

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO  
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA**



**UNIFESP – EPM**

**PROGRAMA DE GRADUAÇÃO EM CIRURGIA E  
EXPERIMENTAÇÃO**

**Orientador: Prof. Dr. João Luiz Moreira Coutinho Azevedo**

**Local de trabalho: Departamento de Cirurgia, Disciplina de  
Cirurgia Experimental**

**Pesquisador: Rodrigo Yuzo Masuda**

**Efeitos da transposição ileal sobre o pâncreas endócrino de  
ratos normais.**

**SÃO PAULO**

**2010**

## **Introdução**

A obesidade apresenta-se nos dias de hoje como uma verdadeira epidemia global, tendo em vista a sua crescente incidência e prevalência, com importantes repercussões biopsicossociais nos seus portadores e grande impacto financeiro na economia mundial. Sendo esta doença a principal responsável pela instalação da Síndrome Metabólica (SM), a qual é definida como a presença de resistência insulínica (RI), hipertensão arterial sistêmica (HAS), dislipidemia, diabetes mellitus do tipo 2 e outras comorbidades associadas<sup>1-8</sup>.

Além disso, a crescente epidemia em curso é um desafio para os sistemas públicos de saúde de todo o mundo, uma vez que o custo dos tratamentos convencionais, representados principalmente pelas opções farmacológicas e medidas higienodietéticas visando a mudança de hábitos de vida, oneram os já escassos recursos orçamentários das nações em desenvolvimento. E na medida em que incapacita as populações economicamente ativas, a obesidade contribui de forma negativa para o desenvolvimento desses países e, conseqüentemente, reduz a qualidade de vida das pessoas.

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde, em 2005, havia cerca de 400 milhões de pessoas obesas no mundo e 1,6 bilhões com sobrepeso. No Brasil, segundo a Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF 2002-2003) do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), estima-se que cerca de 50% da população esteja com peso acima do ideal<sup>9,10</sup>.

A resistência insulínica e o diabetes mellitus são condições que estão relacionadas mais comumente à obesidade, entretanto a pandemia do diabetes mellitus do tipo 2 atinge não somente a população obesa, mas também as pessoas com Índice de Massa Corpórea (IMC) menor. Há uma prevalência e uma incidência cada vez maior de diabetes mellitus do tipo 2 em indivíduos com IMC na faixa de sobrepeso e eutrofia<sup>11</sup>. Na obesidade, a gênese da resistência insulínica pode ocorrer por diversos fatores, que são específicos para cada tipo tecidual, associada a fatores genéticos e ambientais, e incluem alterações nos receptores da insulina ou nas vias de sinalização da insulina; aumento da produção de citocinas produzidas pelo tecido adiposo; e alterações

nos enterohormônios do trato gastrointestinal, relacionados à dicotomia fome-saciedade e ao metabolismo dos carboidratos<sup>12-14</sup>.

A identificação de hormônios liberados por células do tubo digestório tem assumido um papel relevante na compreensão da relação entre tais hormônios e o metabolismo dos carboidratos. Nas últimas décadas, evidenciou-se a existência de um complexo sistema êntero-endócrino envolvido no mecanismo de controle da fome/saciedade, motilidade gastrintestinal, sensibilidade periférica à insulina, metabolismo glicídico e lipídico. Já foram identificadas diversas células êntero-endócrinas, dentre elas as células L, com distribuição variável ao longo do tubo digestório<sup>15-19</sup>.

A produção do hormônio similar ao glucagon tipo 1 (*Glucagon like peptide type 1 – GLP-1*) é realizada nas células L, encontradas sobretudo no íleo e no cólon proximal, sendo parte do sistema êntero-endócrino e produzindo diversos hormônios a partir da clivagem de uma macromolécula, o pró-glucagon. Destaca-se, entre eles, o polipeptídeo GLP-1<sup>20-22</sup>.

Além das ações descritas pelo GLP-1, observou-se também que este hormônio apresenta efeito sacietógeno por ação direta no hipotálamo, diminuição da absorção de gorduras pelo trato gastrointestinal<sup>23</sup> e inibição da motilidade intestinal<sup>24</sup>. No entanto, as suas principais ações são a estimulação da síntese de insulina pelas células beta das ilhotas pancreáticas, redução da resistência insulínica periférica e o consequente efeito no metabolismo glicídico. Desta forma, foi demonstrado seu potente efeito na estimulação à produção de insulina, o que infere na possibilidade de tratamento do diabetes mellitus do tipo 2<sup>25-30</sup>.

Em relação ao pâncreas endócrino, sob o aspecto estrutural, recentes estudos têm mostrado que o GLP-1 aumenta a proliferação das células beta e inibe a apoptose destas, estimulando o crescimento das ilhotas pancreáticas. Além disso, em nível molecular, foi verificado que o GLP-1 atua na diferenciação das células primitivas do pâncreas em células beta (neogênese)<sup>31,32</sup>.

O tratamento do diabetes mellitus do tipo 2 e da resistência insulínica inclui uma ampla variedade de opções, como o tratamento clínico multidisciplinar com o objetivo de perda ponderal, opções farmacológicas e técnicas operatórias bariátricas e metabólicas.

A manutenção do controle glicêmico nos pacientes diabéticos é um desafio. As dietas que impõem grande restrição calórica e os programas clínicos multidisciplinares para perda ponderal raramente têm demonstrado benefícios a médio e longo prazo. Soma-se a isto as limitações e os efeitos colaterais dos fármacos antidiabéticos e a limitação a longo prazo da eficácia da insulinoterapia no diabetes mellitus do tipo 2<sup>33,34</sup>.

Atualmente, pode-se comprovar que as técnicas cirúrgicas bariátricas e metabólicas são o tratamento mais eficaz e duradouro para a obesidade mórbida<sup>35-41</sup>, ou seja, para indivíduos com IMC maior que 40 ou maior que 35 associado a comorbidades.

Primariamente idealizadas com a finalidade de redução de peso, diversas técnicas operatórias mostraram-se eficazes no tratamento da síndrome metabólica, especialmente do diabetes mellitus tipo 2. Inicialmente, atribuía-se a melhora das alterações metabólicas exclusivamente ao emagrecimento. Porém, estudos mostraram que a maioria dos pacientes obesos e diabéticos submetidos ao tratamento cirúrgico apresentaram melhora do diabetes mellitus muito antes de uma perda ponderal significativa<sup>42-47</sup>. A hipótese para tal fato é de que as alterações da configuração anatômica do trato digestório, determinados pela intervenção cirúrgica, ocasionam a liberação de hormônios incretínicos, ou seja, atuam na produção de hormônios êntero-endócrinos, na sensibilidade das células à insulina e, conseqüentemente, no metabolismo dos carboidratos. Há comprovação de que a produção dessas substâncias, principalmente o *GLP-1*, ocorre por estímulo gerado por ação dos nutrientes sobre o intestino.

