



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
UNIFESP – EPM



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEDICINA TRANSLACIONAL

Coordenador: Profa. Dra. Dulce Elena Casarini

Projeto de Pesquisa – Doutorado

Karina Ferreira Neves

Caracterização bioquímica de células L em
tecidos do intestino delgado de ratos obesos
mediante espectroscopia vibracional

Orientador:

Prof. Dr. João Luiz Moreira Coutinho de Azevedo

Co-orientador:

Prof. Dr. Luciano Bachmann

Profa. Dra. Maria Teresa de Seixas Alves

SÃO PAULO
2011

RESUMO

INTRODUÇÃO: A prevalência global de diabetes mellitus do tipo 2 vem aumentando rapidamente em paralelo ao aumento do número de casos de obesidade. Entretanto, os métodos terapêuticos empregados para esta doença permanecem insatisfatórios. Existem drogas potencializadoras das ações da insulina e fármacos que estimulam a secreção de insulina, no entanto nenhum medicamento atualmente disponível é capaz de corrigir simultaneamente todas as disfunções envolvidas na gênese do diabetes mellitus tipo 2, além disso, a maior parte destes, perde a eficácia depois de alguns anos de evolução da doença. Dessa forma buscam-se estratégias cirúrgicas capazes de promover a normoglicemia inclusive em pacientes não-obesos. O controle da glicemia em pacientes diabéticos pode ser alcançado através do aumento da concentração sanguínea de GLP-1, hormônio produzido pelas células L que são mais densamente concentradas no íleo terminal. A melhora prematura e prolongada do diabetes em pacientes submetidos a cirurgias bariátricas consolidadas despertam a necessidade de investigação da interposição ileal isolada como alternativa cirúrgica para o tratamento do diabetes. A interposição desta região do íleo em uma região mais anterior (jejuno proximal) promoverá uma maior estimulação das células L pelos alimentos ainda pouco digeridos, aumentando a produção de GLP-1 e repercutindo no controle da glicemia. Porém, para que a interposição ileal isolada se consolide como tratamento cirúrgico do diabetes é necessário que o íleo interposto permaneça com a mesma taxa de diferenciação de células L por um período que justifique a intervenção.

OBJETIVOS: Caracterizar e comparar as alterações do segmento de intestino delgado em relação à quantidade de células L no tecido intacto e no interposto por meio da técnica de espectroscopia de vibração molecular no infravermelho médio e fluorescência resolvida no tempo.

MÉTODOS: Serão utilizados 20 ratos (*Rattus norvegicus albinus*) Wistar machos 2BAW heterogêneos com 12 semanas de vida. Todos os animais receberão dieta hipercalórica-hiperlipídica por pelo menos 8 semanas, até que desenvolvam dismetabolismo glicídico comprovado por teste de glicemia. Os animais serão distribuídos em dois grupos de 10 animais cada. Um grupo será submetido à interposição ileal (GI) e o outro não será submetido a nenhuma intervenção cirúrgica (GC). Para

análise comparativa da caracterização e comparação das alterações do segmento de intestino delgado em relação a quantidade de células L, serão coletados após a eutanásia os seguintes fragmentos intestinais: jejuno e íleo interposto dos animais do GI, jejuno e íleo dos animais do GC. Esses tecidos serão analisados por espectroscopia no infravermelho médio e fluorescência resolvida no tempo ambas com diferentes tratamentos metodológicos.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Type 2 diabetes mellitus is one of the most prevalent and threatening diseases in modern societies. Nevertheless, the therapeutic approaches currently used are insufficient to promote adequate metabolic control of the disease. There are a number of drugs that increase insulin secretion and also drugs that enhance insulin action. However, no compound currently available is capable of simultaneously correcting insulin secretion and action defects present in diabetes. Thus, there is currently a search for surgical procedures that can promote euglycemia also in non-obese patients. Diabetic patients glycemic control can be achieved by increasing the blood concentration of GLP-1, a hormone produced by L cells that are more densely concentrated in the terminal ileum. Early and extended improvement of diabetes in patients submitted to bariatric surgeries awakened the necessity of investigating the isolated ileal interposition as surgical alternative for the treatment of diabetes. The interposition of this ileal segment to a more anterior region (proximal jejunum) can promote a greater stimulation of the L cells by poorly digested food, increasing the production of GLP-1 and reflecting on glycemic control. However, in order to consolidate the ileal interposition as a surgical treatment of diabetes it is necessary that the interposed ileum keep the same differentiation rate into L cells for a long period to justify the intervention. **OBJECTIVES:** To characterize and compare changes in the segment of small intestine in relation to the amount of L-cells in intact tissue and brought through the technique spectroscopy in the mid-infrared molecular vibration and time resolved fluorescence.. **METHODS:** Twenty 12-week-old male Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*) of the WAB strain (heterogeneous) will be used. All animals will receive a high-calorie, high-fat diet for 8 weeks or more until they develop glucose dysmetabolism confirmed by glycemic test. They will be divided into two groups of 10 animals each: the isolated ileal interposition group (GI); and control group (GC), comprising

animals that will not be submitted to any surgical intervention. For the comparative analysis of the ileal precursor cells differentiation into enteroendocrine cells among the two groups, the following intestinal fragments will be collected after euthanasia: jejunum and interposed ileum from GI, jejunum and ileum from GC. These tissues will be reviewed by mid infrared spectroscopy and time resolved fluorescence both with different treatment methods.

1. INTRODUÇÃO

O diabetes é uma das doenças crônicas mais comuns. O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é uma doença metabólica caracterizada pela ocorrência de hiperglicemia crônica, causando um desequilíbrio no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos, devido a disfunções na secreção de insulina, além da ação desse hormônio sobre os tecidos alvos ou ambos fatores.² Apesar dos esforços realizados para o controle da glicemia em pacientes diabéticos, até o momento nenhuma das terapias teve impacto significativo na progressão da doença.³ Entretanto, a Interposição Ileal Isolada (III) apresenta-se como procedimento cirúrgico, simples e reversível, que pode tornar-se uma alternativa terapêutica válida para a doença nos pacientes não obesos, principalmente por propiciar acentuado aumento da produção do hormônio incretínico intestinal Glucagonlike peptide 1 (GLP-1).

Epidemiologia e etiopatogenia do diabetes

As estimativas desde 2000 são de que a prevalência mundial da doença aumente de 171 milhões de casos para 366 milhões até 2030.⁴ No cenário atual o diabetes atinge pessoas de 45-64 anos em países em desenvolvimento, enquanto nos países desenvolvidos a população apresenta a doença a partir de 64 anos.¹ O DM2, também conhecido como diabetes não insulino dependente, é responsável por cerca de 90% a 95% dos casos de diabetes.⁵

Tabela 1. Estimativas de casos de Diabetes para 2000 e 2030

Posição	2004		2030	
	País	Pessoas com Diabetes (milhões)	País	Pessoas com Diabetes (milhões)
1	Índia	31,7	Índia	79,4
2	China	20,8	China	42,3
3	Estados Unidos	17,7	Estados Unidos	30,3
4	Indonésia	8,4	Indonésia	21,3
5	Japão	6,8	Japão	13,9
6	Paquistão	5,2	Paquistão	11,3
7	Rússia	4,6	Rússia	11,1
8	Brasil	4,6	Brasil	8,9
9	Itália	4,3	Itália	7,8
10	Bangladesh	3,2	Bangladesh	6,7

Fonte: Wild et al., 2004

O Diabetes Mellitus do tipo 2 (DM2) é uma doença multifatorial caracterizada pela instalação de hiperglicemia em decorrência do progressivo declínio da função das células beta do pâncreas, e da instalação de resistência à ação da insulina.^{2,6} Ela surge quando as ilhotas pancreáticas não são mais capazes de manter a insulinemia em um nível suficiente para compensar o aumento na produção de insulina devido a uma resposta reduzida nos tecidos periféricos. Com o decorrer dos anos o diabetes passa por fases intermediárias conforme progride, inicialmente sendo incluída várias medidas que vão atuar na adaptação do paciente à condição da doença em diversos aspectos, como a mudança de hábitos de vida e dieta específica, a seguir com associação de fármacos que fazem com que a insulina seja segregada. À medida que a deficiência se acentua, inevitavelmente, as combinações terapêuticas de agentes orais podem não mais ser eficazes em controlar a hiperglicemia e a ministração de insulina se faz necessário.⁶⁻⁹

O desenvolvimento progressivo do DM2 aumenta consideravelmente os riscos de complicações que são causa substancial de morbidade e mortalidade:

complicações macrovasculares (doença vascular periférica, doença cardiovascular e doença cerebrovascular) e microvasculares como a nefropatia, retinopatia e neuropatia.¹⁰ As complicações do diabetes ainda incluem isquemia de membros levando a amputações, problemas dentários e distúrbios da gravidez.⁵ O risco de desenvolver essas doenças associadas está relacionado com a duração do diabetes e com o nível de controle glicêmico.¹¹

