker associated with different process of inflammation from obesity and T2DM.

## **Materials and Methods**

### *Samples*

Serum samples were obtained from 15 non obese individuals (10 NDM2 and 5 T2DM) and 27 morbidly obese patients (12 NDM2 and 15 T2DM), from COM/PUCRS, Brazil. Experiments were approved by the ethical committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (n° 2007949), and all subjects were informed about the aim of the study and signed the informed consent form.

The weight of obese patients was stable over at least the last year and they had good health despite obesity. The non obese T2DM patients did not use any medicaments for diabetes, only they controlled the glicemia with diet. To evaluate insulin resistance, we used a mathematical model of Homeostasis Assessment Model Insulin Resistance (HOMA-IR).

### *S100B determination*

Serum S100B was detected by ELISA kit. We used the protocol indicated by the manufacturer (General Protocol for S100B (human) ELISA Kit - Abnova). The spectrophotometric reading was made in micro titer plate reader (Spectra Max 190, Molecular Devices).

### *Protein Determination*

Protein was measured by the Coomassie Blue method according to Lowry and colleagues (PETERSON, 1979) using bovine serum albumin as the standard.

### *Statistical analysis*

Statistical analysis of anthropometric and biochemical parameters of morbidly obese patients NDM2 and T2DM were calculated using the independent sample test- $T \pm SD$ . S100B serum determination were compared with NOB NDM2 (control) subjects using the *t* test. Differences in expression either between control and others patients were considered statistically significant at  $p \leq 0.05$ . SPSS 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was used for the analyses.

### **Results**

Anthropometric and biochemical parameters of non obese NDM2 or T2DM patients are shown in Table 01. And Anthropometric and biochemical parameters of morbidly obese NDM2 or T2DM patients are displayed in Table 02.

The level of S100B protein expressed in serum increased significantly in Type 2 diabetes individuals, independently of obesity. S100B serum increased around 60% in T2DM (table 3).

Table 01: Anthropometric and biochemical parameters of non obese NDM2 or T2DM patients.

	<b>NOB NDM2 (<i>n</i>=10)</b>	<b>NOB T2DM (<i>n</i>=5)</b>
Age (years) <sup>a</sup>	23.6 (0.46)	56.4 (2.24)
BMI (Kg/m <sup>2</sup> ) <sup>a</sup>	25.03 (0.58)	27.93 (0.13)
Fasting Glucose (mg/dL) <sup>b</sup>	85 (80-92)	103 (98-109)

<sup>a</sup>Data show mean±SD

<sup>b</sup>Data show median (95 % confidence interval)

Table 02: Anthropometric and biochemical parameters of morbidly obese NDM2 or T2DM patients.

	<b>OB NDM2 group (<i>n</i>= 12)</b>	<b>OB T2DM group (<i>n</i>= 15)</b>
Age (years) <sup>a</sup>	41.75 (±2.80)	43.55 (±1.9)
BMI (Kg/m <sup>2</sup> ) <sup>a</sup>	46.74 (± 1.17)	46.44 (±5.58)
Fasting Glucose (mg/dL) <sup>b</sup>	88 (79-95)	128 (72-184)

<sup>a</sup>Data show mean±SD

<sup>b</sup>Data show median (95 % confidence interval)

Table 03: Determination of S100B protein in serum of non obese subjects with or without type 2 diabetes, obese with or without type 2 diabetes

<b>Pacients</b>	<b>S100B</b> pg	<b><i>p</i>*</b>
NOB NDM2 (Control)	<b>44.39 (±7.52)</b>	
NOB T2DM	<b>74.85 (±0.96)</b>	0.015
OB NDM2	<b>47.21 (±6.45)</b>	NS
OB T2DM	<b>71.35 (±8.35)</b>	0.034

NOB NDM2 = non obese and non type 2 diabetic patients (healthy subjects); n=10

NOB T2DM = non obese and type 2 diabetic patients; n=5

OB NDM2 = obese type III and non type 2 diabetic patients; n=12

OB T2DM = obese type III and type 2 diabetic patients; n=15

To compare NOB NDM2 and others patients, *p* values were calculated using the *t* test.

Values were expressed as means ± SE.

Statistically significant  $p \leq 0.05$

\* *P* related to NOB NDM2 (control)





## 10 DISCUSSÃO

A obesidade e a síndrome metabólica aumentam assustadoramente no mundo todo, tendo em vista os fatores urbanos e modernos da vida cotidiana de hoje, somando sedentarismo e consumo excessivo de calorias e ainda a predisposição genética de muitos indivíduos (STIJNEN *et al*, 2014). É previsto pela OMS que o número de indivíduos obesos pode chegar a 700 milhões em 2015 (WHO; 2008).

É consenso público, desde 1991 que indivíduos com  $IMC \geq 40 \text{kg/m}^2$  ou ainda aqueles com  $IMC \geq 35 \text{kg/m}^2$  que apresentam comorbidades caracterizando a síndrome metabólica (SM), têm indicação para realização da cirurgia bariátrica (GASTRINTESTINAL, 1992). No entanto esse procedimento vem acontecendo com mais frequência, pois existe dificuldade em fidelizar os pacientes em programas de redução de peso (MAGGARD-GIBBONS *et al*, 2013). Só no Brasil, o número de cirurgias deu um salto quase inconcebível nos últimos 10 anos, mostrando um aumento de 1000 vezes. Uma das principais comorbidades associadas à OB é a DM2, a qual é diagnosticada em aproximadamente 80% destes indivíduos (BUCHWALD & OIEN, 2013).

A literatura nos apresenta inúmeros dados de melhora do DM2 logo em seguida da cirurgia RYGB, mostrando um número significativo de pacientes que descontinuam o uso de hipoglicemiantes. O mais interessante e ainda sem muitas explicações para esse fenômeno, é que ele ocorre antes mesmo do paciente começar a perder peso significativo (JORGENSEN; *et al*, 2012; HAMZA *et al* 2011, JACOBSEN *et al*, 2012). Uma das hipóteses é a mudança anatômica do sistema digestivo, começando pelo estômago e o desvio gástrico que acontece no duodeno (HOLST, 2013). Assim esse "novo sistema digestivo" seria estimulado de forma diferente pelo alimento. O epitélio do estômago, o intestino delgado e o grosso apresentam células enteroendócrinas especializadas na produção de hormônios intestinais, e essas são

sensíveis aos nutrientes que fluem pela luz intestinal. Com esse estímulo estas células secretam muitos hormônios na forma de seus precursores imaturos, que para a sua atividade fisiológica são dependentes de uma clivagem específica dentro das vesículas secretoras para após serem liberados (UGLEHOLDT, 2011).

Essas regiões do duodeno e jejuno são responsáveis pela liberação de muitas incretinas, que são hormônios insulinoatróficos, com destaque para GIP e GLP-1, ambos envolvidos, entre outros processos, no estímulo da liberação da insulina, controle do apetite e esvaziamento gástrico (UGLEHOLDT, 2011). Como essas incretinas são liberadas a partir do estímulo do alimento, a qualidade e o tipo de dieta influenciam diretamente nos níveis de transcrição e tradução, e ainda na liberação desses hormônios insulinoatróficos (SALINARI *et al*, 2013).

Essa pesquisa teve como foco principal, esclarecer alguns pontos sobre o processo de melhora do DM2 após a cirurgia bariátrica a partir da observação da transcrição de genes de incretinas, enzimas e fatores envolvidos na inflamação. Para tanto, sempre foram comparados indivíduos obesos NDM2 e DM2. Além disso, procuramos entender como estes genes, fatores de transcrição, peptídeos e proteínas são modulados por componentes dos alimentos, e para isto realizamos incubações do jejuno dos pacientes com glicose e ácidos graxos monoinsaturados, tão comuns no consumo diário destes.

Cabe esclarecer, que os cirurgiões optam por fazer o corte cirúrgico mais distante do ligamento de Treitz quando o indivíduo possui diagnóstico de diabetes, visto que, clinicamente observam um melhor desfecho metabólico para esta patologia após a cirurgia. Desta forma, o grupo de cirurgiões do COM/PUCRS, executam o corte a 60 cm distante do ligamento de Treitz para indivíduos OB NDM2 e 100 cm para OB DM2. Entretanto, ainda não existe uma explicação molecular para este fato, simplesmente uma observação clínica.

Inicialmente, procuramos determinar a expressão basal do mRNA de GIP, proglucagon, DPP-IV e PC1/3, ou seja, e expressão destes genes no jejuno, a nível do corte cirúrgico. A pesquisa ocorreu no jejuno a 60 ou 100 cm distantes do ligamento de Treitz (OB NDM2 e OB DM2, respectivamente), região que após a cirurgia irá receber o alimento proveniente do estomago, para ser digerido e absorvido.