A intervenção cirúrgica mais realizada, no Brasil e no Mundo, é a gastroplastia vertical associada a *bypass* gástrico em Y de Roux<sup>48</sup>, que, quando associada à colocação de prótese contensora ao redor do neoreservatório gástrico, é denominada operação de Fobi-Capella<sup>49,50</sup>. Há estudos demonstrando que, após a realização de um *bypass* gástrico em Y-de-Roux, ocorre uma maior liberação de *GLP-1* e um maior controle glicêmico, sem a ocorrência de uma perda significativa de peso. Isto demonstra que o controle no diabetes pode estar relacionado a efeitos hormonais resultantes da técnica operatória<sup>51,52</sup>. Apesar de proporcionarem maiores perdas ponderais e que se sustentam por períodos mais prolongados, as técnicas mistas, como

Fobi-Capella, apresentam desvantagens, notadas principalmente a longo prazo, como a síndrome de *dumping*, úlceras pépticas, fístulas gastrogástricas e enterotéricas, estenose de anastomoses, ocorrência de diarreia, hipoproteinemia e hipocalcemia e dificuldade do acesso endoscópico das áreas excluídas do tubo digestório<sup>53-58</sup>.

Alguns procedimentos operatórios bariátricos abreviam o percurso até o íleo terminal, o que permite que os alimentos não totalmente digeridos alcancem as porções distais do intestino delgado. Isso estimula a liberação precoce do GLP-1 por parte das células êntero-endócrinas do tipo L, existentes em grande densidade no íleo distal. É o que ocorre quando transportamos cirurgicamente segmento do íleo terminal e o interpomos no jejuno proximal. Dessa forma, alimentos recém-ingeridos podem estimular as células L do íleo interposto, induzindo-as a produzir aceleradamente GLP-1.

Outro efeito desse aumento das taxas sanguíneas de GLP-1 é a diminuição da motilidade do tubo digestório, razão pela qual essa intervenção é denominada de “freio ileal”. Em estudo com animais de experimentação<sup>59</sup>, foi demonstrado a ocorrência de perda ponderal e menor ingestão alimentar, sem alteração na absorção de nutrientes. Foi atribuída assim uma perda de peso por uma possível interferência de hormônios anorexígenos como o GLP-1.

A compreensão dos mecanismos de ação dos enterohormônios, as células onde são produzidos, o local e a forma como atuam é alvo de numerosos estudos, para o desenvolvimento de terapêuticas mais simples e efetivas para as doenças metabólicas, principalmente o diabetes mellitus do tipo 2. Em populações humanas, recentemente foram publicados resultados variados de uma combinação de técnicas menos complexas, que associa a gastrectomia vertical a interposição ileal<sup>60-63</sup>. Assim sendo, esta técnica pode produzir saciedade precoce, benefícios no metabolismo glicídico e na perda ponderal, em curto e médio prazos<sup>64</sup>. Apesar de ser uma modalidade mais simples, estudos realizados em seres humanos, com a realização de gastrectomia vertical isolada, demonstraram a existência de limitações e complicações<sup>65-67</sup>.

Uma modalidade operatória só envolvendo a transposição ileal não foi realizada em humanos. Demonstrou-se, em estudos experimentais, que a interposição de um segmento de íleo distal no jejuno proximal acarretava maior

liberação e síntese de GLP-1. Isto foi atribuído, em hipótese, a um maior estímulo nas células L do segmento do íleo interposto, provocado por uma quantidade maior de nutrientes parcialmente digeridos, resultando na maior produção de insulina, com efeitos no metabolismo glicídico<sup>68-71</sup>. A expressão “freio ileal” passou a ser utilizada, sendo uma reação de redução da motilidade do trânsito gastrointestinal proximal relacionada à produção de enterohormônios<sup>72-75</sup>.

Há estudos mostrando os efeitos destas técnicas operatórias na estrutura do pâncreas, em especial em populações com pequenas alterações de peso<sup>76,77</sup>. Observou-se também que em ratos euglicêmicos, a interposição ileal melhorou a tolerância a glicose, sem que no entanto, a avaliação morfológica do pâncreas destes animais fosse realizada<sup>78</sup>.

## Objetivos

Geral: Avaliar os efeitos sobre o pâncreas endócrino de uma técnica operatória destinada a interferir na função êntero-endócrina do hospedeiro.

Específico: Verificar as modificações histológicas e morfológicas ocorridas nas ilhotas pancreáticas após interposição ileal.

## Justificativa

Adota-se o conceito de Cirurgia Metabólica ou Cirurgia Baroendócrina e busca-se através destas técnicas, o estímulo ou a inibição de determinados hormônios sem a necessidade de ressecções ou desvio de extensos segmentos, evitando-se assim a incidência de complicações. Testes clínicos preliminares têm apresentado resultados variados nas respostas obtidas, havendo propostas de realizá-los em indivíduos sem obesidade mórbida.

Esse estudo está inserido na Linha de Pesquisa de Cirurgia Bariátrica e Metabólica do Programa de Pós-graduação em Cirurgia e Experimentação como parte integrante de uma Pesquisa para Doutorado direcionada para o estudo de diversos aspectos da transposição ileal.

## **Métodos**

### Comitê de Ética em Pesquisa

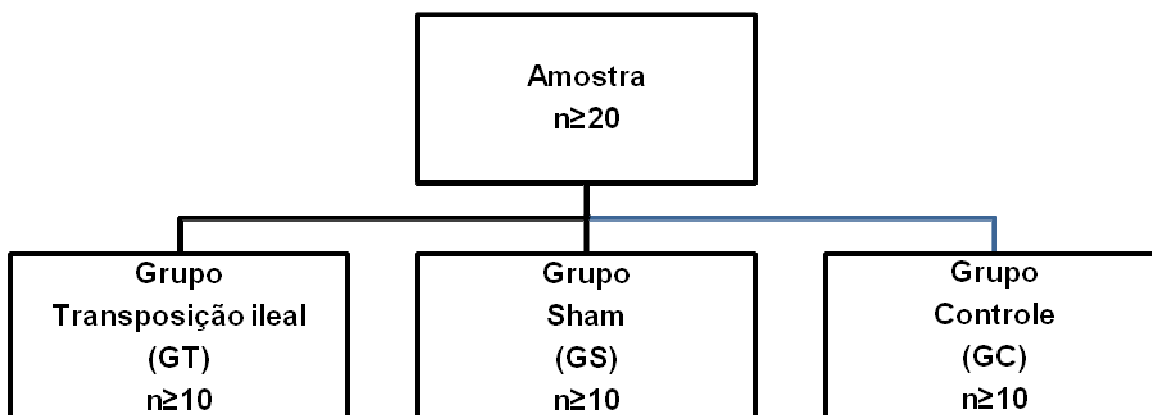
O Projeto de Pesquisa para Pós-graduação, no qual o presente projeto está inserido, foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa Experimental da Escola Paulista de Medicina (EPM) da Universidade Federal de São Paulo, em 02 de dezembro de 2010, cujo número de Protocolo foi 1864/10.