Dos 5% da população mundial que são diagnosticadas como diabéticos, 85% apresentam o tipo II. (Campbell, 2006b). Apesar de 90% do DM2 poder ser atribuído ao excesso de peso,¹² sua incidência é cada vez maior entre indivíduos com índice de massa corporal (IMC) na faixa da eutrofia e do sobrepeso.^{13,14}

Tratamento do diabetes

O DM2 pode ser descrito como um distúrbio metabólico de etiologia múltipla, que necessita de uma abordagem integrada e individualizada nos cuidados de cada paciente, a qual pode ser desafiadora.¹⁵ O tratamento inicialmente deve ser baseado em uma alimentação equilibrada, redução de peso e atividade física; pontos chave para o tratamento do DM2, mas quando o paciente não apresenta controle glicêmico com alterações dos hábitos alimentares e atividade física a terapia medicamentosa se faz necessária na ação antidiabética. Nenhum fármaco atualmente disponível é capaz de corrigir todas as anomalias envolvidas na patogênese do DM2, além disso, a maior parte destes, perde a eficácia depois de alguns anos de evolução da doença.^{16,17}

Atualmente, existem diferentes classes de fármacos com diversos mecanismos de ação, que podem ser utilizados isolados ou em combinações terapêuticas variadas.¹⁶ Isso porque muitos pacientes requerem, em longo prazo, combinações entre dois ou mais agentes orais.¹⁷⁻¹⁹ Os inibidores de dipeptidil – peptidase IV (DPP-4) constituem a classe mais recente de agente orais no controle de diabetes tipo II, inibindo a degradação enzimática do peptídeo glucagon – 1 (GLP-1). O GLP-1 é uma incretina hormonal secretada no intestino delgado e liberada na corrente sanguínea. Tem a capacidade de limitar a hiperglicemia pós-prandial inibindo a liberação pancreática de glucagon e estimulando a produção de insulina. Uma vez inibida a degradação de GLP-1, os DPP-4 promovem uma redução de HbA1c de 0,5 a 1,0% sem ganho de peso ou risco de glicemia, porém há limitações quanto à efetividade e segurança.¹⁷⁶ Os estudos experimentais demonstraram que essas terapias

prolongam a sobrevivência das células beta pancreáticas, atrasando sua disfunção e promovendo sua regeneração, desta forma permitindo, pelo menos em teoria, a possibilidade de ser frenada a progressão do DM2.^{3,9,28}

Entretanto, apesar de ter sido demonstrada promissora essa abordagem do DM2 mediante ministração de DPP-4 e análogos do GLP1, devem ser levados em consideração o alto custo desses novos agentes e a inexistência de pesquisas em longo prazo quanto à sua segurança. Há relatos de náuseas, cefaléia, pancreatite aguda, infecção de vias aéreas superiores, depressão, hipoglicemia severa e reações alérgicas dermatológicas por seu uso. Alguns indivíduos apresentam, ainda, modesta redução dos níveis de hemoglobina glicada em comparação com a utilização de insulina e de agentes mais antigos. O desenvolvimento de carcinomas em cobaias, pela sua utilização, ainda não foi confirmado em humanos.^{18,19,28}

A intensificação da insulinoterapia é a forma mais apropriada para se buscar atingir a normoglicemia e reduzir as complicações da afecção, com controle glicêmico precoce, rigoroso, persistente e efetivo.^{16,20,21} Dessa forma, atualmente a insulina é a única alternativa terapêutica conservadora efetiva para o controle metabólico.^{6,7,22}

No entanto, a ministração de insulina exógena é de difícil controle. Merece ser dito que atingir níveis ótimos de controle glicêmico, isto é, valores de glicemia o mais próximo possível dos níveis de um indivíduo sem diabetes²³ com vistas à prevenção de suas complicações, continua sendo um dos maiores desafios na prática clínica.^{2,21} Apenas uma pequena parcela da população com diabetes alcança as metas terapêuticas, o que se deve às limitações da maioria das medidas disponíveis.²³ Entre estas limitações estão a baixa adesão às dietas, a resistência a regimes de exercícios físicos, a limitada eficácia e os importantes efeitos adversos dos agentes terapêuticos atuais, o atraso no início da insulinoterapia e a ojeriza que os pacientes manifestam ao regime de múltiplas injeções parenterais de insulina.^{21,24} Para o sucesso da insulinoterapia é necessária informação correta, motivação, melhores níveis socioeconômico e cultural do paciente, alto grau de adesão e capacidade de aprendizado, disponibilidade de recursos, além da participação e do apoio de uma equipe multiprofissional.

Algumas medicações antidiabéticas aceleram a apoptose das células beta,² outras reduzem a densidade mineral óssea e promovem ganho de peso por expansão do volume e edema, o que pode causar ou exacerbar a insuficiência cardíaca e desencadear eventos cardíacos isquêmicos.^{17,18}

Existem alguns análogos da insulina que permitem uma reposição mais fisiológica, com mais liberdade, flexibilidade e conveniência na ministração, permitindo inclusive maior liberdade em relação ao conteúdo da alimentação e destarte propiciando melhor qualidade de vida.^{6,7,25} Formulações que eliminam a necessidade de injeções subcutâneas podem suplantam algumas das limitações da insulinoterapia usual, melhorando o controle glicêmico e aumentando a qualidade de vida dos indivíduos.²¹ Algumas formulações para aplicação de insulina de maneira não invasiva estão sendo testadas, incluindo a insulina em pó inalável Exubera (Pfizer), Technosphere (MannKind), Aerdose (Aerogen), BAI (Kos), Alveair (Coremed) e Bio-Air (BioSante). Na escolha terapêutica deve-se considerar a tolerabilidade, os efeitos não-glicêmicos dos agentes antidiabéticos, os efeitos sobre as comorbidades associadas e também o custo.¹⁷

As limitações dos tratamentos convencionais, incapazes de preservar a função das células beta pancreáticas no decorrer do tempo, tornam imperativa a obtenção de novos meios para atingir um controle glicêmico adequado e evitar ou retardar a necessidade de medidas adicionais.² Desta forma, há clara necessidade de novas opções terapêuticas antidiabéticas focadas na preservação da integridade e função das células beta e na parada da progressão do DM2.⁸ Medidas mais efetivas, baseadas na etiopatogenia da afecção, são necessárias e devem incluir maior controle tanto da glicemia de jejum quanto da glicemia pós-prandial.²²

Na abordagem terapêutica do DM2 e da resistência insulínica, além de uma ampla variedade de opções no tratamento clínico multidisciplinar, com o objetivo de perda de peso ponderal e controle da glicemia com opções farmacológicas, podem-se incluir técnicas operatórias bariátricas e metabólicas. É bem sabido que essas intervenções cirúrgicas podem controlar o DM2, mesmo em longo prazo.^{29,30}

Intervenções cirúrgicas

A cirurgia bariátrica é capaz de melhorar e até resolver definitivamente as comorbidades associadas à obesidade em 70% a 100% dos pacientes,³¹ prolongando sua expectativa de vida³² além de reverter parcialmente a disfunção hipotalâmica e o aumentar a atividade antiinflamatória do fluido cérebroespinal.³³

A melhora do controle glicêmico ocorre meses após a cirurgia da banda gástrica ajustável, mas tal melhora é mais rápida e completa após a derivação em Y-de-Roux, demonstrando que ambas são capazes de melhorar ou até curar o DM2, através de mecanismos possivelmente diferentes.³⁴ Sabe-se que a gastroplastia vertical com ou sem anel de contenção e derivação gastrojejunal em Y-de-Roux, intervenção cirúrgica dita padrão ouro para o tratamento da obesidade mórbida, é capaz de atingir os objetivos de perda de peso e controle das comorbidades mantidos em longo prazo.³⁵ Este controle das comorbidades é geralmente atribuído à diminuição da massa corporal, porém, foi demonstrado efeito endócrino potencialmente controlador da glicemia antes mesmo de qualquer perda de peso importante.³⁶ Observou-se também que, após a derivação gastrojejunal, estavam aumentadas no sangue periférico substâncias secretadas pelo intestino diretamente na corrente sanguínea, como o GLP-1 (glucagonlike peptide 1), capazes de estimular a produção de insulina pelas células beta pancreáticas, facilitar a ação da insulina no transporte da glicose para o interior das células e de induzir a sensação de saciedade alimentar.³⁷

A derivação gastrojejunal Y-de-Roux propicia o estímulo das células produtoras de GLP-1 por alimentos que chegam incompletamente digeridos às porções mais distais do intestino delgado, em função do trânsito dos alimentos ter sido desviado ao jejuno proximal.³⁸ A derivação gastrojejunal e outras intervenções cirúrgicas bariátricas e metabólicas altamente efetivas têm em comum a entrega do quimo rico em nutrientes ao intestino distal antes do que ocorreria normalmente. A chegada desses nutrientes diretamente no íleo ativa um mecanismo de feedback negativo conhecido como “ileal brake”³⁹ que resulta em mecanismos neuronais e endócrinos que influenciam no esvaziamento gástrico, motilidade intestinal e saciedade.⁴⁰