Quanto a expressão do mRNA, em condições basais, dos genes próglucagon, GIP e DPP-IV, não observamos diferença significativa entre ambos os grupos OB NDM2 e OB DM2. Assim, apenas com base na expressão gênica das incretinas e da enzima DPP-IV, não se pode justificar a escolha do ponto cirúrgico para a anastomose da cirurgia e consequente melhora do DM2. Contudo conforme explanamos na introdução GIP e GLP-1 são peptídeos traduzidos na forma de pré-hormônios, portanto, próGIP e próglucagon precisam ser ativados pela enzima PC1/3, que cliva a porção amino terminal destes peptídeos. Constatamos que a transcrição desta enzima se mostrou com níveis significativamente diminuídos nos indivíduos OB DM2. Além disso, 36,5% das amostras não amplificaram os dois *primers* para PC1/3 utilizados nesse trabalho, ou seja, não conseguimos detectar mRNA para PC1/3 nestes pacientes, nas condições experimentais. Para comprovar que os *primers* utilizados selecionavam o gene específico de PC1/3, foi realizado o sequenciamento do cDNA obtido experimentalmente. Foi identificado um produto 99% similar ao gene da PC1/3 descrito para humanos. Estes resultados confirmam primeiro que os *primers* construídos estão de acordo com o gene em estudo e que alguns dos pacientes estudados apresentam deficiência ou alteração na expressão gênica. É possível que esses indivíduos possam ter desenvolvido uma mutação na região de anelamento do *primer* ou em qualquer outra região impedindo a amplificação desse gene. Há relatos comprovando polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) em toda a extensão do gene da PC1/3. Existem duas variantes para o gene PCSK1, ou NEC1, sendo que na variante 1, *primer* PC1/3a, *foward* apresenta SNP localizado na posição

2036 e o *reverse* apresenta SNPs nas posições: 2172 - 77. Para o primer PC1/3b, os SNPs se encontram nas posições 2093 para o *foward*, e 2268, 2273 e 2278 para *reverse*. Já na variante 2, o primer PC1/3a *foward* o SNP está localizado na posição 1694, e o *reverse* estão localizados nas posições 1819 - 1824. Para o primer PC1/3b, encontra os SNPs localizados na posição 1926 no *foward* e 1931 e 1936 no *reverse*. Esses SNPs se encontram logo após a localização do sítio catalítico da enzima.

Os primeiros trabalhos foram realizados com crianças que apresentavam obesidade precoce e distúrbios intestinais. Jackson e colaboradores (1997) descobriram que estas crianças apresentavam SNPs que impediam a maturação da enzima PC1/3, e conseqüentemente apresentavam o quadro descrito à cima.

Heni e colaboradores (2010) observaram em humanos, que SNPs no gene da PC1/3 não tem implicações com o IMC, e que em condições basais os níveis de pró-insulina basal não foram afetados pelas variantes em PCSK1. No entanto quando exigida maior liberação de insulina por uma carga de glicose, os SNPs apontam para ineficiente conversão da pró-insulina, e o nível de glicose circulante se mantém elevada. Ainda existem evidências que deficiências em PCSK1 podem provocar o desenvolvimento de diabetes insipidus (FRANK *et al*, 2013).

Por outro lado, outros grupos de pesquisa defendem que SNPs no gene PCSK1 pode sim estar ligado ao desenvolvimento da obesidade, desde a infância, provocando mudanças na liberação hormonal desde então. Nessa fase de desenvolvimento, os hormônios processados pela PC1/3 e secretados por células enteroendócrinas são importantes para suportar, especialmente, a elevada ingestão calórica necessária para o crescimento durante a primeira infância, porém essa exigência diminui depois disso (CREEMERS *et al*, 2012 e MARTÍN *et al*, 2013). Além disso, Stijnen e colegas (2014), em uma meta análise, sugerem que o

polimorfismo no gene PCSK1 predispõe os indivíduos a obesidade central, aumentando também o risco de doenças cardiovasculares e DM2.

Em vista destes resultados, procuramos avaliar o conteúdo de GIP e GLP-1 ativos nas células enteroendócrinas, pois não obtivemos diferença na expressão do mRNA destas incretinas, quando estudamos indivíduos obesos NDM2 ou DM2. Através de imunohistoquímica, utilizando marcadores fluorescentes, constatamos a presença de peptídeos ativos de GIP e GLP-1, nas regiões do jejuno 60 e 100 cm após o ligamento de Treitz, revelando a presença de tanto células K secretoras de GIP como células L que secretam GLP-1. Tanto obesos NDM2 e DM2 possuem estas duas importantes células enteroendócrinas. Os resultados de imunoconteúdo revelaram que as células do jejuno dos obesos DM2 apresentaram menor quantidade de GIP e GLP-1, apontando para uma relação direta entre a diminuída expressão de PC1/3 e conteúdo ativo dessas incretinas nas células enteroendócrinas destes pacientes.

É descrito que muitos pacientes OB DM2 apresentam resistência a incretina GIP (KIM & LEE, 2010; UGLEHOLDT, 2011), refletindo na deficiente sinalização primária da chegada do alimento no duodeno, que se dá via sinalização do nervo vago refletindo na primeira liberação de GLP-1. Assim, o *looping* neuroendócrino do eixo enteroinsular fica prejudicado e o estímulo para as células L e a liberação de GLP-1 ficam diminuídos (DAILEY & MORAN 2013; SUZUKI *et al*, 2010). Edholm e colaboradores (2010) sugere que a ação anabólica de GIP pós prandial, pode aumentar a captação de glicose pelo fígado e tecidos periféricos e ainda diminuir a produção de glicose pelo fígado. Tendo em vista a resistência a GIP, todas essas ações acabam sendo diminuídas. Por outro lado, OB DM2 apresentam níveis circulantes diminuídos de GLP-1, e apesar de ter sinalização preservada, (KIM, LEE, 2010), seus baixos níveis são responsáveis pela diminuição do estímulo na liberação da insulina, controle do apetite e esvaziamento gástrico e principalmente o aumento

da função das células betas pancreáticas, ações descritas para essa incretina em condições fisiológicas normais (EDHOLM *et al*, 2010; HOLST 2013). Com as mudanças anatômicas no sistema digestivo, após a cirurgia bariátrica, o bolo alimentar chega ao jejuno diretamente a 60 e 100 cm após ligamento de Treitz estimulando de forma diferenciada a liberação de tais incretinas.

Diversos trabalhos apontam para aumento da liberação de GLP-1 após a RYGB. Os níveis plasmáticos dessa incretina são significativamente aumentados pouco tempo após o procedimento cirúrgico. Esse fato é correlacionado com a melhora repentina do DM2 em pacientes submetidos a essa cirurgia (JØRGENSEN *et al*, 2012;HOLST, 2013)

As células enteroendócrinas intestinais se distribuem proporcionalmente; na região do duodeno estão em sua maioria as células K, secretoras de GIP (EGEROD *et al*, 2012; HARRISON *et al*, 2013), resultado confirmado por nós nos indivíduos eutróficos, em que constatamos no duodeno a expressão do mRNA de GIP e não de GLP-1; e gradativamente, a medida que se avança no jejuno surgem as células L endócrinas, que são secretoras de GLP-1, ou seja, ao longo do intestino se forma um gradiente de células K e L endócrinas. Assim também acontece com a digestão, que ocorre de forma diferenciada ao longo do intestino, em parte devido à diferente composição celular. Na primeira porção do duodeno ocorre a digestão principalmente dos açúcares, e no jejuno e íleo existe a metabolização dos ácidos graxos (DUCA, SAKAR, COVASA; 2013).

Na cirurgia bariátrica, ocorre um deslocamento do intestino, desviando o alimento para outras regiões do jejuno. O alimento parcialmente digerido no estomago passa a ter contato direto com as células que estavam a 60 ou 100 cm do jejuno. Em vista destas alterações anatômicas procuramos entender se os componentes dos alimentos, como glicose e ácidos graxos modulam a expressão e liberação dos hormônios GIP e GLP-1. Como se sabe é comum os indivíduos obesos consumirem elevadas quantidades de açúcares, especialmente

glicose. Por esse motivo, realizamos uma simulação, *in vitro*, incubando amostras de jejuno proximal e médio, em meio próprio de cultura contendo elevada concentração de glicose (11 mM). Observamos que a expressão do mRNA da enzima PC1/3 teve significativo aumento no jejuno dos indivíduos OB DM2. Adicionado a isso, observamos que houve um aumento do imunocontéudo de GLP-1. Esse resultado pode explicar o porquê do aumento dos níveis sanguíneos de GLP-1 após a cirurgia, relatado em diversos trabalhos (HALUZÍK, 2013). Agora a região mais distante do jejuno, rica em células L, geradora de GLP-1, quando em presença de glicose (o que comumente não receberia em altas concentrações, pois parte já teria sido absorvida no duodeno) ativa a transcrição de PC1/3 e forma mais GLP-1 na forma ativa. Esta mudança anatômica no sistema digestivo provoca adaptação metabólica, sugerindo que o tipo de nutriente pode agir como modulador.

O tecido intestinal é completamente innervado pelo sistema nervoso entérico (SNE), que possui neurônios e células da glia dispostos entre os dois principais plexos, e além de suporte mecânico essas células participam ativamente na regulação da homeostase, motilidade e processos inflamatórios dentro do intestino (CIRILLO *et al*, 2011). Essas células são sensíveis ao estímulo alimentar, sendo que a primeira porção (duodeno), rica em células K que secretam GIP, é imediatamente atingida. Esse primeiro contato físico do bolo alimentar com a mucosa intestinal, proporciona a secreção deste hormônio e estimula o SNE que sinaliza ao SNC, preparando o organismo para a digestão, promovendo a secreção antecipada de GLP-1, pelas células L no jejuno, mesmo antes do alimento chegar nesta região. Esse eixo enteroinsular proporciona maior eficácia da metabolização dos nutrientes. (KAZAKOS, 2011). Porém observamos em OB DM2 diminuído conteúdo de GIP e GLP-1, e assim podemos supor que esses diminuídos níveis de GIP provoca diminuída produção de GLP-1 ativo. Deixando essa via metabólica desacelerada. Entretanto, após a cirurgia, quando a porção mais distante do jejuno (100 cm a partir do Ligamento de Treitz) dos pacientes OB



DM2 entra em contato com altas concentrações de glicose, ocorre um aumento na transcrição da enzima PC 1/3 e maior bioativação de GLP-1, resultado observado pelo imunoconteúdo deste hormônio.