### Caracterização da amostra

Serão utilizados, pelo menos, 30 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*), Wistar-EPM1, recém-desmamados (21 dias de idade), com peso corporal variando entre 400 – 450 gramas, fornecidos pelo Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia (CEDEME) - Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina (UNIFESP-EPM).

Os animais serão transferidos para o Biotério Setorial da Biofísica, onde serão alojados em gaiolas individuais e mantidos por 30 dias, com temperatura ambiente controlada de 23 e 25 graus centígrados, umidade relativa do ar de 55% (+- 15%) e com dispositivo automático (Timer – Kienzle) proporcionando ciclo de alternância de luminosidade entre claro e escuro de 12 por 12 horas (6h/18 h).

Os animais serão distribuídos em 3 grupos, mediante sorteio: Grupo Transposição (GT) – submetido à transposição ileal, com pelo menos 10 animais, e Grupo Sham (GS) – submetido à operação simulada, com pelo menos 10 animais, conforme organograma abaixo, e Grupo Controle – não submetido a nenhum tipo de procedimento, com pelo menos 10 animais.



## Procedimentos experimentais

### Dieta

Os animais receberão, ad libitum, uma dieta normocalórica (4,5 Kcal/g) normolipídica, com 10% de gorduras, 20% de proteínas e 70% de carboidratos. Trata-se da dieta padrão, Nuvilab CR-1, da marca Nuvital Nutrientes SA.

### Anestesia

Será realizada anestesia geral dissociativa, para as intervenções cirúrgicas e para as coletas de sangue, utilizando Zoletil 50 (tiletamina+zolazepan) na dose de 20 mg/kg e Fentanil na dose de 0,025 mg/kg, coletados na mesma seringa e injetados simultaneamente por via intramuscular. O animal será mantido em ventilação espontânea durante os procedimentos, e o plano anestésico será controlado mediante avaliação periódica (a cada 45 minutos) dos reflexos auricular e interdigital, que devem estar abolidos. Sempre que houver o reaparecimento desses reflexos, será realizada complementação anestésica com 1/3 da dose inicial. Ao término do procedimento, será anotada a quantidade total de anestésicos utilizados.



## Procedimentos operatórios

Nos dias determinados, dois ratos serão separados e aleatoriamente distribuídos no GT e no GS, mediante o sorteio de envelopes pré-marcados. A esses animais será ofertada apenas água nas 6 horas que precederem os procedimentos operatórios.

Os animais anestesiados terão os pêlos da região abdominal cortados com tesoura rente à pele, e serão posicionados em decúbito dorsal horizontal na mesa cirúrgica, com as patas e cauda atadas com esparadrapo. A antissepsia da região abdominal será feita com clorohexidine em veículo aquoso.

Será colocado campo cirúrgico esterilizado fenestrado na região abdominal do animal, e será realizada uma incisão longitudinal mediana da parede, com aproximadamente 5cm de extensão, utilizando-se bisturi descartável de lâmina número quinze.

Inicialmente, o ceco será identificado e exposto, juntamente com o íleo terminal. Em seguida, em ambos os grupos, o intestino delgado será seccionado perpendicularmente a 5cm da transição íleo-cecal, ressecando-se um segmento ileal (com 1 cm) para estudo histológico.

No GT, o íleo será novamente seccionado perpendicularmente na região distante 15 cm da transição íleo-cecal, separando-se, dessa forma, um segmento de 10 cm, que será envolto em gaze umedecida com solução de cloreto de sódio a 0,9%, aquecida (Figura 1A). Em seguida, será realizada a anastomose dos segmentos do íleo remanescente, de forma a ser restabelecida a continuidade do tubo digestório. Após, será seccionado o jejuno numa região distante 5 cm da transição duodeno-jejunal (Figura 1A). O segmento do íleo distal anteriormente separado será interposto aos segmentos do jejuno seccionado, em posição isoperistáltica (Figura 1B).

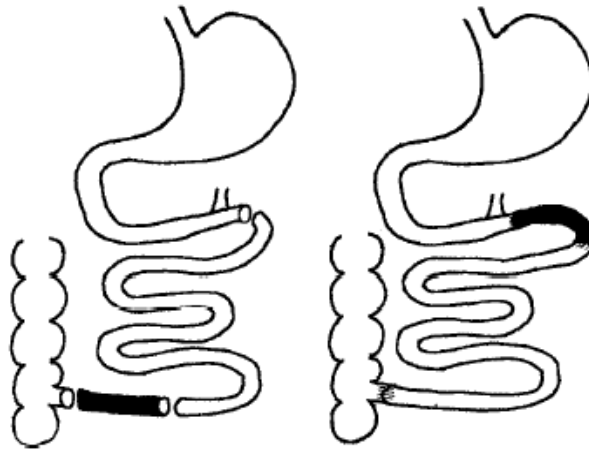


Figura 1A

Figura 1B

Figura 1A – Esquema demonstrativo das regiões de secção intestinal e do segmento ileal isolado (preenchido em preto) a ser transposto

Figura 1B – Esquema demonstrativo do íleo distal já anastomosado e do segmento ileal transposto (preenchido em preto) anastomosado nos segmentos proximais do jejunum

No GS, o intestino será seccionado perpendicularmente nas regiões distantes 5 cm e 15 cm da transição íleo-cecal e 5 cm da transição duodenojejunal, com anastomose em seguida, sem transposição. Também será retirado um segmento de 1 cm do íleo distal para estudo histológico.

Todas as anastomoses intestinais serão término-terminais em plano único de sutura e realizadas com 6 a 8 pontos totais separados, utilizando-se fios de polipropileno 7-0 pré-montados em agulha cilíndrica.