Em 1998 já se questionava se o DM2 poderia ser uma doença do intestino anterior.⁴¹ Atualmente as diversas evidências clínicas, fisiológicas, biológicas, antropológicas, epidemiológicas, anatômicas e evolutivas, juntamente com os resultados cirúrgicos confirmam que o intestino delgado proximal – de dimensões adequadas em nosso ambiente ancestral – pode ter

se tornado excessivo face ao tipo de dieta industrializada do nosso tempo. Os consumidores de dieta moderna rica e modificada passaram a ter uma porção anterior do intestino (jejuno) muito maior do que seria desejável. Um jejuno mais curto iria propiciar que o alimento ingerido não fosse totalmente absorvido na porção intestinal proximal e pudesse chegar quase in natura ao intestino distal (íleo) a fim de excitar as suas células endócrinas do tipo L a produzir substância (GLP-1) excitatória da produção de insulina pelo pâncreas endócrino e facilitadora do metabolismo glicídico nos tecidos periféricos, além de ser indutora de saciedade alimentar mediante secreção eletiva do hipotálamo.⁴²

A gênese dos distúrbios do metabolismo da glicose compreende uma gama multifacetada e intensamente imbricada de fatores, dos quais se destacam os hormônios, principalmente o GLP-1 produzido pelas células L enteroendócrinas do intestino delgado, que estão mais densamente concentradas no íleo terminal.³² O GLP-1 é produzido pelo processamento pós-traducional tecido-específico de seu precursor, o peptídeo proglucagon, por enzimas pró-hormônio convertases.⁴³ As modificações pós-traducionais do gene do proglucagon geram cinco diferentes produtos no intestino: glicentina, oxintomodulina (OXM), peptídeo-1 interveniente (IP-1), GLP-1 e GLP-2.⁴⁴ O processamento do proglucagon nas células L intestinais é feito pela enzima pró-hormônio convertase PC1/3.⁴³ A secreção de GLP-1 ocorre em resposta ao estímulo gerado por nutrientes de efeito incretínico.⁴⁵ Incretinas são hormônios secretados na circulação sanguínea pelo trato gastrointestinal em resposta a ingestão de certos nutrientes, resultando no aumento da produção de insulina e conseqüente captação de glicose. O GLP-1 exerce funções bem definidas como estímulo de secreção glicose-dependente da insulina, aumento da transcrição do gene da insulina, indução da neogênese e proliferação de células beta das ilhotas de Langerhans, inibição da apoptose das células beta, aumento da expressão fenotípica de células beta diferenciadas, estímulo da produção de somatostatina e redução da produção de glucagon.^{46,47}

Com a evolução da neurogastroenterologia houve um entendimento melhor da fisiologia gastrointestinal, assim as modalidades de intervenções cirúrgicas bariátricas evoluíram até os atuais procedimentos mistos que contemplam além dos aspectos de restrição e disabsorção, também e principalmente os fatores neurohormonais e metabólicos. Com isso o termo cirurgia baroendócrina é cada vez mais utilizado, em especial para o tratamento do DM2.^{30,48} Atualmente as cirurgias bariátricas mistas (restritivas e desabsortivas) são o tratamento com maior eficácia para pacientes com obesidade mórbida, com melhora significativa das comorbidades associadas (Melissas, 2008).⁴⁹ Os estudos sobre essas intervenções e a maior liberação de GLP-1 e maior controle glicêmico, antes mesmo da perda de peso significativa, demonstram que o controle do diabetes pode estar relacionado a efeitos hormonais secundários à técnica operatória realizada.^{47,50}

A interposição ileal isolada

Já no início dos anos 80 ficou demonstrado que o aumento da liberação de GLP-1 é suficiente para o controle do peso corporal de ratos obesos através da interposição de um fragmento de cinco ou dez centímetros de íleo terminal.

⁵¹ Os efeitos dessa operação estão ilustrados na figura 1.

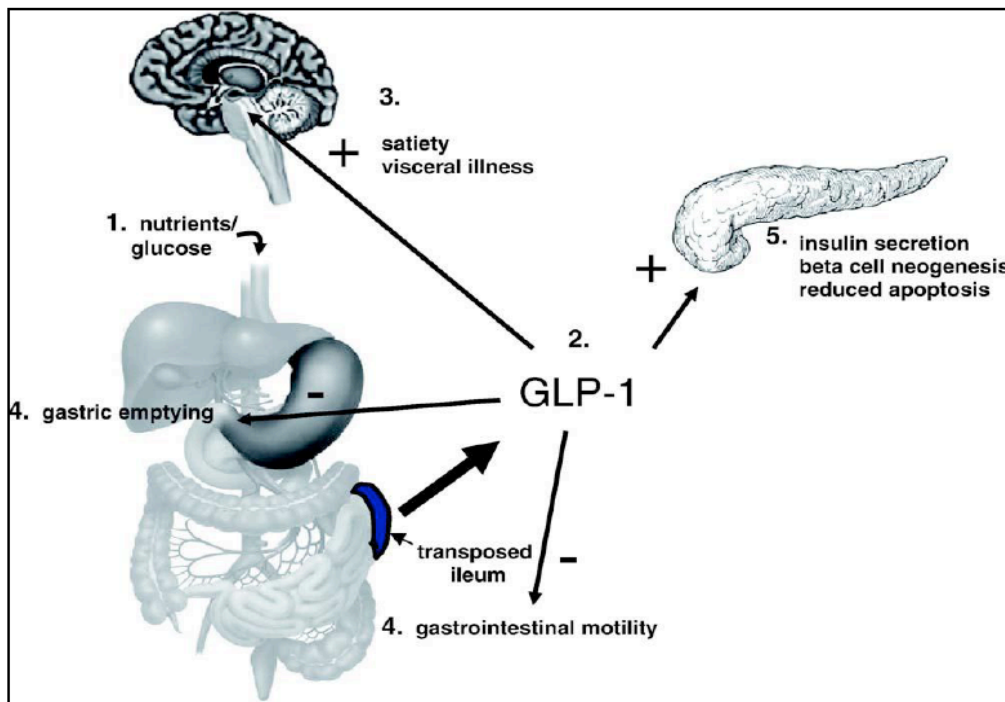


Figura 1. Efeitos da interposição ileal no controle da glicose. (1) Os nutrientes da dieta entram no lúmen intestinal e estimulam as células enteroendócrinas causando (2) liberação precoce e prolongada de GLP-1, (4) que irá afetar a motilidade gastrointestinal e o esvaziamento gástrico. (5) O GLP-1 é uma incretina e irá também mediar a secreção de insulina e proteger o pâncreas endócrino.⁵²

Outro estudo com ratos demonstrou juntamente com o aumento do GLP-1 plasmático, uma hipertrofia do íleo transposto após interposição ileal.⁵³ Já em seres humanos o GLP-1 aumentou após a derivação jejunoileal e biliopancreática em obesos mórbidos.⁵⁴ Outro estudo de 1998 demonstrou que, 20 anos após a derivação jejunoileal, os pacientes ainda apresentavam altos níveis de GLP-1.⁵⁵ Já em 1999 estes e outros estudos sugeriram que a interposição ileal poderia ser um tratamento do DM2.⁵⁶ Ao observar pacientes imediatamente após cirurgia bariátrica foi identificada uma melhora rápida e permanente no controle da glicose, sendo que na maioria dos casos a cirurgia eliminou a necessidade de medicamentos para o controle da glicemia.^{57,58} Os efeitos benéficos da cirurgia bariátrica no controle glicêmico dependem também do tempo de existência da doença⁵⁹ e do tipo de intervenção cirúrgica, sendo que aquelas baseadas somente na restrição do estômago, como a colocação de banda gástrica ajustável, demonstram ser menos efetivas na melhora do DM2 em comparação com aquelas que envolvem uma

quantidade substancial de derivação intestinal^{55,60,61} ou importante aumento da velocidade do trânsito através do tubo digestório, como a gastrectomia vertical.^{62,63}

A gastrectomia vertical é um procedimento restritivo pela acentuada redução da capacidade reservatória gástrica, e metabólico devido à diminuição dos níveis circulantes do hormônio orexígeno grelina, produzido pelo fundo e grande curvatura gástricos,^{62,63} visando primordialmente a perda de peso. A gastrectomia vertical vem demonstrando bons resultados no controle glicêmico pós-operatório⁶⁴ mesmo na avaliação em longo prazo,⁶³ o que pode ser devido à chegada de alimentos não totalmente digeridos ao íleo distal, em função da velocidade de esvaziamento aumentada após a operação. Como consequência ocorre o aumento da secreção de GLP-1 pelas células L.^{65,66}

A interposição ileal foi bastante praticada em humanos obesos e não obesos, entretanto nunca de forma isolada. Recentemente foram publicados resultados promissores sobre técnicas em humanos que associam a gastrectomia vertical à interposição de segmento de íleo distal no trajeto do jejuno proximal.⁶⁷⁻⁷² Esse procedimento pode induzir saciedade precoce associada a benefícios no metabolismo glicídico e causar perda ponderal, em curto e médio prazo. Em pacientes diabéticos não-obesos a gastrectomia vertical associada à interposição ileal demonstrou eficácia no controle do DM2.⁶⁷⁻⁷¹ Ao analisar os efeitos em humanos após 6 a 18 meses, percebeu-se que a gastrectomia vertical associada à interposição ileal foi capaz de promover a remissão do DM2 em 80% dos pacientes, que ficaram livres do tratamento com drogas hipoglicêmicas ou dieta. Os outros 20% apresentaram melhora significativa, apesar da necessidade da permanência do tratamento oral.⁷²

Não obstante, observamos uma impropriedade conceitual quanto à proposta da realização de gastrectomia vertical em paciente diabéticos não-obesos, uma vez que, nas séries relatadas na Literatura⁶⁷⁻⁷² os benefícios metabólicos obtidos provavelmente deveram-se quase que exclusivamente à

interposição ileal associada, e não propriamente ao procedimento de ressecção gástrica parcial (gastrectomia vertical).