Nutrientes como ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) influenciam diretamente na sinalização da chegada de alimentos no trato gastrointestinal. Na presença de grande quantidade de gordura no alimento, a atividade da lipase lingual transforma triglicerídeos em AGCL livres, que em humanos leva aproximadamente um minuto para ativar a sinalização gustatória, através de células chamada "botões gustativos" (STEWART *et al* 2010; KULKARNI & MATTES, 2013). A ativação dos receptores de ácidos graxos faz com que aumente a concentração intracelular de cálcio e assim a despolarização da membrana celular resultando na ativação do nervo gustatório e liberando neurotransmissores como norepinefrina, serotonina e glutamato que agem no núcleo do trato solitário (EL-YASSIMI, 2008). GLP-1 secretado pelas células enteroendócrinas do intestino atua distantemente em receptores para GLP-1 (GLP-1Rs) no pâncreas e outros tecidos (BAGGIO & DRUCKER, 2007). Shin e colegas (2008) encontraram imunoreatividade para GLP-1Rs em fibras nervosas aferentes que se encontram próximas as células gustativas. Essas fibras aferentes comunicam informações sobre o sabor, para as células gustativas ativando o SNC. A proximidade do GLP-1 e o seu receptor indica que o GLP-1 é a sinalização local do botão gustativo, e sugere que este hormônio pode modular a sinalização de sabor de uma forma parácrina. Dessa forma o consumo de AGCL tem a capacidade de estimular a liberação de peptídeos intestinais, tal como GLP-1, através do aumento dos níveis de proteína quinase C e liberação de  $Ca^{2+}$  intracelular. GLP-1 sinaliza a sensação de satisfação e assim inicia a redução da ingestão de alimentos e diminui a velocidade do esvaziamento gástrico. Entretanto Duca e colaboradores (2013) ressaltam que o consumo frequente de grandes quantidades de ácidos graxos acaba diminuindo essa sensibilidade prejudicando a sinalização.

Visto esta modulação, utilizamos em nossa pesquisa três ácidos graxos monoinsaturados com diferentes configurações: o ácido oleico (C18:1 *cis*9), elaidico (C18:1 *trans*9) e vaccênico (C18:1 *trans*11). Esses isômeros apresentam diferentes ações no organismo humano, é sabido que o OL é um ácido graxo monoinsaturado com configuração *cis*, muito utilizado em dietas mediterrâneas e reconhecido pelos seus benefícios a saúde; o EL é seu isômero, tem configuração *trans*, é obtido na indústria após hidrogenação dos óleos vegetais (*trans* industrial) e o VA é também um isômero *trans* porém sintetizado no rúmem bovino e por isso é chamado de *trans* natural.

Inicialmente analisamos a expressão do mRNA de proglucagon, GIP, PC1/3 e DPP-IV, após 4 horas de incubação *in vitro* de uma pequena fatia do jejuno, com uma concentração de 50 µM dos ácidos graxos citados. Os resultados após incubação com o AG VA demonstraram uma maior expressão do mRNA de GIP em indivíduos OB NDM2, e um aumento da expressão do mRNA de proglucagon em ambos os grupos, ou seja, tanto OB NDM2 quanto OB DM2. Podemos inferir que o aumento de expressão destas incretinas é um efeito positivo, pois se houver maior transcrição gênica, pode haver maior síntese e conseqüentemente maior excreção dessas incretinas na circulação.

O OL, muito debatido na literatura pelos benefícios a saúde, não mostrou alterar a expressão de mRNA das incretinas, mas promoveu a diminuição da expressão do gene da enzima DPP-IV, responsável pela degradação das incretinas. Levando em consideração este fato, esse resultado é interessante, pois GIP e GLP-1 são degradados pela DPP-IV em um curto espaço de tempo. Se houver menor transcrição da enzima, teoricamente, haverá mais incretina disponível por mais tempo, logo o uso de alimentos ricos em ácido oleico, pode trazer benefício na modulação dos níveis plasmáticos de GIP e GLP-1. No entanto, evidências apontam para níveis elevados dessa enzima em indivíduos OB, existindo uma correlação positiva entre concentração de DPP-IV e IMC. Assim se essa enzima é responsável pela

degradação de peptídeos como GIP e GLP-1, a sinalização para diminuição na velocidade do esvaziamento gástrico, e de anorexígenos, bem como todas as outras ações previstas para essas incretinas fica prejudicada e pode auxiliar na caracterização da obesidade (STENGEL *et al*, 2014). Tratamentos com antagonistas de DPP-IV são muito utilizados, desde 2006, no tratamento da DM2, por exemplo, Vildagliptin, Sitagliptin and Saxagliptin. No entanto é preciso muito cuidado com a seletividade desse inibidor, pois quando inibida, outra enzima da família das DPPs, o indivíduo pode até chegar à morte (KAZAKOS, 2011).

Quanto ao isômero *trans* industrial, o EL, apesar de que vários trabalhos nos mostrem associação com resistência à insulina (TARDY, 2011), para nossa surpresa, este ácido graxo não alterou a expressão dos genes estudados, sugerindo que sua ação prejudicial ao metabolismo não se faz a nível destas incretinas. Park *et al* (2014) mostra que o consumo desse tipo de gordura, por peixes zebra (zebrafish, *Danio rerio*), pode causar uma inflamação crônica, juntamente com danos hepáticos e ainda um notável ganho de peso. O ácido graxo Trans industrial (AGTI) representa a maioria das gorduras da dieta ocidental, podendo chegar a 60% do total (STENDER *et al*, 2008). Harvey e colaboradores (2012), utilizando cultura primária de células do endotélio da aorta humana mostrou que o aumento de AGTI induz estado inflamatório no organismo, associando este com doenças cardiovasculares.

Sabe-se, no entanto, que a expressão de mRNA não garante que essas incretinas sejam traduzidas, bioativadas e secretadas. Para tanto, foram realizados os testes de imunohistoquímica para revelar o imunoconteúdo dessas células enteroendócrinas e o teste ELISA para quantificar a secreção de incretinas por estas células. As amostras de tecido de jejuno de ambos os grupos, OB NDM2 e OB DM2, foram incubadas com os ácidos OL e VA, por curtos e longos tempos, juntamente com inibidor de DPP-IV (KR-62436 – Sigma) para evitar que essas incretinas fossem inativadas e assim não detectadas. Foi observado que logo nos primeiros trinta minutos de exposição ao VA houve um significativo aumento no conteúdo

de GIP e GLP-1 nas células endócrinas do jejuno de OB DM2. E avaliando a secreção constatamos que somente o GIP teve sua secreção estimulada pelo AG VA no jejuno destes pacientes. Não foi observada modulação na secreção de GLP-1, tanto nos OB NDM2 e DM2.

GIP tem sua liberação minutos após a ingestão de alimentos, isso por ser secretado principalmente por células K localizadas na sua maioria na primeira porção do duodeno. Já GLP-1, produzido e secretado pelas células L que se localizam do jejuno proximal até o íleo, também tem sua secreção quase que instantânea, que ocorre através de sinalização neuroendócrina estabelecida pela liberação de GIP no duodeno (DUCKER & NAUCK, 2006). O GLP-1 é rapidamente secretado na circulação após a ingestão de nutrientes por via oral, e a sua secreção ocorre num padrão bifásico, começando dentro 10-15 minutos, e em seguida por uma fase mais longa de 30-60 minutos (BAGGIO & DURCKER. 2007).

Exposição do jejuno aos ácidos OL e VA por um período de tempo maior (2 horas) revelou que o imunoconteúdo de GIP diminuiu no tecido dos OB NDM2, sendo que o mesmo não foi revelado nos OB DM2. Este efeito é similar a situação pós-prandial em que a síntese e bioativação necessitam de um segundo estímulo. Entretanto, observou-se que o ácido VA promoveu um aumento no depósito de GLP-1 nas células L dos OB DM2, podendo estar associado a uma diminuição da liberação desta incretina, como foi observado nos resultados anteriores.

Os resultados obtidos sugerem uma dinâmica de bioativação e secreção das incretinas diferente entre obesos diabéticos e não diabéticos, bem como, mostram que o jejuno sofre influencia diferencial de acordo com o ácido graxo.

Muitos trabalhos científicos têm demonstrado que o AG OL exerce uma ação benéfica em diversas áreas da saúde. Schwingshackl e Hoffmann (2014) citam em sua revisão que o consumo desse AG diminui os riscos do desenvolvimento da obesidade, melhora o

metabolismo da glicose e o risco de doenças cardiovasculares. Estes autores apresentam um estudo de meta-análise que confirma que o AG OL diminui a inflamação endotelial melhorando sua função. Thomsen e colaboradores ( 2003), apontam para o aumento de GLP-1 na circulação de indivíduos DM2 após ingerirem AG OL. Porém, nossos experimentos mostraram que AG OL não modulou a expressão gênica do proGIP e proglucagon e síntese dos seus peptídeos ativos. Sua ação sobre a sensibilidade à insulina já descrita por outros autores (BAGGIO & DURKER, 2007) pode estar também relacionada a diminuição da transcrição da enzima DPP-IV, que, como já foi discutido anteriormente, promove um aumento de GLP-1 no sangue.