O fechamento da parede abdominal será realizado com sutura contínua em monobloco do peritônio parietal, da camada muscular e da aponeurose utilizando-se fio de poliglactina 4-0 pré-montado em agulha cilíndrica. Na pele será feita sutura contínua, utilizando-se fio de poliglactina 4-0 pré-montado em agulha cilíndrica, com pontos invertidos.

### Evolução pós-operatória

Os animais serão mantidos em observação até a recuperação completa da anestesia, quando então serão colocados em gaiolas individuais e encaminhados para a sala de albergue, no Biotério da Biofísica, sob as mesmas condições ambientais pré-operatórias, com temperatura ambiente controlada de 23 graus centígrados (+-2), e umidade relativa do ar de 55% (+-

15%), e com ciclo de alternância de luminosidade entre claro e escuro de 12 por 12 horas (6h/18 h).

Será reintroduzida a dieta e água, *ad libitum*, tão logo haja recuperação anestésica.

Nas primeiras 24 horas de PO, receberão analgesia com cloridrato de tramadol na dose de 1 mg/Kg, administrados por via oral, a cada 12 horas.

Os animais serão acompanhados e avaliados até 60<sup>o</sup> dia PO. A avaliação nessa época visa estudar os efeitos da operação em longo prazo, uma vez que se estima uma correlação com a espécie humana de 3 anos.

### Eutanásia

A eutanásia, realizada em todos os grupos, ocorrerá no 60<sup>o</sup> dia PO, pela técnica de decapitação, conforme orientação do COBEA.

### Histologia

#### Preparo do Pâncreas para Estudo Histológico

Serão realizados cortes sequenciais em toda a extensão do pâncreas, que foi coletado no momento da eutanásia.

Os cortes histológicos destinados para avaliação com microscopia óptica serão fixados em formaldeído tamponado a 10% com fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico e NaCl em um volume de vinte vezes o volume do tecido por 12 a 24 horas. Em seguida, são feitos cinco banhos de uma hora cada em álcool etílico 100% para desidratação. Posteriormente são feitos dois banhos de uma hora cada em xilol para diafanização do tecido.

Os cortes histológicos são então processados para inclusão em parafina líquida a 58°C em dois banhos de uma hora cada. Os cortes histológicos vão para a central de inclusão para fazer o bloco. Na central de inclusão os cassetes são abertos e o material é colocado em uma forma de metal para formar o bloco histológico.

É adicionado, então, mais parafina, gelo e as lâminas vão para o corte histológico em micrótomo rotativo com micras de 3 µm de espessura e colocados em lâminas silanizadas para imuno-histoquímica

### Imunohistoquímica

Serão utilizados anticorpos específicos para estudo imuno-histoquímico: Anticorpo Policlonal H-86:SC-9168 da marcação de células produtoras de insulina, do tipo policlonal de coelho, de código H-86: SC-9168, da empresa Santa Cruz Bioterchnology

As lâminas com os cortes seguirão protocolo para estudo imuno-histoquímico com dupla marcação antigênica, utilizando o KIT: EnVision G|2 Doublestain System, Rb/Mo (DAB+/Permanent Red), Código: K5361-1, Marca: Dako. A visualização baseia-se na peroxidase (HRP) utilizando como cromógeno o DAB+ e Fosfatase Alcalina (AP) utilizando como cromógeno o *Permanent Red*.

As lâminas com os cortes seguirão o seguinte protocolo:

a) desparafinação: as lâminas serão deixadas em estufa a 60°C por 12 horas, para melhor adesão do tecido, e em seguida serão desparafinadas com 3 banhos em xilol por 5 minutos cada em temperatura ambiente;

b) hidratação: as lâminas serão submersas duas vezes em etanol absoluto por 5 minutos e lavadas com água corrente por 2 minutos para hidratação dos cortes;

c) recuperação antigênica: as lâminas serão colocadas em solução de citrato de sódio 10 mM pH 6,0 por 30 minutos em panela de vapor (95°C), deixando-se depois esfriar a temperatura ambiente por 20 minutos e lavadas em PBS (Tampão Salina Fosfato) 0,05 M, pH 7,4 quatro vezes por 3 minutos cada;

d) bloqueio da peroxidase endógena: as lâminas serão incubadas com peróxido de hidrogênio 3%, quatro vezes por 5 minutos cada e, em seguida, lavadas com água corrente e tampão PBS pH 7,4 três vezes por 3 minutos cada;

e) bloqueio de sítios inespecíficos: as lâminas serão incubadas em PBS pH 7,4 + BSA (Soro Albumina Bovina) 1% por 30 minutos em temperatura ambiente;

f) ligação com o primeiro anticorpo primário: os cortes histológicos de cada lâmina serão incubados com anticorpo primário, diluídos em PBS + BSA 1%, em titulação pré-estabelecida pelo fornecedor, e deixadas em câmara úmida a 4°C de 16 a 18 horas e, na seqüência, serão lavadas em PBS pH 7,4 por 3 vezes;

g) ligação do anticorpo secundário: os cortes serão incubados com o anticorpo secundário, conjugado com biotina do Kit Dako EnVision por 30 minutos a temperatura ambiente em câmara úmida. Após a incubação, as lâminas serão lavadas em PBS pH 7,4 por 3 vezes e novamente incubadas com a solução de amplificação (estreptavidina conjugada com peroxidase) do Kit Dako por 30 minutos e, em seguida, serão lavadas com tampão PBS, pH 7,4 por três vezes;

h) revelação: os cortes serão cobertos com solução de cromógeno 3,3'diaminobenzidina (DAB líquido) por 15 minutos e, seguida, lavados em água destilada;

i) desidratação e montagem: as lâminas serão lavadas em água corrente por 10 minutos, submersas em etanol absoluto 4 vezes e, a seguir, em xilol por 3 vezes e levadas para montagem com lamínula e em meio de montagem Ettelan ® e identificadas.

Será adotado como padrão de positividade o aparecimento de colorações marrom acastanhada, para o anticorpo, corado com o cromógeno DAB+. A imunoexpressão será avaliada, utilizando-se representação de imagem por meio de um sistema computadorizado, constituído por microscópio de luz (Carl Zeiss), adaptado a uma câmera de alta resolução (Axio Cam MRC da Carl Zeiss), monitor de vídeo colorido (Samsung). As imagens serão obtidas utilizando-se o programa de análise de imagens AxionVision REL 4.2 da Carl Zeiss.