Por outro lado, a melhora do metabolismo da glicose que observamos no pós-operatório precoce de pacientes obesos e diabéticos submetidos à gastrectomia vertical como procedimento único⁶³ deve-se provavelmente ao aumento da velocidade do trânsito intestinal determinado pela intervenção,⁶⁶ que propicia a chegada mais rápida de alimentos ainda não digeridos no íleo terminal tóxico, excitando as células L para a produção de GLP-1 endógeno. Conclui-se que, nesses pacientes portadores de dismetabolismo glicídico, mas não obesos, a gastrectomia vertical melhora o metabolismo da glicose, mas isso ocorre unicamente pela aceleração do trânsito gastrointestinal, que faz chegar ao íleo terminal alimentos incompletamente digeridos, os quais se constituem no gatilho para a produção de GLP-1 pelas células L ileais. As outras conseqüências da gastrectomia vertical, tais como o componente restritivo por resumir-se agora o reservatório gástrico a um tubo de pequeno calibre, e o afeito anorexígeno, conferido pela diminuição do hormônio orexígeno grelina⁶³ graças à remoção da grande curvatura e fundo gástricos onde predominantemente se encontram as suas células produtoras enteroendócrinas do tipo X/A. Entretanto a gastrectomia vertical é uma operação de grande porte e não isenta de importantes complicações, tais como fístulas de evolução tórpida e esofagite de refluxo. Não há razão para adição desse procedimento em pacientes não obesos e diabéticos, nos quais a interposição ileal isolada pode ser de grande valia. A interposição ileal em ratos envolve o posicionamento de um segmento de 10 a 20 cm de íleo distal com suas enervações e vasos intactos para o jejuno proximal,⁷³ resultando em significativa hiperplasia, hipertrofia e até completa “jejunização” do íleo transposto.⁷⁴⁻⁷⁸

A interposição ileal isolada já se mostrou eficaz na correção do dismetabolismo em diversas pesquisas envolvendo animais de experimentação,^{51,79,80} porém, no âmbito da cirurgia bariátrica e metabólica a avaliação desta modalidade operatória envolvendo apenas a interposição ileal ainda não foi realizada em humanos.

O aumento da síntese e liberação do GLP-1 pode ser atribuído a um maior estímulo das células L localizadas no segmento do íleo interposto, provocado por uma quantidade maior de alimentos parcialmente digeridos, com efeitos diretos no metabolismo glicídico.⁸¹ O GLP-1 se eleva no plasma em resposta ao estímulo alimentar e tem efeito sacietógeno no sistema nervoso central,⁸² diminui a absorção de gorduras pelo trato gastrointestinal⁸³ e diminui a motilidade gástrica⁸⁴ e intestinal.⁸⁵ Os efeitos mais notórios do GLP-1 são os de promover diminuição da resistência insulínica periférica, redução da apoptose das células beta pancreáticas, aumento da diferenciação das células primitivas dos canalículos pancreáticos para células beta adultas e incremento da proliferação destas células.^{86, 87}

O GLP-1 é o hormônio incretínico mais associado aos efeitos antidiabéticos da cirurgia bariátrica. Estimular as células L ileais a clivar o proglucagon e liberar o GLP-1 parece ser o meio mais eficaz de se obter o efeito incretínico nos pacientes diabéticos submetidos à cirurgia bariátrica. Várias são as técnicas que podem alcançar este efeito, todas elas baseadas na hipótese do intestino posterior, conhecida como teoria hindgut, que se baseia no fato de que o íleo, ao ser colocado em contato com alimentos ainda não totalmente digeridos, corrige os efeitos deletérios da “síndrome do íleo vazio” ocasionada pela falta de estimulação das células L.^{61,81,88} A simples interposição de um segmento de íleo nos segmentos mais proximais do intestino delgado é o procedimento cujos resultados mais enfatizam essa hipótese. Estudo dessa interposição em animais de experimentação submetidos a um modelo de obesidade induzida por dieta demonstrou aumento significativo dos níveis de GLP-1 (Strader, 2006).⁵² Do mesmo modo, foi demonstrada melhora no quadro diabético em pacientes obesos em estudo clínico com essa técnica que interpõe um segmento de íleo de 50 cm distal ao ângulo de Treitz, associada à gastrectomia vertical.⁸⁹

Em animais de experimentação, além do “freio ileal” (reação de redução da motilidade do trânsito gastrointestinal proximal relacionada à produção de enterohormônios^{90,91} secundária à cirurgia de interposição ileal), observou-se

também que, em ratos euglicêmicos, a interposição ileal melhorou a tolerância à glicose.^{52,92}

Os achados anteriores sugerem que a interposição ileal isolada seja uma alternativa válida para o tratamento do diabetes, porém, conhecendo a grande capacidade de adaptação dos intestinos, é necessário investigar se as células L do íleo interposto continuarão a ser diferenciadas em densidade semelhante à do íleo intacto, exercendo suas funções como a produção de GLP-1 ao longo do tempo, contribuindo para o controle metabólico da glicose e justificando, então, a interposição ileal isolada como tratamento cirúrgico do diabetes.

Espectroscopia no infravermelho

O intestino delgado tem sido exaustivamente estudado, particularmente no que diz respeito à identificação da localização de células-tronco.¹⁷⁷ As células-tronco epiteliais consistem perto da base da cripta e seus descendentes migram para o topo do vilão. Assim, a localização real das células-tronco por cripta no intestino delgado permanece controverso, com evidências de que exista de quatro a seis células-tronco em cada cripta, posicionadas logo acima das células de Paneth e uma associação entre os tipos celulares diferenciados e as células tronco multipotentes.¹⁷⁸

As células tronco multipotentes mostraram-se capazes de dar origem a todas as linhagens de células possível no intestino delgado. Por outro lado o destino das células durante a diferenciação envolve decisões binárias, com precursores comprometidos com a linhagem secretória ou absorptiva.¹⁷⁸

A espectroscopia no infravermelho médio é uma técnica valiosa para identificar as diferenças químicas entre os diferentes tipos de células.^{179,180,181} Ela permite a caracterização bioquímica das células baseada no fato de que diversas biomoléculas absorvem no infravermelho médio.¹⁸¹ Trabalho anterior sugeriu que os espectros no infravermelho médio podem permitir a identificação de marcadores nos quais discriminem as células-tronco do trato gastrointestinal em relação as células de amplificação em trânsito ou células diferenci-

¹⁸³ adas e também tem sido empregada para estudar o sistema embrionário ¹⁸⁵ e mesenquimal ¹⁸⁶ além da diferenciação de células-tronco in vitro.

A técnica de absorção de infravermelho analisa a interação de radiação eletromagnética com a matéria, determinando os níveis de energia de átomos e moléculas. ¹⁸⁷ O método fornece um espectro de absorção bioquímica devido às vibrações de ligações químicas de componentes celulares, tais como proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos e lipídio. ¹⁸⁸ A grande maioria das moléculas tem bandas de infravermelho na faixa espectral entre 400 e 4000 cm^{-1} (MIR), isso se deve, principalmente, ao fato de nessa região ocorrerem, essencialmente, transições fundamentais e há a existência de uma faixa espectral conhecida como região de impressão digital. Nessa região, pequenas alterações na estrutura e na constituição de uma molécula resultam em mudanças significativas na distribuição das bandas de absorção do espectro, que são relacionados com a estrutura da molécula ^{187,188}.

Diversos trabalhos têm sido publicados sobre a importância do diagnóstico através de diferentes técnicas espectroscópicas e de imagem na área de detecção do câncer. No entanto, há uma lacuna, já que parece que os detalhes e características do pico das frequências e suas definições que podem ser atribuídos a determinados grupos funcionais presentes nos tecidos biológicos não foram totalmente investigadas. ¹⁸⁸ Assim, a fim de minimizar as desvantagens que ocorrem nos diagnósticos histológicos convencionas, o projeto visa verificar a potencialidade da técnica de espectroscopia por infravermelho médio, como uma abordagem totalmente nova para análise e caracterização bioquímica das células que residem do intestino delgado.

Espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo

A interação entre a radiação UV-visível e a matéria envolve essencialmente transições entre estados eletrônicos de átomos e moléculas. O estudo de sistemas biológicos pela análise da radiação absorvida ou emitida é uma poderosa ferramenta tanto para compreensão de processos básicos nos organismos vivos, como para a utilização da luz em diagnóstico e na terapia médica.

Desde a década de 70, a espectroscopia de fluorescência é utilizada no estudo de diversos processos e sistemas de interesse biológico,¹⁸⁹ por exemplo, em estudos sobre fluxo iônico,¹⁹⁰ difusão de metabólitos e macromoléculas em meio fluido,^{191, 192, 193} estados de agregação de componentes da superfície celular e dinâmica em membranas,^{194,195} estrutura de peptídeos e proteínas, cinética enzimática,^{196, 197} e outros. Muitos dos experimentos envolvem medidas de posição espectral e intensidade da emissão fluorescente, obtidas com espectrofluorímetros estáticos ou de estado estacionário, que permitem também observações da despolarização da emissão quando a excitação e a detecção são feitas com o auxílio de polarizadores. Informações relevantes são obtidas com o uso de técnicas que permitem a resolução temporal da emissão: o tempo característico envolvido nos processos de absorção e emissão fluorescente, da ordem de 10^{-9} s é compatível com eventos relacionados à interação da molécula emissora com o meio circundante. Desse modo, as técnicas de fluorescência estática combinadas com as técnicas resolvidas no tempo são particularmente atraentes para o estudo de diversos fenômenos relacionados às propriedades dinâmicas de sistemas biológicos.

As informações obtidas por meio da espectroscopia de fluorescência dependem do conhecimento sobre os efeitos das interações das moléculas emissoras com o meio circundante. A técnica de espectroscopia de fluorescência baseia-se na excitação do tecido por uma radiação luminosa, estimulando a resposta da autofluorescência dos fluoróforos endógenos presentes no local, permitindo assim a caracterização e, mesmo, a quantificação desses fluoróforos. Por meio de interpretações dos níveis de energia, podem-se deduzir informações detalhadas a respeito das estruturas das moléculas que originam os espectros. A fluorescência é produzida quando as espécies excitadas regresam ao estado fundamental. A energia de uma molécula no seu estado fundamental está associada ao estado designado como S_0 . Uma excitação pode levar a molécula a um determinado estado excitado vibracional no interior de um mesmo estado eletrônico ou, ainda, no caso da fluorescência no processo de decaimento. O tempo de absorção de um fóton por uma molécula é da ordem de 10^{-14} a 10^{-15} s; sendo que no processo de decaimento o tempo é, em geral, da ordem de 10^{-6} a 10^{-5} segundos.

É importante esclarecer que este fenômeno óptico observado nos tecidos biológicos é obtido pela presença das substâncias químicas que os constituem.

2. OBJETIVOS

Geral

O objetivo central deste trabalho é o de, mediante a técnica de espectroscopia de vibração molecular no infravermelho médio e fluorescência resolvida no tempo, caracterizar componentes bioquímicos do tecido em estudo antes e depois da interposição ileal em ratos obesos.

Específicos

Caracterizar a composição bioquímica das células L em tecidos do intestino delgado de ratos obesos;

Verificar a quantidade existente de células L antes e depois da interposição ileal.

3. JUSTIFICATIVA

A interposição ileal isolada pode vir a ser uma abordagem terapêutica válida para o controle do diabetes mellitus tipo 2, muito bem indicada principalmente para indivíduos não obesos. A intervenção cirúrgica a ser avaliada é de simples execução, de baixo custo, pode ser facilmente revertida e não requer nenhuma remoção de tudo digestório nem condiciona desvio de trânsito alimentar de nenhuma ordem, evitando a desnutrição e outras complicações associadas a outras intervenções bariátricas.

Porém, há de se investigar a possibilidade de alteração do padrão endócrino do íleo (alta densidade de células L produtoras de GLP-1) após a interposição ileal isolada. Caso o íleo adote um padrão jejunal (baixa densidade de células L) a interposição ileal isolada será invalidada para o fim que se propõe, porém caso a possibilidade teórica da alteração do padrão endócrino seja afastada, mediante esta pesquisa, demonstrando que o segmento de íleo interposto mantém a alta densidade de células L funcionais,

estará garantida a ação em longo prazo dos efeitos endócrinos benéficos já bem estudados do GLP-1 na manutenção da normoglicemia.

A aplicação de espectroscopia no infravermelho médio e de fluorescência realizada no tempo à subscrição bioquímica de células características da mucosa do intestino delgado é uma proposta inovadora para a compreensão deste sistema. A maioria de tais investigações se baseia principalmente no uso de marcadores imunohistoquímicos.

A técnica, também permite a determinação rápida e objetiva da bioquímica celular, que exige a preparação da amostra mínima, sem manchas. Além disso, método preserva a citoarquitetura, facilitando a posterior análise convencional. Assim, a espectroscopia no infravermelho médio e a de fluorescência realizada no tempo – se revela promissora para aplicações biológicas que necessitem caracterizar componentes bioquímicos em tecidos biológicos. O que a torna uma importante ferramenta no processo de investigação de uma possível jejunização do íleo após sua interposição.

Uma vez estudada tal intervenção no âmbito da medicina translacional em animais de experimentação, cujas características biológicas são muito semelhantes às dos humanos no que diz respeito ao metabolismo glicídico e à nutrição em geral, os resultados poderão ser prudentemente extrapolados para a clínica, mediante estudos devidamente controlados por protocolos autorizados por comitês de ética. A relevância da presente pesquisa reside nos benefícios que esta intervenção cirúrgica possa promover para uma imensa população de indivíduos diabéticos do tipo 2 de difícil controle por medidas conservadoras, prestes a serem submetidos ou já na vigência de insulino-terapia, ainda que não-obesos, promovendo o controle substancial e até mesmo a remissão da disglucemia.

Contudo, se faz necessário na área da Medicina Translacional uma pesquisa nesse sentido, na qual promova uma colaboração entre pesquisadores de ciências básicas e de áreas profissionalizantes com foco no desenvolvimento de novas tecnologias e diretrizes de saúde, atuantes na aplicabilidade terapêutica e diagnóstica.

4. RESULTADOS ESPERADOS

Espera-se que os espectros obtidos das amostras investigadas antes e depois da interposição ileal em ratos obesos mostrem uma manutenção na alta densidade de células-L produtoras de GLP-1, apesar da esperada transformação do padrão ileal para o padrão jejunal do epitélio mucoso quanto à secreção exócrina e absorção. É esperado que as células tronco continuem a se diferenciar em ritmo normal em células L. A intolerância à glicose e a resistência insulínica deverão atenuar-se ou desaparecer após a interposição ileal isolada. Alguma redução no peso dos animais submetidos à interposição ileal isolada deverá ocorrer, porém sem desnutrição. Nenhum efeito adverso da interposição ileal isolada é esperado.

A caracterização bioquímica de células L em tecidos do intestino delgado de ratos obesos será realizada através duas técnicas espectroscópicas, as quais terão o seu padrão de comparação as lâminas de imunohistoquímica, com as células L quantificadas. Da microespectroscopia de absorção no infravermelho se espera obter aproximadamente 19 bandas de absorção associadas a diferentes radicais químicos.^{198,199} Estas 19 possibilidades de bandas de absorção permitirão avaliar e comparar com a imunohistoquímica e identificar um padrão espectroscópico característico das células L e outras células de interesse. Adicionalmente estas mesmas imagens serão empregadas para identificar o padrão de alteração bioquímico entre o grupo controle(GC) e interposição ileal (GI) (sem a necessidade de comparação com imagens de imunohistoquímica), apenas a comparação entre os grupos controle e interposição, para ambos os tecidos.

Na técnica de fluorescência resolvida no tempo observa-se a autofluorescência de tecidos biológicos, resultante de diferentes estruturas presentes as quais já são identificadas na literatura e revisadas recentemente.²⁰⁰

Com as imagens obtidas a partir da intensidade e dos tempos de vida da autofluorescência sob excitação de dois comprimentos de onda 375nm e 420nm, de forma similar a outra técnica de espectroscopia empregada, aqui, estas imagens serão comparadas com a imunohistoquímica e poderemos buscar padrões característicos das células L .

5. MÉTODOS

5.1. Comitê de Ética em Pesquisa

O presente projeto de pesquisa será encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa Experimental da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina (UNIFESP/EPM).

5.2. Procedimentos experimentais

Os procedimentos experimentais serão realizados de acordo com as orientações do manual “Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório”, Lapchick, Mattaria, Ko; Atheneu, 2009, CDD 636.0885.