Para a ação entero insular se efetivar é necessário que as incretinas sejam liberadas para a circulação, para isso precisam previamente ser bioativadas pela enzima PC 1/3. Como já descrito, a exocitose de GIP foi estimulada pelo ácido VA em amostras de jejuno de DM2, sendo que o mesmo não foi encontrado em NDM2. Devemos considerar que GIP não tem ação anorexígena, mas estimula o pâncreas na liberação de mais insulina no organismo, e ainda faz a sinalização do eixo entero insular, provocando a liberação antecipada de GLP-1, preparando assim o organismo para o completo metabolismo pós-prandial. Entretanto, um grande fator complicador ainda existe, os obesos podem apresentar resistência à ação de GIP, prejudicando todo esse mecanismo.

GLP-1 que se mostrou passível de modulação na incubação com o ácido VA, tanto a nível da expressão de mRNA quanto do imunoconteúdo, não foi estimulado a ser secretado pelas células L dos obesos NDM2 ou DM2. Então partimos para outra questão: qual o motivo que está interrompendo esse processo?

Na obesidade, indivíduos com elevado IMC, apresentam grande percentual de gordura corporal, o que confere um tecido adiposo hipertrofiado. Esse tecido tem característica endócrina e libera diversas citocinas na circulação provocando um estado inflamatório

sistêmico e crônico promovendo disfunção endotelial, prejudicando assim processos ligados a secreção de peptídeos. A ligação entre a obesidade e inflamação já é reconhecida há muito tempo (SUN *et al*, 2015; NIJHUIS *et al*, 2007). O tecido adiposo mesentérico é reconhecido por sua grande atividade biológica com ação inflamatória local que se estende de forma sistêmica, podendo desencadear uma doença crônica. A grande produção de citocinas por este tecido pode provocar uma resposta inflamatória intestinal a partir da ativação de NFκ-B (PHARM *et al*, 2012). Esse estado inflamatório pode estar associado a uma disfunção tecidual, impedindo que as células endócrinas liberem seus conteúdos.

Nossos resultados revelaram que o tratamento com os ácidos graxos monoinsaturados testados, não foram capazes de modular a expressão do mRNA de NFκ-B tanto no jejuno de OB NDM2 e DM2, ou seja, as células não tratadas tiveram igual nível de expressão deste gene. Porém, observamos que o ácido VA estimulou significativamente a transcrição de NFκ-B no jejuno dos DM2 (mediana = 3,51 (1,58-5,10), quando comparado com NDM2 (mediana = 0,95 (0,06-2,05)).

Paralelamente, analisamos a expressão de mRNA de PPAR-γ. Os PPARs são receptores nucleares que regulam a atividade de uma variedade de processos biológicos, principalmente na homeostase da glicose e metabolismo dos lipídeos, adipogênese, respostas imunológicas e sensibilidade à insulina (MONSALVE *et al*, 2013). E da mesma forma que NFκ-B, PPAR-γ não apresentou diferença na expressão entre os tratamentos e controle, mas quando comparados os grupos de pacientes entre si, constatamos que o jejuno dos DM2 mostrou sempre uma menor expressão de PPAR-γ. Este pode ser um indicativo de um processo inflamatório a nível intestinal nos pacientes obesos diabéticos. Além disso, o ácido VA estimula a expressão do NFκ-B exacerbando a inflamação nestes pacientes. A razão aumentada, NFκ-B/PPAR-γ, em indivíduos DM2, nos indica um provável estado inflamatório

crônico do jejuno, não excluindo a participação do TAM, que pode interferir na liberação de GLP-1 pelas células enteroendócrinas. Esse tecido é essencial na secreção de hormônios que regulam a homeostase e o metabolismo, no momento que há um dano inflamatório nesse órgão o seu funcionamento fica prejudicado (TAN & BLOOM, 2013). Entretanto, após a RYGB, com perda de peso, é observado que os níveis de substâncias pró inflamatórias diminuí, favorecendo a melhora do DM2 e melhora da SM (NETTO *et al*, 2014). A literatura defende que PPAR- $\gamma$  além de agir no metabolismo de lipídeos, atua principalmente na manutenção da homeostase da glicemia, prevenindo hiperglicemias, pois no tecido adiposo ela regula a liberação de adiponectina e leptina que atuam como mediadores da ação da insulina no tecido periférico, e que a sua ativação em tecido adiposo além de diminuir a glicemia e a insulinemia, atenua a disfunção vascular (GRYGIEL-GÓRNIAK, 2014).

. Dessa forma, corroborando com os dados da literatura, sugerimos que os pacientes obesos e diabéticos apresentam já a nível intestinal um processo inflamatório mediado por NFk-B, interferindo na expressão de PPAR- $\gamma$ , prejudicando a fase inicial do metabolismo pós-prandial. Sugerimos que o aumento do mRNA de proglucagon e o conteúdo intracelular de GLP-1 sem significativa secreção pode estar associado com a diabetes e baixa inflamação característica destes pacientes.

NFk-B é fator de transcrição induzido por citocinas e que age no núcleo celular ativando genes que provocam processos inflamatórios. Inibidores de NFk-B são considerados potenciais candidatos para prevenção e também para terapia da inflamação (XIE *et al*, 2014). Ao contrário a ativação de PPAR $\gamma$ , está relacionada com a repressão de genes que induzem inflamação. agonistas dessa família de receptores, vem sendo muito visada como alvos para desenvolvimento de terapias para intervenção no DM2. (SCOTTI & TONTONOZ, 2010).

Com foco no quadro inflamatório dosamos na circulação a proteína S100B, na busca de um marcador sistêmico. Para tanto analisamos quatro grupos de pacientes: não obesos e

não diabéticos (NOB NDM2), não obesos e diabéticos (NOB DM2) os quais não foram submetidos a RYGB, obesos não diabéticos (OB NDM2) e obesos diabéticos (OB DM2) submetidos a RYGB.

Nossos resultados revelaram uma forte ligação entre níveis elevados de S100B e DM2. S100B foi primeiramente descrita como uma proteína específica de neurônios, mas logo depois, estudos revelaram que ela é uma proteína característica do SNC, pois hoje se sabe que ela está presente em diferentes tipos celulares, entre eles o tecido adiposo, descrito em 1983, primeiramente pelos japoneses e após por um grupo italiano (GONÇALVES *et al*, 2010 *apud* KATO *et al*, 1983). Está muito bem descrito que S100B é uma proteína secretada principalmente pelas células gliais dos SNC e SNE, ela possui a capacidade, entre outras, de fosforilar transformando em forma ativa o fator de inflamação NFκ-B além de controlar a velocidade do esvaziamento gástrico (QUI, 2013). Adipócitos tem grande capacidade de secreção de S100B, relacionando o IMC e o tecido adiposo visceral, principalmente com os estágios iniciais de DM2. Ratos OB, apresentando os primeiros sinais de resistência à insulina já possuem elevados níveis circulantes de S100B (GONÇALVES *et al*, 2010). A disfunção metabólica revelada em indivíduos OB está diretamente relacionada ao tecido adiposo visceral, principalmente quando se refere ao tecido adiposo que recobre a região intestinal, que em alguns casos chega a 50% da sua superfície. Esse depósito adiposo é biologicamente ativo, liberando diversas citocinas, promovendo a inflamação local (Pharm *et al*, 2012; Kredel & Siegmund, 2014).

Essa resposta inflamatória crônica e sistêmica colabora para o desenvolvimento da resistência à insulina seguida de DM2 (SCARPELLINI & TACK, 2012). Steiner e colaboradores (2010), sugerem que a resistência à insulina está diretamente relacionada à liberação de S100B pelo tecido adiposo. Além disso, ela está envolvida em doenças inflamatórias do intestino, principalmente região da mucosa duodenal, prejudicando assim a



atividade endócrina de fatores insulíntróficos nesse local (CIRILLO *et al*, 2011). Contudo, Celikbilek e colegas (2014), observam em DM2 diminuídos níveis de S100B na circulação comparado aos controles, e assim sugeriram que essa diminuição da S100B exerce um papel de neuroproteção. Esses dados obtidos por Celikbilek e colegas (2014) são o oposto daqueles por nós encontrados, observamos nos nossos pacientes que essa proteína está diretamente ligada ao DM2, pois ambos os grupos OB e NOB mostraram nível muito elevado de S100B comparado tanto aos NOB e OB NDM2, possibilitando assim a ligação entre elevados níveis de S100B e DM2.

No entanto, é observado por Buckman e colaboradores (2014), que esse aumento nos níveis circulantes de S100B durante a obesidade, é revertido pela perda de peso, em ratos. Eles mostraram que os níveis plasmáticos elevados de S100B observado na obesidade sugerem o potencial de ativação endócrina do eixo S100B-RAGE, responsável por provocar a inflamação tecidual, pode ser revertida com a perda de peso, pois observaram uma diminuição na expressão de mRNA de S100B. Curiosamente o gene RAGE nos SVFs (stromal-vascular fraction), tinha expressão reduzida em animais obesos, o que pode representar um mecanismo compensatório para reduzir a inflamação diante do aumento da S100B e outros ligantes de RAGE no tecido adiposo durante a obesidade.