As medidas que serão utilizadas para avaliação serão: (i) medida de tecido pancreático, em que serão captados e medidos todos os campos, no aumento microscópico de 400 vezes (microscópio Olympus) obtidos de dois diâmetros diferentes do corte histológico avaliado ;(ii) a medida das ilhotas de

langerhans será realizada em todos os campos dos cortes avaliados no item (i) que contenham ilhotas; (iii) a contagem de células marcadas e não marcadas será efetuada nas ilhotas obtidas do item (ii). Será utilizado o software Photoshop para ajustar a qualidade das imagens e o software Image J para a efetuação das medidas e contagens referidas.

### **Parâmetros de estudo**

Avaliação histológica pela imunohistoquímica (em todos os grupos, na ocasião da eutanásia):

- a) Área total de pâncreas, por soma da área obtida de todos os campos analisados por lâmina (de dois diferentes diâmetros do corte histológico);
- b) Área total ocupada por ilhotas de Langerhans, obtida pela soma das áreas de todas as ilhotas analisadas do item anterior;
- c) Relação entre a área total medida do pâncreas e a área ocupada por ilhotas;
- d) Contagem de células produtoras de insulina, nas ilhotas de Langerhans;
- e) Contagem de células não produtoras de insulina, nas ilhotas de Langerhans;
- f) Valor relativo de células produtoras e não produtoras de insulina, por ilhota de Langerhans e por tecido total de pâncreas analisado.

### **Análise estatística**

As variáveis serão resumidas por grupo de estudo pelas estatísticas descritivas pertinentes: frequência absoluta (n) e relativa (%) ou média, desvio padrão (d.p.), mediana e valores mínimo e máximo. Os dados serão analisados por testes paramétricos ou não paramétricos dependendo da distribuição encontrada.

Na presença de distribuição normal dos dados, será aplicada a técnica de análise de variância com dois fatores fixos: grupos (com 3 níveis: GC, GS e TI) e avaliação (com 2 níveis: D0 e D60). Caso contrário será aplicado o Teste de Mann-Whitney para comparar as técnicas dentro de cada avaliação e o Teste de Friedman para amostras relacionadas para comparar as avaliações dentro de cada técnica. A presença de associação entre variáveis qualitativas será avaliada pelo teste do qui-quadrado ou teste exato de Fisher. O nível de significância a ser adotado será de 0,05 (5%) e níveis descritivos (p) inferiores a esse valor serão considerados significantes.

### Cronograma

Tempo	11/10-12/10	01/11-02/11	03/11-05/11	06/11	07/11-09/11
Pesquisa Bibliográfica	XXXXXX				
Elaboração de Projeto	XXXXXX				
Pré-Teste (Piloto)		XXXXXX			
Coleta de dados			XXXXXX		
Tabulação de dados				XXXXXX	
Análise dos dados					XXXXXX
Relatório de Pesquisa					XXXXXX
Conclusão da Pesquisa					XXXXXX

## Resultados esperados

Espera-se observar um consumo menor de dieta e menor ganho ponderal pelo grupo submetido à transposição ileal. Além disso, com a análise histológica tardia, após oito semanas do procedimento operatório, esperamos observar sinais histológicos de hiperatividade das células beta e hipoatividade das células alfa, além do aumento do número de células beta na ilhotas. Assim, o estudo tem o objetivo de avaliar a eficácia, em longo prazo, desta técnica operatória por meio do efeito incretínico do GLP-1 atuando no pâncreas endócrino.

## Orçamento

### **ORÇAMENTO (totalizado)**

Material Permanente a ser adquirido no Brasil	R\$	893,25
Material de consumo a ser adquirido no Brasil	R\$	2.317,00
Serviços de terceiros a serem contratados no Brasil	R\$	750,00
Despesas com aquisição e manutenção de animais de experimentação	R\$	950,00
Anatomia Patológica	R\$	18.325,00
Custos Diversos	R\$	600,00
<b>Total</b>		<b>R\$ 23.825,35</b>



## 1)- ORÇAMENTO (detalhamento)

Material	Preço Uni	Quantidade	Preço Total	Empresa
<b>Material Permanente a ser adquirido no Brasil</b>				
Kit microcirurgia (Bandeja inox (1), clamp simples(2),Pinça dente delicada (2), pinça Kelly delicada e pequena (2), Pinça micro reta (1), porta agulha com trava (1), porta agulha micro com trava (1), tesoura delicada (2), tesoura micro (1),	R\$ 782,25	1	R\$ 782,25	Medtec
Bandeja inox para lavagem e desinfecção de materiais	R\$ 31,00	2	R\$ 62,00	Medtec
Cuba Rim inox	R\$ 24,50	2	R\$ 49,00	Medtec
<b>Subtotal</b>			<b>R\$ 893,25</b>	
<b>Material de consumo a ser adquirido no Brasil</b>				
Kit bandeja para cirurgia (agulha 30 x 7 (2), bisturi descartável (1), campo estéril descartável (2), campo fenestrado descartável (1), pacote de gaze estéril (4), luva estéril par (2), seringa descartável de 5 ml (2)	R\$ 15,05	20	R\$ 301,00	Medtec
Kit anestesia e antibiótico profilaxia (água estéril 10 ml (2), zoletil 50 (1/10), fentanil (1/10),ceftriaxone 250 mg (1/4), seringa 1 ml (2), agulha 30x7 (1)	R\$ 17,20	20	R\$ 344,00	Medtec
Kit limpeza e assepsia (água estéril 200 ml (1), clorhexedine (1/2), detergente (1/4), luvas de procedimento não estéril (4), povidine tópico (1/4), solução fisiológica a 0,9% 250 ml (1)	R\$ 12,70	20	R\$ 254,00	Medtec
Fios (mononylon 4-0, prolene 6-0	R\$ 68,65	20	R\$ 1.373,00	Johnson & Johnson
Solução fisiológica a 0,9%-ampola	R\$ 0,45	100	R\$ 45,00	Medtec

de 10 ml				
<b>Subtotal</b>			<b>R\$ 2.317,00</b>	
<b>Serviços de terceiros a serem contratados no Brasil</b>				
Técnico especializado no cuidado de animais (preço por animal/mês)	R\$ 25,00	30 ratos	R\$ 750,00	Particular
<b>Subtotal</b>			<b>R\$ 750,00</b>	
<b>Despesas com aquisição e manutenção de animais de experimentação</b>				
Rato Wistar EPM1	R\$ 5,00	30 ratos	R\$ 150,00	CEDEME Unifesp
Albergue para ratos (sala/mês)	R\$ 800,00	6 meses	R\$ 800,00	CEDEME Unifesp
<b>Subtotal</b>			<b>R\$ 950,00</b>	
<b>Anatomia patológica</b>				
Lâmina processada	R\$ 30,00	12 lâminas p/ animal (20 animais)	R\$ 7.200,00	Patologia Unifesp
Material para imunohistoquímica	R\$ 10.900,00	1 kit	R\$ 10.900,00	Dako
Formol	R\$ 2,25	100 frascos de 30 ml	R\$ 225,00	Patologia Unifesp
<b>Subtotal</b>			<b>R\$ 18.325,00</b>	
<b>Custos diversos</b>				
Análise estatística	R\$ 600,00	1	R\$ 600,00	PGMedical statistics
<b>Subtotal</b>			<b>R\$ 2.850,00</b>	
<b>Total</b>			<b>R\$ 23.835,25</b>	