Todos os animais receberão a mesma dieta e serão operados quando estiverem dismetabólicos. No dia da operação e da eutanásia serão coletadas amostras de sangue de todos os animais para análise bioquímica. Após a eutanásia serão coletadas amostras de íleo de todos os grupos e de jejuno somente do grupo controle, que serão analisadas por espectroscopia vibracional afim de caracterizar as alterações do segmento de intestino delgado em questão em relação a composição bioquímica no tecido intacto e no interposto.

5.3. Amostra

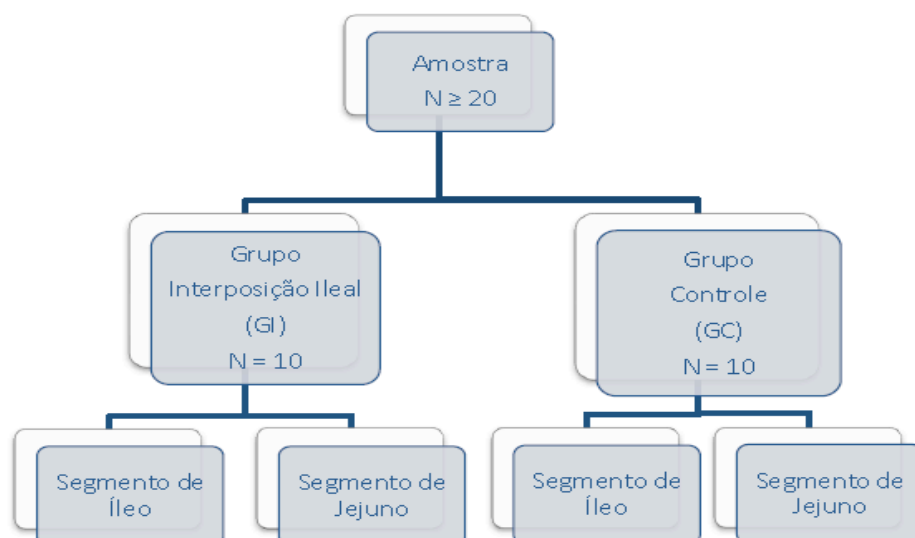
Serão utilizados 20 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*), Wistar – 2BAW heterogêneos, com 12 semanas de vida, de peso corporal variando entre 250 e 280 g, fornecidos pelo Laboratório de Experimentação Animal do Instituto de Farmacologia e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina (UNIFESP/EPM), onde serão mantidos durante todo o procedimento experimental.

Os animais permanecerão alojados em gaiolas individuais e mantidos por 16 semanas, com temperatura ambiente controlada de $23 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de $55 \pm 15\%$, e com dispositivo automático (Timer – Kienzle) proporcionando ciclo de alternância de luminosidade entre claro e escuro de 12 em 12 horas (06:00 / 18:00 horas).

Através de sorteio, os animais serão distribuídos em 2 grupos, conforme organograma abaixo discriminado:

- Grupo Interposição (GI) – submetidos à interposição ileal, com 10 animais;

- Grupo Controle (GC) - não submetidos a nenhuma intervenção cirúrgica.



Para cada grupo serão obtidas três amostras para análise por imunohistoquímica, microespectroscopia no infravermelho e de fluorescência resolvida no tempo.

As intervenções cirúrgicas serão realizadas na 20^a semana de vida ou assim que for verificado o distúrbio metabólico. Todos os animais serão acompanhados até a 28^a semana de pós-operatório, isto é, a 28^a semana de vida, quando serão sacrificados.

5.4. Dieta

Todos os animais serão mantidos no decorrer de todo o experimento com dieta hipercalórica (DH), rica em lipídeos, pelletizada, ministrada ad libitum, em ciclos alternados de quatro tipos diferentes de rações (1, 2, 3 e 4) pelo período de 16 semanas, estimulando a ingestão. As rações experimentais serão alternadas a cada 24 horas, e a quantidade não ingerida será mensurada. O consumo dessas dietas promoverá obesidade nos animais, os quais exibirão características comumente associadas com a obesidade humana, como resistência à insulina, hiperglicemia, hiperinsulinemia, dislipidemia e esteatose hepática. A oferta de água será de livre acesso em todos os grupos.

As rações experimentais 1, 2, 3 e 4, de acordo com as especificações da Nutrient Requirements of the Laboratory Rat, recomendadas pela National Academy of Sciences, serão produzidas industrialmente pela empresa Rhoster®, Araçoiaba da Serra – SP, compostas por ração padrão para ratos, com suplementação protéica, vitamínica e mineral. Os ingredientes adicionais hiperenergéticos que serão utilizados no preparo das dietas experimentais hipercalóricas, em gramas por quilo, serão, respectivamente:

- DH1 – ração padrão, 355; amendoins torrados, 176; caseína, 123; óleo de milho, 82; chocolate, 88; biscoito de milho, 176; e vitaminas e minerais.

- DH2 – ração padrão, 439; amendoins torrados, 218; caseína, 129; óleo de milho, 61; batata frita, 153; e vitaminas e minerais.

- DH3 – ração padrão, 371; amendoins torrados, 185; caseína, 99; óleo de milho, 68; macarrão, 185; queijo ralado, 92; e vitaminas e minerais.

- DH4 – ração padrão, 359; amendoins torrados, 179; caseína, 105; óleo de milho, 80; leite condensado, 161; bolacha wafer, 116; e vitaminas e minerais.

A composição de macronutrientes das rações padrão e experimentais hipercalóricas-hiperlipídicas, produzidas e analisadas em laboratório pela empresa Rhoster®, Araçoiaba da Serra – SP, está apresentada no quadro 1.

Quadro 1 – Composição das dietas padrão e experimentais

Componentes	Rações				
	Padrão	DH1	DH2	DH3	DH4
Proteína (%)	26	27	28	28	26
Carboidrato (%)	54	43	36	33	43
Gordura (%)	3	20	23	24	20
Outros (%) [*]	17	10	13	15	11
Calorias (Kcal/g)	3,5	4,6	4,6	4,6	4,6

*

- vitaminas, minerais, umidade, cinzas.

5.5. Curva de peso e consumo de ração

A pesagem realizar-se-á duas vezes por semana, em dias pré-estabelecidos, tão logo se inicie o período claro, com balança apropriada

(Filizola BP-6), de precisão, e a anotação do peso de cada animal será feita em gramas. O consumo de ração será anotado três vezes por semana, em dias pré-determinados, calculando-se em cada gaiola a diferença dos pesos das rações ofertada e consumida, fazendo-se o cálculo aritmético da estimativa diária do consumo de ração, em gramas. As curvas de peso e consumo de ração serão realizadas em todos os grupos, durante todo o experimento.

5.6. Anestesia, pesagem e antibioticoprofilaxia

Antes do início da anestesia, todos os animais serão pesados em balança de precisão (Filizola BP-6) e os respectivos pesos anotados em gramas. Em todos os grupos (GI, GS e GC) será realizada anestesia geral com halotano para a realização da coleta de sangue da cauda e em seguida anestesia geral dissociativa, para a realização do teste de tolerância insulínica e intervenções cirúrgicas, 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 intramuscular¹⁷⁰.

Cada 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. Constatando-se reaparecimento desses reflexos, será feita complementação anestésica com um terço da dose inicial. Ao término da intervenção cirúrgica, será anotada a quantidade total de anestésicos utilizada.

A antibiótico-profilaxia será realizada com cefoxitina na dose de 50 mg/kg de peso, por via intramuscular, logo depois de anestesiados para a cirurgia.

5.7. Procedimentos operatórios

Nos dias determinados, com 20 semanas de vida (S20), dois ratos serão separados e aleatoriamente distribuído no GI. Adotar-se-ão todos os princípios de assepsia e antisepsia de Halsted, utilizando-se instrumental micro-cirúrgico estéril.

Os animais anestesiados serão posicionados em decúbito dorsal horizontal na mesa cirúrgica, com as patas e a cauda devidamente

imobilizadas, atadas com esparadrapo. A antisepsia da região abdominal será feita com clorhexidine 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 5 cm de extensão, utilizando-se bisturi descartável de lâmina número quinze.

No animal componente do GI, o ceco será identificado e exposto, juntamente com o íleo terminal. A seguir, o intestino delgado será seccionado perpendicularmente na região distante 5 cm da transição íleo-cecal e na região distante 15 cm da transição íleo-cecal, separando-se, dessa forma, um segmento ileal de 10 cm, o qual será envolto em gaze umedecida com solução de cloreto de sódio a 0,9%, aquecida (Figura 6A). Em seguida o jejuno será seccionado na região distante 5 cm da transição duodeno-jejunal (Figura 6A). O segmento do íleo distal anteriormente separado será interposto aos segmentos do jejuno seccionado, em posição isoperistáltica, por entero-enteroanastomose (Figura 6B). Em seguida, será realizada a anastomose dos segmentos do íleo interposto e do íleo remanescente, de forma a ser restabelecida a continuidade do tubo digestório (Figura 6C).