Analisando os dados obtidos podemos supor que indivíduos OB DM2 apresentam uma diminuída expressão de PC1/3, enzima essencial para ativação das incretinas insulíntróficas, GIP e GLP-1. 36,5% dos OB DM2 que participaram desse estudo, não detectamos a expressão do mRNA de PC1/3. Para esses casos supomos que haja uma mutação pois os produtos de PCR foram sequenciados, e obtivemos 99% de semelhança com o que já há identificado no banco de dados do NCBI - Pubmed.

Essa deficiência na PC1/3 pode ser comprovado através da quantidade de imunocontéudo de GIP e GLP-1 ativos nas células enteroendócrinas desses pacientes. No

entanto, conseguimos observar que a dieta influencia esses parâmetros. A incubação com altas concentrações de glicose estimulou a expressão do mRNA de PC1/3 e o imunoconteúdo também foi aumentado.

A cirurgia RYGB altera toda a anatomia do sistema digestivo, e as respostas metabólicas pós-cirúrgicas dependem do tipo de alimentação e como esses nutrientes são processados e absorvidos pelo organismo. Levando essa mudança anatômica em consideração e o uso *in vitro* de AGs, podemos dizer que VA, AG *trans* natural, estimula a expressão e o imunoconteúdo de GLP-1 em OB DM2, no entanto não observamos esse aumento na liberação dessa incretina no meio. Por quê?

Atribuímos isso ao processo inflamatório da mucosa intestinal, indicada por NFκ-B e a baixa expressão de PPAR-γ, juntamente com os níveis circulantes elevados de S100B, e isso pode ser provocado pela qualidade da alimentação juntamente com a grande quantidade de tecido adiposo mesentérico. Esse estado inflamatório pode justificar a não secreção de GLP-1 por estes pacientes. Além disso, nosso trabalho mostra uma forte ligação entre os níveis séricos aumentados de S100B em indivíduos DM2 independente da obesidade.

## 11 CONCLUSÕES

Nosso trabalho permite concluir:

### Capítulo I

- Indivíduos obesos DM2 apresentam diminuída expressão de mRNA de PC1/3 no jejuno e isso pode interferir na ativação das incretinas.
- 36,5% das amostras analisadas não expressaram a enzima PC1/3, segundo os *primers* utilizados. Isso pode significar um tipo de mutação nesta população de obesos.
- Após a cirurgia RYGB, OB DM2 podem vir a normalizar os níveis de GLP-1 e glicemia, através da ação direta dos nutrientes como glicose, que segundo nossos resultados modulou positivamente a expressão de PC1/3 nas células do jejuno proximal (100 cm distante do ligamento de Treitz), refletindo assim em maior ativação de GLP-1 nesses indivíduos.

### Capítulo II

- O AG VAC estimulou a expressão do mRNA de GLP-1 em OB NDM2 e OB DM2.
- O AG VAC aumentou o imunoconteúdo de GLP-1 no jejuno de OB DM2 porem não estimulou a secreção desta incretina pelas células enteroendócrinas.
- O jejuno de pacientes OB DM2 através dos níveis de PPAR- $\gamma$  and NFk-B revelou um processo inflamatório na mucosa intestinal.

### Capítulo III

- Observamos uma forte ligação entre os elevados níveis plasmáticos de S100B e DM2 independente da obesidade.

## REFERÊNCIAS

- ABELES D; SHIKIORA S A. Bariatric Surgery: Current Concepts and Future Directions. **Aesthetic Surg J**; 28:79–84, 2008.
- ARAUJO A C F, *et al.* Duodenal–Jejunal Bypass Surgery Enhances Glucose Tolerance and Beta-Cell Function in Western Diet Obese Rats. **Obes Surg**; 22:819–826, 2012.
- ATANASOVA D, *et al.* Obesity in the news: directions for future research. **Obes rev**; 13: 554–559, 2012.
- BAGGIO L L & DRUCKER D J. Biology of Incretins: GLP-1 and GIP. **Gastroent**; 132:2131–2157, 2007.
- BAKER M T. The History and Evolution of Bariatric Surgical Procedures. **Surg Clin N Am**; 91: 1181–1201, 2011
- BENDSEN N T, *et al.* Effect of trans-fatty acid intake on insulin sensitivity and intramuscular lipids—a randomized trial in overweight postmenopausal women. **Metab clin and exp**; 906 – 913, 2011.
- BOADA A. Lesiones cutáneas en el pie diabético. **Actas Dermosifiliogr**; 103:348-356, 2012.
- BRETHAUER S A; *et al.* Can Diabetes Be Surgically Cured? Long-Term Metabolic Effects of Bariatric Surgery in Obese Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. **Ann Surg**; 258:628–637, 2013.
- BROUWER I A, WANDERS A J, KATAN M B. Effect of Animal and Industrial Trans Fatty Acids on HDL and LDL Cholesterol Levels in Humans – A Quantitative Review. **Plos one**, 5: e9434, 2010.
- BUCHWALD H, OIEN DM. Metabolic/Bariatric Surgery Worldwide 2011. **Obes surg**; 23:427–436, 2013.
- BUCHWALD H; *et al.* Bariatric Surgery: A Systematic Review and Meta-analysis. **Jama**; 292:1724-1737, 2004.
- BUCKMAN L B, *et al.* Regulation of S100B in white adipose tissue by obesity in mice. **Adip**; 3:215–220, 2014.
- CELIKBILEK A. S100B as a glial cell marker in diabetic peripheral neuropathy. **Neuroscience Letters**; 558: 53– 57, 2014.
- CERIELLO A, *et al.* The protective effect of the Mediterranean diet on endothelial resistance to GLP-1 in type 2 diabetes: a preliminary report. **Cardiovasc Diabetol**. 19:140, 2014.

- CHAWLA A, *et al.* Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. **Science**; 294:1866–1870, 2001.
- CHO YM & KIEFFER TJ. K-cells and glucose-dependent insulinotropic polypeptide in health and disease. **Vitam Horm**; 84:111-50, 2010.
- CIRILLO C, *et al.* S100B protein in the gut: The evidence for enteroglia-sustained intestinal inflammation. **World J Gastroenterol**; 17:1261-1266, 2011
- CRAIG-SCHMIDT M C. World-wide consumption of trans fatty acids. **Atheroscler**; 7: 1–4, 2006.
- CREEMERS JWM, *et al.* Heterozygous Mutations Causing Partial Prohormone Convertase 1 Deficiency Contribute to Human Obesity. **Diabetes**; 61:383–390, 2012.
- DAILEY M J & MORAN T H. Glucagon-like peptide 1 and appetite. **Trends Endocrinol Metab**; 24: 85–91, 2013.
- DESVERGNE B, WAHLI W. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Nuclear Control of Metabolism. **Endoc Rev**; 20:649–688, 1999.
- DIAKOGIANNAKI E, *et al.* Nutrient detection by incretin hormone secreting cells. **Phys & Beh**; 106: 387–393, 2012.
- DONATO R, *et al.* Functions of S100 Proteins. **Curr Mol Med**; 13:24–57, 2013.
- DORFMAN S E, *et al.* Metabolic Implications of Dietary Trans-fatty Acids. **Obes**; 17:1200–1207, 2009.
- DRUCKER DJ & NAUCK MA. the incretin system: glucagon like peptide-1 receptor agonist and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. **Lancet**; 11:1696-705, 2006.
- DUCA FA, SAKAR Y, COVASA M. The modulatory role of high fat feeding on gastrointestinal signals in obesity. **J of Nut Bioc**; 24:1663–1677, 2013.
- EDHOLM T, *et al.* Differential incretin effects of GIP and GLP-1 on gastric emptying, appetite, and insulin-glucose homeostasis. **Neur Motil**; 22:1191–e315, 2010.
- EGEROD K L, *et al.* A Major Lineage of Enteroendocrine Cells Coexpress CCK, Secretin, GIP, GLP-1, PYY, and Neurotensin but Not Somatostatin. **Endoc**; 153: 5782–5795, 2012.
- EL-YASSIMI A, *et al.* Linoleic Acid Induces Calcium Signaling, Src Kinase Phosphorylation, And Neurotransmitter Release In Mouse CD36-Positive Gustatory Cells. **The J of Bio Chem**; 283:12949–12959, 2008
- FAERCH K, *et al.* Relationship between insulin resistance and beta cell dysfunction in subphenotypes of pre-diabetes and type 2 diabetes. **J Clin Endocrinol Metab**, doi: 10.1210/jc.2014-2853, 2014.

FAJAS L, *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ : from adipogenesis to carcinogenesis. **J of Mol Endoc**; 27:1–9, 2001.

FRANK G R, *et al.* Severe obesity and diabetes insipidus in a patient with PCSK1 deficiency. **Mol Genet Metab**; 110:191–194, 2013.

GASTROINTESTINAL Surgery for Severe Obesity. NIH Consens Dev Conf Consens Statement, 1991. **J Clin Nut**; 55:615S-9S, 1992.

GONÇALVES CA, *et al.* Adipocytes as an Important Source of Serum S100B and Possible Roles of This Protein in Adipose Tissue. **Card Psy and Neuro**; 790431-38, 2010.