## Financiamento

Este Projeto está incluído em Projeto de Pesquisa de Pós- graduação em andamento, com recursos próprios dos Pesquisadores, bem como recursos

e insumos existentes nos laboratórios da UNIFESP (Disciplinas de Técnica Operatória, Biologia e Histologia).

### Sumário das Atividades a serem desenvolvidas

Este Projeto está voltado para a realização de todas as etapas do estudo histológico, utilizando microscopia óptica para estudo em HE e imunohistoquímica para a avaliação do pâncreas endócrino, após a interposição de um segmento ileal ao jejuno proximal.

### Referências

1. Wang Y, Beydoun MA. The obesity epidemic in the United States - gender, age, socioeconomic, racial/ethnic, and geographic characteristics: a systematic review and meta-regression analysis. *Epidemiol Rev.*2007;29:6-28.
2. Taubes G. As obesity rates rise, experts struggle to explain why. *Science.*1998;280(5368):1367-8.
3. Hossain P, Kowar B, Nahas ME. Obesity and diabetes in the developing world - a growing challenge. *N Engl J Med.* 2007;356:213-5. Erratum in: *N Engl J Med.*2007;356:973.
4. Yach D, Stuckler D, Browne KD. Epidemiologic and economic consequences of the global epidemics of obesity and diabetes. *Nat Med.* 2006;12:62-6. Erratum in: *Nat Med.*2006;12:367.
5. Ogden CL, Flegal KM, Carroll MD, Johnson CL. Prevalence and trends in overweight among US children and adolescents, 1999-2000. *JAMA.* 2002;288:1728-32.
6. Ogden CL, Carroll MD, Curtin LR, McDowell MA, Tabak CJ, Flegal KM. Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1999-2004. *JAMA.*2006;295:1549-55.
7. Andrew D. Calvin, M.D., M.P.H., Felipe N. Albuquerque, M.D., Francisco Lopez-Jimenez, M.D., M.Sc., and Virend K. Somers, M.D., Ph.D. Obstructive Sleep Apnea, Inflammation, and the Metabolic Syndrome. *Metabolic Syndrome and Related Disorders;* 2009; 7:1-8.

8. Stephan Martin, M.D., Hubert Kolb, Ph.D., Berthold Schneider, Ph.D., Lutz Heinemann, Ph.D., Christian Weber, M.D., Serge Kocher, Ph.D., Jacques K.T. Tshiananga, M.P.H., Werner A. Scherbaum, M.D., and Volker Lodwig, Ph.D. Myocardial Infarction and Stroke in Early Years After Diagnosis of Type 2 Diabetes: Risk Factors and Relation to Self-Monitoring of Blood Glucose. *Diabetes Technology & Therapeutics*; 2009; 11:234-41.
9. Disponível em URL:  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/index.html>. Acessado em 13 de maio de 2009.
10. Disponível em URL:  
<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaoodevida/pof/2002analise/defaulttab.shtm>. Acessado em 13 de maio de 2009.
11. Arner P, Pollare T, Lithell H. Different aetiologies of type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in obese and nonobese subjects. *Diabetologia* 1991;34:483–87.
12. Pessin JE, Saltiel AR. Signaling pathways in insulin action: Molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest* 2000;106:165-9.
13. Carvalho MHC, Colaço AL, Fortes ZB. Cytokines, Endothelial Dysfunction, and Insulin Resistance. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2006;50:304-12.
14. Drucker DJ. The role of gut hormones in glucose homeostasis. *J Clin Invest*. 2007;117(1):24–32.
15. Laferrere B, Teixeira J, McGinty J. Effect of weight loss by gastric bypass surgery versus hypocaloric diet on glucose and incretin levels in patients with type 2 diabetes. *Clin Endocrinol Metab* 2008;93:2479–85.
16. Baltasar A, Serra C, Pérez N, Bou R, Bengochea M, Ferri L. Laparoscopic sleeve gastrectomy: a multi-purpose bariatric operation. *Obes Surg*. 2005;15:1124-8.
17. Gagner M, Rogula T. Laparoscopic reoperative sleeve gastrectomy for poor weight loss after biliopancreatic diversion with duodenal switch. *Obes Surg*. 2003;13:649-54.
18. Vage V, Solhaug JH, Berstad A, Svanes K, Viste A. Jejunoileal bypass in the treatment of morbid obesity: a 25-year follow-up study of 36 patients. *Obes Surg*. 2002;12:312-8.