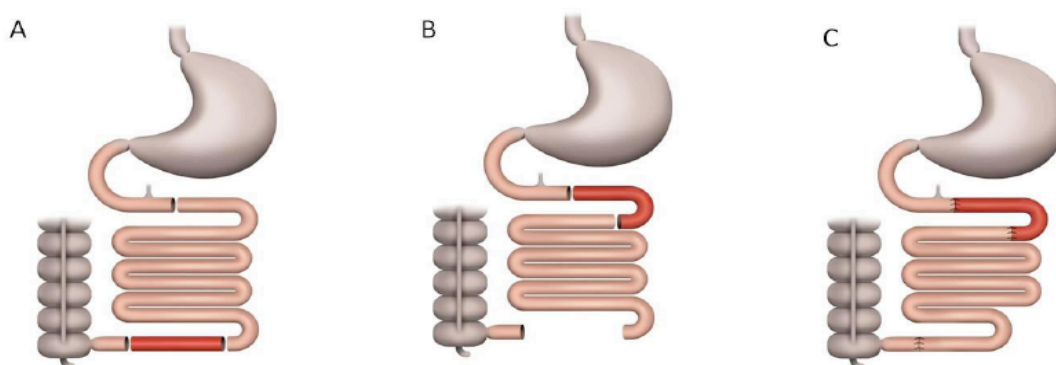


Figura 6 – Esquema demonstrativo das regiões de secção e anastomose do Grupo Interposição. (A) Secção jejunal e do segmento ileal isolado (em vermelho) a ser interposto. (B) Íleo interposto ao jejuno. (C) Anastomoses.

No animal componente do GC, não será realizada nenhuma intervenção cirúrgica (Figura 7C).

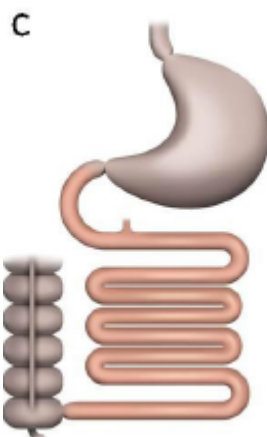


Figura 7 – Esquema demonstrativo da região do Grupo Controle. (C) Grupo Controle, sem intervenções.

Todas as anastomoses intestinais serão terminoterminais e realizadas com 6 pontos totais separados, utilizando-se fios de polipropileno 7-0 pré-montados em agulha cilíndrica.

Após a revisão final, terminado o ato cirúrgico, os animais serão hidratados com 1,0 mL de solução cristalóide (soro fisiológico a 0,9%) para cada 300g de peso, na temperatura de 36°C, via intraperitoneal.

A síntese da parede abdominal será realizada 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 com pontos invertidos, utilizando-se fio de poliglactina 4-0 pré-montado em agulha cilíndrica.

5.8. Evolução pós-operatória

Os animais serão mantidos aquecidos e em observação até a recuperação completa da anestesia, quando então serão colocados em gaiolas individuais e encaminhados para a sala de albergue, no mesmo laboratório, sob as mesmas condições ambientais pré-operatórias.

Antes da recuperação anestésica, os animais receberão analgesia com 0,5 mL da solução de 3 g de dipirona diluídos em 1 mL de água, por gavagem. Será reintroduzida água ad libitum tão logo haja recuperação anestésica. Durante as primeiras 72 horas seguintes de pós-operatório, serão mantidos com 1 g de dipirona diluído em 100 mL de água. O acesso à dieta será permitido após 12 horas do término da cirurgia.

Os animais serão avaliados e acompanhados até a 08^a semana do pós-operatório, ou seja, a 28^a semana de vida (S28), período equivalente a 5 anos de pós-operatório na espécie humana¹⁷⁵.

5.9. Eutanásia

Na 28^a semana de vida serão realizados os mesmos procedimentos de jejum, anestesia, pesagem e coleta de sangue para testes laboratoriais e, em seguida, será efetuada a eutanásia pela técnica de decapitação, conforme orientações da Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório / Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – SBCAL-COBEA.

5.10. Parâmetros de estudo

- **Peso Corporal:** tão logo se inicie o ciclo claro, o peso de cada animal de cada um dos grupos (GI, GC) será aferido em balança de precisão e devidamente anotado em gramas (P1, P2, P3, .., P32).
- **Consumo de Ração:** todos os animais receberão diuturnamente ração em quantidade conhecida e suficiente para as suas necessidades diárias; três vezes por semana, a ração não ingerida será pesada em balança apropriada e, por meio da diferença entre o que foi fornecido e a sobra de ração, será calculado o consumo alimentar diário.
- **Composição Corporal:** no dia da eutanásia serão coletados e pesados em balança de precisão os depósitos de gordura Peri-epididimal e retroperitoneal de todos os animais de cada grupo; o índice de adiposidade será calculado através de proporção, considerando-se o peso corporal de cada animal.
- **Exames Bioquímicos:** serão feitas, em todos os animais, as determinações séricas de glicose (GLI), insulina (INS), assim como de glucagon-like peptide-1 (GLP-1), peptídeo C (PTC) e hemoglobina glicada (HBG), nas ocasiões da cirurgia

(20^a semana de vida) e da eutanásia (28^a semana de vida), denominados, respectivamente, tempos 1 e 2.

– Resistência Insulínica: será feito o cálculo da resistência insulínica (RI) pelo teste indireto HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment Insulin Resistance), calculado pelo produto da insulina sérica (mU/mL), da glicemia (mg/mL) e da constante 0,05551, dividido por 22,5; nos tempos 1 e 2, anteriormente enunciados.

– Teste de Tolerância à Insulina (TTI): será realizado em todos os animais do procedimento experimental, na ocasião do início do mesmo, da cirurgia e da eutanásia, ditos tempos 1 e 2; a velocidade de desaparecimento da glicose será calculada pela fórmula $\ln 2/t_{1/2}$; o $t_{1/2}$ da glicose será calculado a partir da inclinação da curva de regressão mínima durante a fase linear de declínio da concentração plasmática de glicose, com a utilização do software PRISMA.

5.11. Coleta do tecido

Após a eutanásia, serão coletados os seguintes fragmentos de tecidos intestinais para análise por imunohistoquímica. microespectroscopia no infravermelho e de fluorescência resolvida no tempo:

- Grupo Interposição: segmento mediano de íleo transposto (Figura 8A).
- Grupo Controle: segmento de íleo e segmento de jejuno (Figura 8B).

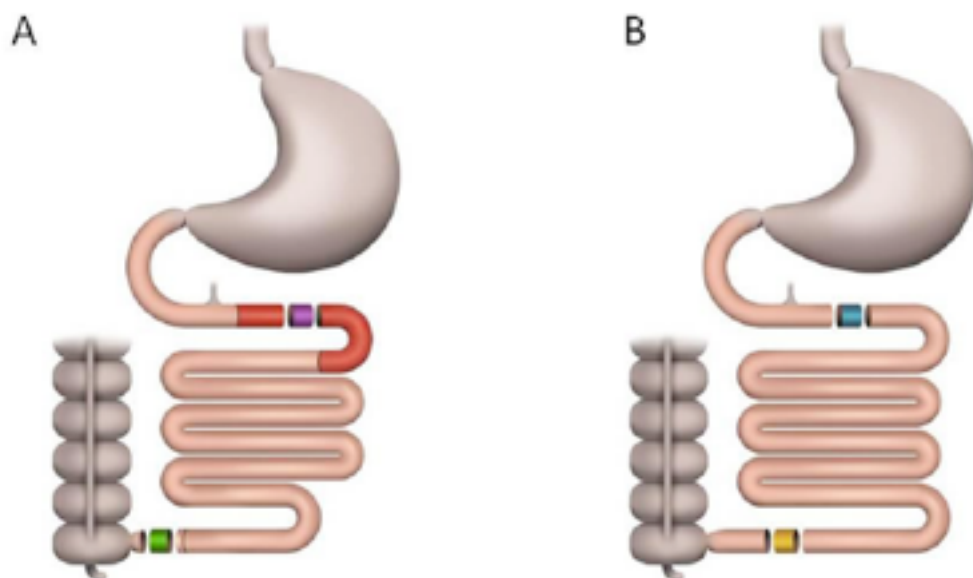


Figura 8 - Esquema demonstrativo das coletas de tecidos para análise. (A) Grupo Interposição: segmento mediano (em lilás) de íleo anteriormente transposto (em verde). (B) Grupo Controle: segmento de jejuno (em azul) e de íleo (em amarelo) em suas localizações normais.

5.12. Preparação das amostras para as técnicas de espectroscopia

Serão utilizadas, neste estudo, cortes histológicos de 10 μ m parafinados, justapostos aos cortes de imunohistoquímica, sendo um corte para imunohistoquímica, um para fluorescência e o terceiro para infravermelho (FTIR) cujo procedimento de preparo das amostras para análise por essa técnica será explicado posteriormente. Isto em replicada de cada amostra, num total de 10 amostras por grupo (mais de 20 ratos).