GRYGIEL-GÓRNIAK B. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications – a review. **Nut J**; 13:17, 2014.

GUAN Y, *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor-g activity is associated with renal microvasculature. **Am J Physiol Renal Physiol**, 281: F1036–F1046, 2001.

GUARIGUATA L, *et al.* Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. **Diab res and clin prac**; 137 – 149, 2014.

HALUZÍK M. Bariatric Surgery and the Mechanism of Diabetes Remission: Are We Getting There? **J Clin Endocrinol Metab**; 98:4336–4338. 2013.

HAMZA N, *et al.* Predictors of remission of type 2 diabetes mellitus after laparoscopic gastric banding and bypass. **Sur for Obe and Rel Dis**; 7: 691–696, 2011.

HARIKA R K, *et al.* Intake of Fatty Acids in General Populations Worldwide Does Not Meet Dietary Recommendations to Prevent Coronary Heart Disease: A Systematic Review of Data from 40 Countries. **Ann Nutr Metab**;63:229–238, 2013.

HARRISON E, LAL S, MCLAUGHLIN JT. Enteroendocrine cells in gastrointestinal pathophysiology. **Cur Opin in Pharm**, 13:941–945, 2013.

HARVEY KA, *et al.* Trans Fatty Acids: Induction of a Pro-inflammatory Phenotype in Endothelial Cells. **Lip**, 47:647–657, 2012.

HENI M, *et al.* Association of obesity risk SNPs in *PCSK1* with insulin sensitivity and proinsulin conversion. **BMC Med Gen**; 11:86, 2010.

HERRON D M & ROOHIPOUR R. Bariatric Surgical Anatomy and Mechanisms of Action. **Gast End Clin N Am**; 21: 213–228, 2011.

HEVENER, A L, *et al.* Macrophage PPAR $\gamma$  is required for normal skeletal muscle and hepatic insulin sensitivity and full antidiabetic effects of thiazolidinediones. **J Clin Invest**; 117:1658–1669, 2007.

HISTÓRIA da Cirurgia Bariátrica.

Disponível em: [http://www.cirurgiadaobesidade.net/area\\_tecnico.php?id=3](http://www.cirurgiadaobesidade.net/area_tecnico.php?id=3)

HOLST JJ. Enteroendocrine secretion of gut hormones in diabetes, obesity and after bariatric surgery. **Cur Opin in Pharm**; 13:983–988, 2013.

HOMMELBERG P P, *et al.* Trans Fatty Acid-Induced NF- $\kappa$ B Activation Does Not Induce Insulin Resistance in Cultured Murine Skeletal Muscle Cells. **Lip**; 45:285–290, 2010.

HONORS M A, *et al.* Trends in Fatty Acid Intake of Adults in the Minneapolis-St Paul, MN Metropolitan Area, 1980–1982 Through 2007–2009. **J Am Heart Assoc**; 3:e001023, 2014.

JACKSON R S, *et al.* Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. **Nat gen**; 16, 1997.

JACOBSEN S H, *et al.* Changes in Gastrointestinal Hormone Responses, Insulin Sensitivity, and Beta-Cell Function Within 2 Weeks After Gastric Bypass in Non-diabetic Subjects. **Obes Surg**, 22:1084–1096, 2012.

JOFFE, S N. Surgical management of morbid obesity. **Gut**, 22:242-254, 1981.

JOHN W.M, *et al.* Heterozygous Mutations Causing Partial Prohormone Convertase 1 Deficiency Contribute to Human Obesity. **Diab**; 61:383–390, 2012.

JØRGENSEN N B, *et al.* Acute and long-term effects of Roux-en-Y gastric bypass on glucose metabolism in subjects with Type 2 diabetes and normal glucose tolerance. **Am J Physiol Endocrinol Metab** 303: E122–E131, 2012.

KASHYAP S R, *et al.* Metabolic Effects of Bariatric Surgery in Patients With Moderate Obesity and Type 2 Diabetes. **Diab Care**; 36:2175–2182, 2013.

KAZAKOS K. Incretin effect: GLP-1, GIP, DPP4. **Diab Res and Clin Prac**; 93S: S32–S36, 2011.

KIM M & LEE M. The Incretins and Pancreatic  $\beta$ -Cells: Use of Glucagon-Like Peptide-1 and Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide to Cure Type 2 Diabetes Mellitus. **Korean Diab J**; 34:2-9, 2010.

KLIEWER S A, *et al.* Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors  $\alpha$  and  $\gamma$ . **Proc Natl Acad Sci USA, Bioch**; 94:4318–4323, 1997.

KRAFT, J *et al.* Trans-18:1 Profile in Food and the Potential Physiological Relevance, 4th Euro Fed Lipid Congress, Madrid, Spain 2006.

KREDEL L I, Siegmund B. Adipose-tissue and intestinal inflammation – visceral obesity and creeping fat. **Front in immun**; 5:462, 2014.

KUHNT K, *et al.* Trans fatty acid isomers and the trans-9/trans-11 index in fat containing foods. **Eur J Lipid Sci Technol**; 113:1281–1292, 2011.



- KULKARNI B & MATTES R. Evidence for Presence of Nonesterified Fatty Acids as Potential Gustatory Signaling Molecules in Humans. **Chem. Senses** 38: 119–127, 2013.
- KUSHNER, R F. Weight Loss Strategies for Treatment of Obesity. **Prog in card diseas**; 56:465-472, 2014.
- LAFERRÈRE B, *et al.* Effect of weight loss by gastric bypass surgery versus hypocaloric diet on glucose and incretin levels in patients with type 2 diabetes. **J Clin Endocrinol Metab**, 93: 2479-2485, 2008.
- LE ROUX C W, *et al.* Gut Hormone Profiles Following Bariatric Surgery Favor an Anorectic State, Facilitate Weight Loss, and Improve Metabolic Parameters. **Ann Surg**; 243:108–114, 2006.
- LEE C, *et al.* Minireview: Lipid Metabolism, Metabolic Diseases, and Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. **Endoc**; 144: 2201–2207, 2003.
- LI X & STARK G R. NFκ-B dependent signaling pathways. **Exp Hemato**, 30: 285–296, 200.
- LIM J, *et al.* *trans*-11 18:1 Vaccenic Acid (TVA) Has a Direct Anti-Carcinogenic Effect on MCF-7 Human Mammary Adenocarcinoma Cells. **Nutri**; 6:627-636; 2014.
- LOVEJOY J C, *et al.* Effects of Diets Enriched in Saturated (Palmitic), monounsaturated (Oleic), or trans (Elaidic) Fatty Acids on Insulin Sensitivity and Substrate Oxidation in Healthy Adults. **Diab Care**; 25:1283–1288, 2002.
- MAGGARD-GIBBONS M; *et al.* Bariatric Surgery for Weight Loss and Glycemic control in Nonmorbidly Obese Adults With Diabetes, A Systematic Review. **Jama**; 309:2250-2261, 2013.
- MARTÍN M G, *et al.* Congenital Proprotein Convertase 1/3 Deficiency Causes Malabsorptive Diarrhea and Other Endocrinopathies in a Pediatric Cohort. **Gastr**;145:138–148, 2013.
- MINGRONE G, *et al.* Bariatric Surgery versus Conventional Medical Therapy for Type 2 Diabetes. **N Engl J Med**; 366:1577-85, 2012.
- MOHANKUMAR S K, *et al.* Dietary supplementation of *trans*-11-vaccenic acid reduces adipocyte size but neither aggravates nor attenuates obesity-mediated metabolic abnormalities in *fa/fa* Zucker rats. **Brit J of Nut**; doi:10.1017/S000711451200339X, 2012.
- MONSALVE F A, *et al.* Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Targets for the Treatment of Metabolic Diseases. **Med of Inflamm**, 549627- 35, 2013.
- MONTEIRO JÚNIOR F C; *et al.* Efeito da Perda Ponderal Induzida pela Cirurgia Bariátrica sobre a Prevalência de Síndrome Metabólica. **Arq Bras Cardiol**; 92:452-456, 2009.
- MOTTIN CC, *et al.* Behavior of type 2 diabetes mellitus in morbid obese patients submitted to gastric bypass. **Obes Surg**; 18:179–81, 2008.

MOZAFFARIAN D, *et al.* Health effects of trans-fatty acids:experimental and observational evidence. **Euro J of Clin Nut**, 63:S5–S21, 2009.

NASTESKA D, *et al.* Chronic reduction of GIP secretion alleviates obesity and insulin resistance under high fat diet condition. **Diab**; 28, 2014.

NELSON D L & COX, M. **Lehninger – Princípios de Bioquímica**. 3ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

NETTO B D M; *et al.* Roux-en-Y Gastric Bypass Decreases Pro-inflammatory and Thrombotic Biomarkers in Individuals with Extreme Obesity. **Obes surg**, DOI 10.1007/s11695-014-1484-7, 2014.

NIJHUIS J, *et al.* Endothelial Activation Markers and Their Key Regulators after Restrictive Bariatric Surgery. **Obes**; 15, 2007.

ODEGAARD J I, *et al.* Macrophage-specific PPAR $\gamma$  controls alternative activation and improves insulin resistance. **Nat**; 28:1116–1120. doi:10.1038/nature05894. 2007.