19. Cohen R, Uzzan B. Ghrelin Levels and sleeve gastrectomy in super-super-obesity. *Obes Surg.* 2005;15:1501-2.
20. Cottam D, Qureshi FG, Mattar SG, Sharma S, Holover S, Bonanomi G, Ramanathan R, Schauer P. Laparoscopic sleeve gastrectomy as an initial weight-loss procedure for high-risk patient with morbid obesity. *Surg Endosc.* 2006;20:859-63.
21. Farrell TM, Haggerty SP, Overby DW, Kohn GP, Richardson WS, Fanelli RD. Clinical application of laparoscopic bariatric surgery: an evidence-based review. *Surg Endosc.* 2009;23:930-49.
22. DePaula AL, Macedo ALV, Mota BR, Schraibman V. Laparoscopic ileal interposition associated to a diverted sleeve gastrectomy is an effective operation for the treatment of type 2 diabetes mellitus patients with BMI 21-29. *Surg Endosc* DOI 10.1007/s00464-008-0156-x.
23. DePaula AL, Macedo ALV, Rassi N, Vencio S, Machado CA, Mota BR, Silva LQ, Halpern A, Schraibman V. Laparoscopic treatment of metabolic syndrome in patients with type 2 diabetes mellitus. *Surg Endosc* DOI 10.1007/s00464-008-9808-0.
24. DePaula AL, Macedo ALV, Rassi N, Machado CA, Schraibman V, Silva LQ, Halpern A, Laparoscopic treatment of type 2 diabetes mellitus for patients with a body mass index less than 35. *Surg Endosc* 2008;22:706-16.
25. Melissas J. IFSO Guidelines for Safety, Quality, and Excellence in Bariatric Surgery. *Obes Surg.* 2008;18:497-500.
26. Buchwald H, Williams SE. *Bariatric Surgery Worldwide 2003.* *Obes Surg.* 2004;14:1157-64.
27. Capella JF, Capella RF, Mandac H, Nath P. Vertical banded gastroplasty-gastric bypass: preliminary report. *Obes Surg.* 1991;1:389-95.
28. Fobi MAL, Lee H, Fleming AW. The surgical technique of the banded Roux-en-Y gastric bypass. *Obes and Weight Regulation* 1989;8:99-102.
29. De Paula AL, Macedo ALV, Prudente AS, Queiroz L, Schraibman V, Pinus J. Laparoscopic sleeve gastrectomy with ileal interposition (“neuroendocrine brake”) - pilot study of a new operation. *Surg Obes Relat Dis.* 2006;2(4):464-7.
30. Langer FB, Bohdjalian A, Felberbauer FX, Fleischmann E, Hoda MAR, Ludvik B, Zacherl J, Jakesz R, Prager G. Does Gastric Dilatation Limit the

Success of Sleeve Gastrectomy as a Sole Operation for Morbid Obesity? *Obes Surg.* 2006;16:166-71.

31. Drucker DJ. Glucagon-like peptide-1 and the islet beta-cell: augmentation of cell proliferation and inhibition of apoptosis. *Endocrinology* 2003;144: 5145-48..
32. Stoffer DA, Kieffer TJ, Hussain MA, Drucker DJ, Bonner-Weir S, Habener JF, Egan JM. Insulinotropic glucagon-like peptide 1 agonists stimulate expression of homeodomain protein IDX-1 and increase islet size in mouse pâncreas. *Diabetes* 1999;48: 2270-76.
33. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet.* 1998;352:837–53.
34. Paisey RB, Frost J, Harvey P, Paisey A, Bower L, Paisey RM, Taylor P, Belka I. Five year results of a prospective very low calorie diet or conventional weight loss programme in type 2 diabetes. *J Hum Nutr Diet.* 2002;15:121–7.
35. Resolução CFM Nº 1.766/05. Diário Oficial da União, 11 de Julho de 2005, Seção I, p.114. Disponível em <http://www.portalmedico.org.br/index.asp?opcao=mostranoticia&id=283&portal=GO>.
36. Sauerland S, Angrisani L, Belachew M, Chevallier JM, Favretti F, Finer N, Fingerhut A, Garcia Caballero M, Guisado Macias JA, Mittermair R, Morino ,Msika S, Rubino F, Tacchino R, Weiner R, Neugebauer EA. Obesity surgery:evidence-based. guidelines of the European Association for Endoscopic Surgery (EAES). *Surg Endosc* 2005;19:200-21.
37. National Institutes of Health of United Sates of America. Clinical guidelines on the identification, evaluation and treatment of overweighth and obesity in adults – The evidence report. *Obes Res.* 1998;6:51S-209S.
38. Willett CW, Dietz WH, Colditz GA. Guidelines for health weight. *N Engl J Med.* 1999;341:427-34.
39. Mun EC, Blackburn GL, Matthews JB. Current status of medical and surgical therapy for obesity. *Gastroenterology.* 2001;120:669-81.
40. Hell E, Miller KA, Moorehead MK, Norman S. Evaluation of health status and quality of life after bariatric surgery: comparison of standard Roux-en-Y gastric

- bypass, vertical banded gastroplasty and laparoscopic adjustable silicone gastric banding. *Obes Surg*. 2000;10:214-9.
41. Sjostrom L, Lindroos AK, Peltonen M, Torgerson J, Bouchard C, Carlsson B, Dahlgren S, Larsson B, Narbro K, Sjostrom CD, Sullivan M, Wedel H. Lifestyle, diabetes, and cardiovascular risk factors 10 years after bariatric surgery. *N Engl J Med*. 2004;26:2683-93.
  42. Kreymann B, Williams G, Ghatei MA, Bloom SR. Glucagon-like peptide-1: a physiological incretin man. *Lancet*. 1987;2(8571):1300-4.
  43. Perfetti R, Zhou J, Doyle ME, Egan JM. Glucagon-like peptide-1 induces cell proliferation and pancreatic-duodenum homeobox-1 expression and increases endocrine cell mass in the pancreas of old, glucose-intolerant rats. *Endocrinology*. 2000;141:4600-5.
  44. Farilla L, Hui H, Bertolotto C, Kang E, Bulotta A, Di Mario U, Perfetti R. Glucagon-like peptide-1 promotes islet cell growth and inhibits apoptosis in Zucker diabetic rats. *Endocrinology*. 2002;143:4397-408.
  45. Farilla L, Bulotta A, Hirshberg B, Calzi SL, Khoury N, Noushmehr H, Bertolotto C, Di Mario U, Harlan DM, Perfetti R. Glucagon-like peptide-1 inhibits cell apoptosis and improves glucose responsiveness of freshly isolated human islets. *Endocrinology*. 2003;144:5149-58.
  46. Drucker DJ. The role of gut hormones in glucose homeostasis. *J Clin Invest*. 2007;117(1):24–32.
  47. Koopmans HS, Sclafani A. Control of body weight by lower gut signals. *Int J Obes*. 1981;5:491-5.
  48. Buchwald H, Williams SE. *Bariatric Surgery Worldwide 2003*. *Obes Surg*. 2004;14:1157-64.
  49. Capella JF, Capella RF, Mandac H, Nath P. Vertical banded gastroplasty-gastric bypass: preliminary report. *Obes Surg*. 1991;1:389-95.
  50. Fobi MAL, Lee H, Fleming AW. The surgical technique of the banded Roux-en-Y gastric bypass. *Obes and Weight Regulation* 1989;8:99-102.
  51. Pournaras DJ, le Roux CW. Obesity, gut hormones, and bariatric surgery. *World J Surg* 2009;33:1983-8.
  52. Laferrere B, Teixeira J, McGinty J. Effect of weight loss by gastric bypass surgery versus hypocaloric diet on glucose and incretin levels in patients with type 2 diabetes. *Clin Endocrinol Metab* 2008;93:2479–85.