PANIAGUA J A, *et al.* A MUFA-Rich Diet Improves Postprandial Glucose, Lipid and GLP-1 Responses in Insulin-Resistant Subjects. **J of the Am Col of Nut**; 26:434–444, 2007.

PARK K, *et al.* Elaidic acid (EA) generates dysfunctional high-density lipoproteins and consumption of EA exacerbates hyperlipidemia and fatty liver change in zebrafish. **Mol. Nutr Food Res**; 58: 1537–1545, 2014.

PETERSON GL. Review of the Folin Phenol Protein Quantitation Method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. **Anal Bioch**; 100: 201-220, 1979.

PICKETT L A, *et al.* Functional Consequences of a Novel Variant of PCSK1. *Plos One*; 8: 1-e55065, 2013.

PHARM M D, *et al.* Visceral fat and gut inflammation. **Nut**; 28: 113–117, 2012.

PINHEIRO D S, *et al.* Avaliação do nível de controle glicêmico dos pacientes diabéticos tipo 2 atendidos em um Hospital Universitário. **Rev da Uni Vale do Rio Verde**; 10:03-11, 2012.

PREIS S R, *et al.* Abdominal Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue and Insulin Resistance in the Framingham Heart Study. **Obes**; 18:2191–2198, 2010.

QUI Y C. Role of enteric glial cells in gastric motility in diabetic rats at different stages. **Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]**; 33:496-500, 2013.

RASK E, *et al.* Impaired Incretin Response After a Mixed Meal Is Associated With Insulin Resistance in Nondiabetic Men. **Diab Care**, 24:1640–1645, 2001.

RHEE N A, *et al.* Current evidence for a role of GLP-1 in Roux-en-Y gastric bypass-induced remission of type 2 diabetes. **Diab, Obes and Metab**; 14: 291–298, 2012.

RISÉRUS U, *et al.* Dietary fats and prevention of type 2 diabetes. **Prog Lipid Res**; 48: 44–51, 2009.

ROCCA A S, *et al.* Monounsaturated Fatty Acid Diets Improve Glycemic Tolerance through Increased Secretion of Glucagon-Like Peptide-1. **Endoc**; 142:1148–1155, 2001.

ROSEN E D, SPIEGELMAN B M. PPAR $\gamma$ : a Nuclear Regulator of Metabolism, Differentiation, and Cell Growth. **J. Biol. Chem**; 276:37731-37734, 2001.

RUBINO F & GAGNER M. Potential of Surgery for Curing Type 2 Diabetes Mellitus. **Ann of Surg**; 236:554–559, 2002.

RUBINO F & MARESCAUX J. Effect of duodenal-jejunal exclusion in a non-obese animal model of type 2 diabetes a new perspective of an old disease. **Ann of surg**, 239, 2004.

RUBINO F, *et al.* Metabolic surgery: the role of the gastrointestinal tract in diabetes mellitus. **Nat Rev Endocrinol**; 6:102–109, 2010.

RUBINO F, *et al.* The Early Effect of the Roux-en-Y Gastric Bypass on Hormones Involved in Body Weight Regulation and Glucose Metabolism. **Ann of Surg**; 240: 236–242, 2004.

RUTH R M, *et al.* Vaccenic and Elaidic Acid Modify Plasma and Splenocyte Membrane Phospholipids and Mitogen-Stimulated Cytokine Production in Obese insulin Resistant JCR: LA-cp Rats. **Nut**; 2:181-197; doi:10.3390/nu2020181, 2010.

SALINARI S, *et al.* Duodenal-jejunal Bypass and Jejunectomy Improve Insulin Sensitivity in Goto-Kakizaki Diabetic Rats Without Changes in Incretins or Insulin Secretion. **Diab**; 63, 2014.

SALINARI S, *et al.* Nutrient infusion bypassing duodenum-jejunum improves insulin sensitivity in glucose-tolerant and diabetic obese subjects. **Am J Physiol Endocrinol Metab** 305: E59–E66, 2013.

SCARPELLINI E, T J. Obesity and Metabolic Syndrome: An Inflammatory Condition. **Dig Dis**; 30:148–153, 2012.

SCHMIDT V M, *et al.* The Nuclear Hormone Receptor PPAR $\gamma$  as a Therapeutic Target in Major Diseases. **The Scient World J**; 10:2181–2197, 2010.

SCHWINGSHACKL L & HOFFMANN G. Monounsaturated fatty acids, olive oil and health status: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. **Lip in Heal and Dis**, 13:154, 2014.

SCOTTI E & TONTONOZ P. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  \_ Dances with Different Partners in Macrophage and Adipocytes. **Mol And Cel Bio**; 30: 2076–2077, 2010.

SHAO-ZHUANG L, *et al.* A high-fat diet reverses improvement in glucose tolerance induced by duodenal-jejunal bypass in type 2 diabetic rats. **Chin Med J**; 125:912-919, 2012.

SHIN Y, *et al.* Modulation of taste sensitivity by GLp-1 signaling. **J of Neuro**, 106: 455-463, 2008.

SHUKLA A P, *et al.* Surgical treatment of type 2 diabetes: the surgeon perspective. **Endocrine**, 40:151–161, 2011.

SPÉGEL P, *et al.* Glucose-dependent insulinotropic polypeptide lowers branched chain amino acids in hyperglycemic rats. **Regul Pept**; 8:11-16, 2014.

STEINER J, *et al.* S100B Serum Levels in Schizophrenia Are Presumably Related to Visceral Obesity and Insulin Resistance. **Card Psych and Neuro**; 480707-718, 2010.

STENDER S, ASTRUP A, DYERBERG J. Ruminant and industrially produced trans fatty acids: health aspects. **Food & Nut Res**. DOI: 10.3402/fnr.v52i0.1651, 2008.

STENGEL A V, *et al.* Obese patients have higher circulating protein levels of dipeptidylpeptidase. **Pep**; 61:75–82, 2014.

STEWART JE; *et al* Oral sensitivity to fatty acids, food consumption and BMI in human subjects. **Brit J of Nut**; 104:145–152, 2010.

STIJNEN P, *et al.* The Association of Common Variants in PCSK1 With Obesity: A HuGE Review and Meta-Analysis. **Amer J of Epid**; 180, 2014.

SUN F, *et al.* Effects of Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Agonists on Weight Loss in Patients with Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Network Meta-Analysis. **J of Diab Res**, 9:157201-210, 2015.

SUZUKI K, *et al.* Bloom S R. The role of gut hormones and the hypothalamus in appetite regulation. **End J**; 57:359-372, 2010.

TAM CS, *et al.* Could the mechanisms of bariatric surgery hold the key for novel therapies? A report from the Pennington Scientific Symposium. **Obes Rev**; 12: 984–994, 2011.

TAN T & BLOOM S. Gut hormones as therapeutic agents in treatment of diabetes and obesity. **Cur Opin in Pharm**; 13:996–1001, 2013.

TARDY A-L, *et al.* Effects of trans MUFA from dairy and industrial sources on muscle mitochondrial function and insulin sensitivity. **J Lipid Res**; 49: 1445–1455, 2008.

TARDY A-L, *et al.* Ruminant and industrial sources of trans-fat and cardiovascular and diabetic diseases. **Nut Res Rev**, 24:111–117, 2011.

THOMSEN C, *et al.* Differential effects of saturated and monounsaturated fatty acids on postprandial lipemia and incretin responses in healthy subjects. **Am J Clin Nutr**; 69:1135–43, 1999.

THOMSEN C, *et al.* Differential effects of saturated and monounsaturated fats on postprandial lipemia and glucagon-like peptide 1 responses in patients with type 2 diabetes. **Am J Clin Nutr**; 77:605–11, 2003.

TSUCHIYA A, *et al.* Oleic Acid Stimulates Glucose Uptake Into Adipocytes by Enhancing Insulin Receptor Signaling. **J Pharmacol Sci**, 126, 000 – 000, 2014.

UGLEHOLDT R. Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide (GIP): From prohormone to actions in endocrine pancreas and adipose tissue. **Dan Med Bull**; 58:B4368, 2011.

VELÁZQUEZ-LÓPEZ L, *et al.* Mediterranean-style diet reduces metabolic syndrome components in obese children and adolescents with obesity. **BMC Ped**, 14:175, 2014.

VEST A R; *et al.* Surgical Management of Obesity and the Relationship to Cardiovascular Disease. **Circul**;127:945-959, 2013.

WANG T & LEE HG. Advances in Research on cis-9, trans-11 Conjugated Linoleic Acid: A Major Functional Conjugated Linoleic Acid Isomer. **Crit Rev in Food Science and Nut**; 55:5, 2015.

WANG Y, *et al.* The intestinal bioavailability of vaccenic acid and activation of peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  and - $\beta$  in a rodent model of dyslipidemia and the metabolic syndrome. **Mol. Nutr. Food Res**; 56, 1234–1246, 2012.

WANG Y, *et al.* *trans*-11 Vaccenic Acid Dietary Supplementation Induces Hypolipidemic Effects in JCR:LA-cp Rats. **J. Nutr.** 138: 2117–2122, 2008.

WARDMAN JH, *et al.* Analysis of peptides in prohormone convertase 1/3 null mouse brain using quantitative peptidomics. **J Of Neuro**; 114: 215–225, 2010.

WELTERS H J, *et al.* Expression and functional activity of PPAR $\gamma$  in pancreatic  $\beta$  cells. **Brit J of Pharm**, 142:1162–1170, 2004.

WEYER C, *et al.* The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **J. Clin. Invest.**, 104:787–794, 1999.

WORLD Health Organization (WHO). **Obesity**. Geneva: WHO; 2008.

WORLD health statistics 2012. WHO - World Health Organization. ISBN 978 92 4 156444 1. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>.

WU Q & SHAH N P. Effects of Elaidic Acid, a Predominant Industrial Trans Fatty Acid, on Bacterial Growth and Cell Surface Hydrophobicity of Lactobacilli. **J of Food Science**, 2014.

XIE L, *et al.* Activity-guided isolation of NF- $\kappa$ B inhibitors and PPAR $\gamma$  agonists from the root bark of *Lycium chinense* Miller. **J of Ethnopharm**,152: 470–477, 2014.

XU G; *et al.* Downregulation of GLP-1 and GIP Receptor Expression by Hyperglycemia, Possible Contribution to Impaired Incretin Effects in Diabetes. **Diab**, 56:1551–1558, 2007.

YABE D, SEINO Y. Two incretin hormones GLP-1 and GIP: Comparison of their actions in insulin secretion and  $\beta$  cell preservation. **Prog in Bioph and Mol Bio**; 107: 248-256, 2011.

ZHANG C, *et al.* Interactions between gut microbiota, host genetics and diet relevant to development of metabolic syndromes in mice. **The ISME J**; 4:232–241, 2010.

## ANEXOS

## PARTE II

### Capítulo I

Tabela 01: Oligonucleotídeos usados para a reação qRT-PCR.....	49
Tabela 02: Parâmetros bioquímicos e antropométricos dos pacientes OB NDM2 e DM2.....	50
Table 03: expressão do mRNA de GIP, proglucagon, DPP-IV, e PC1/3 em jejuno de obesos mórbidos NDM2 e DM2.....	50
Table 04: Imunoconteúdo de GIP e GLP-1 nas células enteroendócrinas de jejuno de OB NDM2 e DM2 com e sem tratamento dom glicose.....	51
Table 05: Expressão do mRNA de GIP, proglucagon, DPP-IV e PC1/3, no jejuno de OB NDM2 e DM2 após incubação com alta consentração de glicose.....	52

### Capítulo II

Tabela 01: Parâmetros bioquímicos e antropométricos dos pacientes OB NDM2 e DM2.....	79
Tabela 02: Oligonucleotídeos usados para a reação qRT-PCR.....	80
Tabela 03: Efeito dos ácidos oleico, elaidico e vaccênico sobre a expressão de mRNA de GIP, proglucagon, DPP-IV e PC1/3 no jejuno de obesos mórbidos.....	81
Tabela 04: Efeito dos ácidos oleico, elaidico e vaccênicosobre a expressão de mRNA NFk-B e PPARg no jejuno de obesos mórbidos.....	82
Tabela 05: Imuno conteúdo de GIP e GLP-1 nas células do jejuno de obesos NDM2 e T2DM após incubação com ácido oleico.....	83
Tabela 06: Imuno conteúdo de GIP e GLP-1 nas células do jejuno de obesos NDM2 e T2DM após incubação com ácido vaccêncio.....	84
Tabela 07: Secreção de GIP e GLP-1 em NDM2 e T2DM.....	85

### Capítulo III

Tabela 01: Parâmetros bioquímicos e antropométricos dos pacientes NOB NDM2 e DM2.....	92
Tabela 02: Parâmetros bioquímicos e antropométricos dos pacientes OB NDM2 e DM2.....	92
Tabela 03: Determinação de S100B no soro de NOB NDM2 e DM2; e OB NDM2 e DM2.....	93



## Lista de figuras

### PARTE I

Figura 01: Ilustração didática mostrando que na RYGB.....	15
Figura 02: Fatores anti incretinas e incretinas.....	19
Figura 03: Gene, mRNA, proteína de GIP e GLP-1.....	21
Figura 04: Secreção e metabolismo de GiP e GLP-1.....	24
Figura 05: Ação e degradação de GIP e GLP-1.....	26
Figura 06: Tecido adiposo mesentérico.....	29
Figura 07: Mecanismo de transcrição de PPAR.....	32
Figura 08: Estruturas dos ácidos graxos Oleico, Elaidico, Vaccênico.....	33

### PARTE II

#### Capítulo I

Figura 01: imagem representativa da presença de GIP e GLP-1 em células enteroendócrinas de OB.....	51
--	----

#### Capítulo II

Figura 01: Imagem representativa da integridade após processamento do tecido e incubação com VA, mostrando imunoreação para GIP e GLP-1.....	86
Figura 02: Comparação da expressão de PPARg e NFk-B após tratamento com VA em OB NDM2 e DM2.....	87

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O projeto de pesquisa intitulado: "**Estudo da expressão de mRNA, síntese e liberação de GIP e GLP-1 no jejuno de indivíduos obesos grau III, diabéticos e não diabéticos, sua modulação por ácidos graxos monoinsaturados e envolvimento de marcadores inflamatórios**" será realizado pela UFRGS, com pacientes obesos mórbidos do Centro de Obesidade Mórbida do Hospital São Lucas da PUC. O pesquisador responsável é: Regina M. Guaragna.

Esta pesquisa tem por objetivo: Analisar e quantificar a expressão de mRNA de PPAR $\gamma$ , NF $\kappa$ -B, GLP-1, GIP, PC1/3 e DPP-IV nas células endócrinas gastrointestinais do jejuno proximal e médio de indivíduos obesos grau III. Bem como modular com diferentes ácidos graxos a expressão desses mRNAs nesse tecido.

Em outras palavras, dados clínicos têm mostrado que após a cirurgia da obesidade os pacientes que apresentam diabetes mellitus do tipo 2 demonstram uma melhora dessa comorbidade. Para melhor compreender o porquê desse fenômeno é necessário elucidar o mecanismo molecular, isto é, o quanto as células estão produzindo de hormônios intestinais que auxiliam na liberação de insulina e assim melhoram o estado de diabetes. Sabe-se também que esses hormônios são estimulados por alguns alimentos, e assim fazendo incubações *in vitro* com gorduras e açúcar, poderemos compreender o que estimula ou inibe a liberação desses hormônios. Além disso, estudos relacionam o desenvolvimento da diabetes mellitus do tipo 2 está relacionado com processo inflamatório, e para observarmos isso serão avaliados genes que podem estar envolvidos nesse processo.

Este trabalho também tem objetivo acadêmico, pois se trata da tese de doutorado da aluna Francieli Rohden.

As amostras serão coletadas no momento da cirurgia, onde será retirado 1/2cm<sup>2</sup> para análise sem tratamento e 5g para as incubações. A retirada das amostras não trará prejuízos à saúde do voluntário, pois esse tecido seria desprezado no momento do corte cirúrgico.

Os participantes do estudo aderirão ao mesmo voluntariamente, podendo a sua participação ser interrompida em qualquer etapa, sem nenhum prejuízo ou punição. A qualquer momento, os participantes poderão solicitar informações sobre os procedimentos relacionados a este estudo. Todos os cuidados serão tomados para garantir o sigilo e a confidencialidade das informações, preservando a identidade dos participantes. Haverá divulgação dos resultados da pesquisa.

**Desde já, agradecemos sua contribuição para o desenvolvimento desta atividade de pesquisa e colocamo-nos à disposição para esclarecimentos adicionais, através dos telefones 3308 5546.**

Eu, \_\_\_\_\_ fui informado dos objetivos especificados de forma clara e detalhado. Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento. Além disto, sei que terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa. Fui informado também que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2010.

Assinatura do Pesquisador Responsável: \_\_\_\_\_

Assinatura do Voluntário: \_\_\_\_\_



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

Convidamos o(a) Sr(a) para participar da Pesquisa "Avaliação dos níveis de S100B em plasma sanguíneo comparando indivíduos obesos e não obesos com e sem Diabetes Mellitus do Tipo 2", sob a responsabilidade do pesquisador Regina Guaragna, a qual pretende identificar se há ligação entre os níveis elevados dessa proteína no plasma sanguíneo, com o estado do diabetes mellitus do tipo 2.

Sua participação é voluntária e se dará por meio de coleta de 3mL de sangue, realizada por uma enfermeira.

Se você aceitar participar, estará contribuindo para o esclarecimento da função da proteína S100B no Diabetes Mellitus do Tipo 2

Se depois de consentir em sua participação o Sr (a) desistir de continuar participando, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem nenhum prejuízo a sua pessoa. O(a) Sr(a) não terá nenhuma despesa e também não receberá nenhuma remuneração. Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada, sendo guardada em sigilo. Para qualquer outra informação, o (a) Sr (a) poderá entrar em contato com o pesquisador no endereço Ramiro Barcelos, 2600, prédio em anexo, Departamento de Bioquímica - UFRGS, pelo telefone (51) (33085545).

Consentimento Pós-Informação

Eu, \_\_\_\_\_, fui informado sobre o que o pesquisador quer fazer e porque precisa da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair quando quiser. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

S100B nº \_\_\_\_\_

## IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE

NOME: \_\_\_\_\_

IDADE: \_\_\_\_\_ PESO: \_\_\_\_\_

GLICEMIA: \_\_\_\_\_

MEDICAMENTOS CONTÍNUOS:

---

---

MEDICAMENTOS NOS ÚLTIMOS 7 DIAS:

---

---