53. Baltasar A, Serra C, Pérez N, Bou R, Bengochea M, Ferri L. Laparoscopic sleeve gastrectomy: a multi-purpose bariatric operation. *Obes Surg.* 2005;15:1124-8.
54. Gagner M, Rogula T. Laparoscopic reoperative sleeve gastrectomy for poor weight loss after biliopancreatic diversion with duodenal switch. *Obes Surg.* 2003;13:649-54.
55. Vage V, Solhaug JH, Berstad A, Svanes K, Viste A. Jejunoileal bypass in the treatment of morbid obesity: a 25-year follow-up study of 36 patients. *Obes Surg.* 2002;12:312-8.
56. Cohen R, Uzzan B. Ghrelin Levels and sleeve gastrectomy in super-super-obesity. *Obes Surg.* 2005;15:1501-2.
57. Cottam D, Qureshi FG, Mattar SG, Sharma S, Holover S, Bonanomi G, Ramanathan R, Schauer P. Laparoscopic sleeve gastrectomy as an initial weight-loss procedure for high-risk patient with morbid obesity. *Surg Endosc.* 2006;20:859-63.
58. Farrell TM, Haggerty SP, Overby DW, Kohn GP, Richardson WS, Fanelli RD. Clinical application of laparoscopic bariatric surgery: an evidence-based review. *Surg Endosc.* 2009;23:930-49.
59. Vage V, Solhaug JH, Berstad A, Svanes K, Viste A. Jejunoileal bypass in the treatment of morbid obesity: a 25-year follow-up study of 36 patients. *Obes Surg.* 2002;12:312-8.
60. DePaula AL, Macedo ALV, Mota BR, Schraibman V. Laparoscopic ileal interposition associated to a diverted sleeve gastrectomy is an effective operation for the treatment of type 2 diabetes mellitus patients with BMI 21-29. *Surg Endosc* DOI 10.1007/s00464-008-0156-x.
61. DePaula AL, Macedo ALV, Schraibman V, Mota BR, Vencio S. Hormonal evaluation following laparoscopic treatment of type 2 diabetes mellitus patients with BMI 20-34. *Surg Endosc* DOI 10.1007/s00464-008-0168-6.
62. DePaula AL, Macedo ALV, Rassi N, Vencio S, Machado CA, Mota BR, Silva LQ, Halpern A, Schraibman V. Laparoscopic treatment of metabolic syndrome in patients with type 2 diabetes mellitus. *Surg Endosc* DOI 10.1007/s00464-008-9808-0.



63. DePaula AL, Macedo ALV, Rassi N, Machado CA, Schraibman V, Silva LQ, Halpern A, Laparoscopic treatment of type 2 diabetes mellitus for patients with a body mass index less than 35. *Surg Endosc* 2008;22:706-16.
64. De Paula AL, Macedo ALV, Prudente AS, Queiroz L, Schraibman V, Pinus J. Laparoscopic sleeve gastrectomy with ileal interposition (“neuroendocrine brake”) - pilot study of a new operation. *Surg Obes Relat Dis*. 2006;2(4):464-7.
65. Langer FB, Bohdjalian A, Felberbauer FX, Fleischmann E, Hoda MAR, Ludvik B, Zacherl J, Jakesz R, Prager G. Does Gastric Dilatation Limit the Success of Sleeve Gastrectomy as a Sole Operation for Morbid Obesity? *Obes Surg*. 2006;16:166-71.
66. Pietro F, Antonio F, Vincenzo P, Antonietta R, Angela M, Salvatore T. Rhabdomyolysis after sleeve gastrectomy: Increase in muscle enzymes does not predict fatal outcome. *Obes Surg*. 2007. DOI 10.1007/s11695-007-9356-z.
67. Serra C, Baltasar A, Andreo L, Pérez N, Bou R, Bengochea M, Chisbert JJ. Treatment of gastric leaks with coated self-expanding stents after sleeve gastrectomy. *Obes Surg*. 2007;17:866-72.
68. Strader AD, Vahl TP, Jandacek RJ, Woods SC, D’Alessio DA, Seeley RJ. Weight loss through ileal transposition is accompanied by increased ileal hormone secretion and synthesis in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005;288:E447–E4537.
69. Patrìti A, Facchiano E, Annetti C, Aisa MC, Galli F, Fanelli C, Donini A. Early improvement of glucose tolerance after ileal transposition in a nonobese type 2 diabetes rat model. *Obes Surg* 2005;15:1258–64.
70. Koopmans HS, Sclafani A, Fichtner C, Aravich PF. The effects of ileal transposition on food intake and body weight loss in VMH-obese rats. *Am J Clin Nutr* 1982;35:284-93.
71. Patrìti A, Aisa MC, Annetti C, Sidoni A, Galli F, Ferri I, Gullà N, Donini A. How the hindgut can cure type 2 diabetes. Ileal transposition improves glucose metabolism and beta-cell function in Goto-kakizaki rats through an enhanced proglucagon gene expression and L-cell number. *Surgery*. 2007;142:74-85.
72. Cummings DE, Shannon MH. Ghrelin and Gastric Bypass: Is there a hormonal contribution to surgical weight loss? *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:2999–3002.

73. Morínigo R, Moizé V, Musri M, Lacy AM, Navarro S, Marín JL, Delgado S, Casamitjana R, Vidal J. Glucagon-like peptide-1, peptide YY, hunger, and satiety after gastric bypass surgery in morbidly obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91:1735-40.
74. Strader AD, Woods SC. Gastrointestinal hormones and food intake. *Gastroenterology.* 2005;128:175-91.
75. Strader AD. Ileal transposition provides insight into the effectiveness of gastric bypass surgery. *Physiol Behav.* 2006;88:277-82.
76. Patrìti A, Facchiano E, Annetti C, Aisa MC, Galli F, Fanelli C, Donini A. Early improvement of glucose tolerance after ileal transposition in a nonobese type 2 diabetes rat model. *Obes Surg* 2005;15:1258–64.
77. Patrìti A, Aisa MC, Annetti C, Sidoni A, Galli F, Ferri I, Gullà N, Donini A. How the hindgut can cure type 2 diabetes. Ileal transposition improves glucose metabolism and beta-cell function in Goto-kakizaki rats through an enhanced proglucagon gene expression and L-cell number. *Surgery.* 2007;142:74-85.
78. Strader AD, Clausen TR, Goodin ZS, Wendt D. Ileal interposition improves glucose tolerance in low dose streptozotocin-treated diabetic and euglycemic rats. *Obes Surg.* 2009;19:96-104.