As amostras para imunohistoquímica e fluorescência serão depositadas sobre uma lâmina de vidro e cobertas por uma lamínula e as amostras para infravermelho serão depositadas sobre uma janela de CaF₂ com 2,54cm de diâmetro.

Abaixo seguem protocolos para o preparo das amostras a serem analisadas por meio da espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo.

5.12.1. Protocolo para HE

As lâminas serão coradas com hematoxilina-eosina para análise morfológica do intestino, em todos os segmentos ressecados. Serão utilizados anticorpos específicos para estudo imuno-histoquímico:

- Anticorpo sc7782 Anti-GLP-1, Clone C-17, da empresa Santa Cruz Biotechnology, em diluição de 1:500.

- Anticorpo Monoclonal anti-Rat para avaliar células em proliferação Ki67, Clone MIB-5, Código: M7248-1, Marca Dako.

5.12.2. Protocolo para imunohistoquímica

Os segmentos intestinais ressecados de cada animal, destinados à avaliação por meio de espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo, serão abertos em sua porção contra- mesentérica e cuidadosamente lavados com soro fisiológico. A seguir, serão dispostos sobre um fragmento de papel filtro, mantendo contato direto com a serosa e ficando a face mucosa voltada para cima. Posteriormente, serão colocados em um frasco de boca larga em formaldeído tamponado a 10% por 12 horas, em quantidade de 10 vezes superior ao volume tecidual, permanecendo a face mucosa em contato direto com a solução. Em seguida, serão processados para inclusão em parafina. Os cortes histológicos serão obtidos em micrótomo do tipo Minot regulado para a espessura de 5 mm e colocados em lâminas previamente tratadas com silano 5%, utilizando-se o perímetro interno da peça.

As lâminas com os fragmentos intestinais seguirão para estudo imunohistoquímico com dupla marcação antigênica, utilizando o KIT: LSAB. A visualização basear-se-á na peroxidase (HRP) utilizando como cromógeno o DAB+.

Tem-se o seguinte protocolo para os cortes histológicos:

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) incubação do anticorpo primário: os cortes histológicos de cada lâmina serão incubados com anticorpo primário - SC-9168 para marcação das células produtoras de insulina no caso do tecido pancreático, e SC-7782 para marcação das células L no caso do tecido intestinal - , 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 LSAB para os tecidos intestinais, 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) bloqueio da dupla marcação: os cortes dos tecidos intestinal serão cobertos com a solução de bloqueio de dupla marcação por 3 minutos e, em seguida, serão lavados com tampão PBS e cobertos com a solução de bloqueio de enzimas endógenas do Kit Dako EnVision, novamente lavados com tampão PBS;

j) incubação do segundo anticorpo primário: os cortes histológicos de cada lâmina dos tecidos intestinais serão incubados com o segundo anticorpo

primário – M7248–1, para avaliar as células em proliferação , diluídos em PBS + BSA 1%, em titulação pré–estabelecida pelo fornecedor, e deixadas em câmara úmida a 40C de 16 a 18 horas e, na seqüência, serão lavadas em PBS pH 7,4 por 3 vezes;

k) ligação do segundo anticorpo secundário: os cortes dos tecidos intestinais serão incubados com o segundo anticorpo secundário, conjugado 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 fosfatase alcalina) do Kit Dako por 30 minutos e, em seguida, serão lavadas com tampão PBS, pH 7,4 por três vezes;

l) revelação: os cortes serão cobertos com solução de cromógeno Permanent Red por 20 minutos;

m) contracoloração: os cortes serão lavados em água corrente por 5 minutos e, em seguida, contracorados com hematoxilina de Harris por 20 segundos;

n) 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.

Serão utilizados como controles positivos internos das reações imunohistoquímicas para os respectivos marcadores os cortes histológicos do íleo terminal de um animal do grupo controle, conforme o caso. Os controles negativos serão obtidos com a omissão do respectivo anticorpo primário em cortes histológicos de lâminas semelhantes.

Será adotado como padrão de positividade, no estudo do tecido intestinal, o aparecimento de coloração marrom acastanhada. A imunexpressão 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.

5.12.3. Protocolo para 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.

5.12.4. Análise através de espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo

Os padrões característicos das células L, e de outras células de interesse será avaliada utilizando um sistema de fluorescência acoplada a um microscópio invertido modelo MicroTime200 (PicoQuant, Berlin, Germany). Neste microscópio a excitação pode ser realizada desde 375nm a 900nm, com a possibilidade de determinar a intensidade da fluorescência e seu tempo de vida com resolução de picosegundos. A resolução espacial alcançada por este sistema esta no limite da difração, sendo de aproximadamente 0,5µm.

Para as amostras de tecidos serão obtidos imagens de tempos de vida e intensidades da fluorescência emitida pelas células e tecidos quando estes forem excitados por 375 e 420nm. Estas imagens de tempos de vida e intensidade serão utilizadas para comparação com as imagens de imunohistoquímica.

5.13. Análise mediante espectroscopia no infravermelho médio

A análise por microespectroscopia no infravermelho será realizada com um espectrômetro acoplado ao microscópio (Spotlight 400 FT-IR, PerkinElmer, USA) que permite determinar espectros de absorção pelo modo de transmissão de cortes histológicos com resolução espacial de 5µm sobre a região espectral de 4000–400cm⁻¹. Este equipamento pertence ao laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica, sob responsabilidade do Prof. Airton Abrahão Martin.

Após a aquisição das imagens de microespectroscopia serão identificados as bandas pertencentes ao espectro de absorção e suas respectivas faixas espectrais. Após a normalização vetorial dos espectros e remoção do “background” as bandas de absorção serão identificadas e associadas às ligações químicas correspondentes e sua estrutura biológica. A área sob as bandas

será calculada e estes valores serão utilizados para elaborar imagens as quais serão comparadas com a imagem gerada por imunohistoquímica.

Abaixo seguem protocolos para o preparo das amostras a serem analisadas por meio da espectroscopia no infravermelho.

5.13.1 Protocolo para criogenia

As amostras deverão ser:

- lavadas em soro fisiológico;
- colocadas em tubo Nalgene;
- resfriadas no N₂;
- armazenadas para depois serem transportadas até o LEVB local onde se realizarão os testes.

Depois iremos fazer slices de ~5 a 10 microns dos tecidos biológicos utilizando um criomicrotomo. Esses slices serão colocadas em janelas de CaF₂ e não podem ser coradas. Depois deste procedimento utilizaremos um liofilizador para remoção de água.

5.14. Análise estatística

O espectro obtido por meio de técnicas vibracionais como a espectroscopia no infravermelho, na maioria das vezes possui bandas de absorção que se apresentam sobrepostas e com intensidades variadas. Tais características dificultam uma análise visual direta, bem como o cálculo de parâmetros (área, posição e largura das bandas) ou o emprego de técnicas de diferenciação estatística como Análise de Cluster, Análise de Componentes Principais e Análise de Razões.

Dessa forma, o pré-processamento dos espectros de absorção obtidos é de grande valia, pois fornece novas possibilidades de análise para alcançar a diferenciação das amostras/grupos pelos métodos estatísticos mencionados.

É esperado que haja um melhor desempenho dos espectros pré-processados quando estes forem utilizados para o cálculo de diferenciação, comparado ao desempenho dos mesmo espectros sem pré-processamento. Entre as técnicas de pré-processamento mais utilizadas podem-se citar:

i) Deconvolução das bandas de absorção;²⁰¹

ii) Cálculo da área, posição e largura das bandas através de diferentes métodos estatísticos;²⁰²

iii) Modelagem de espectros.^{203,204}

5.14.1 Métodos de Processamento dos dados para classificação de grupos

Existem situações em que o objeto de interesse é reconhecer padrões em grandes conjuntos de dados e concluir sobre estes padrões com base nas características da amostra. Quando o tamanho da amostra ou mesmo o número de amostras é grande, fica relativamente difícil criar associações entre as diversas variáveis de estudo, de modo que se faz necessária uma representação simples e compacta da informação por meio da abstração de dados. Algoritmos de “Clustering” são ideais para o agrupamento dos dados, enquanto os de PCA fornecem uma ferramenta para abstração e interpretação daqueles.

5.14.2 Análise de Cluster (AC)

A Análise Cluster é uma técnica de análise multivariada que engloba diferentes algoritmos de classificação para organizar informações sobre variáveis e formar grupos homogêneos. Pretende-se apenas organizar os dados em grupos lógicos e não avaliar ou resumir-los. É muito útil quando há necessidade de organizar os dados observados em grupos com significados físicos diferentes, sendo utilizada mesmo quando ainda não se tem hipóteses a serem testadas a priori. 0,40cm

Em resumo, o objetivo desta análise é descobrir agrupamentos naturais de variáveis em sucessivos clusters cada vez maiores, usando medidas de similaridade ou distância. Neste processo iterativo, o algoritmo trabalha até colocar todos os itens em um só grande grupo, sempre relaxando cada vez mais o critério de similaridade, gerando assim uma árvore hierárquica.^{205,206}

Para aplicar esta metodologia de análise deve-se, primeiro, desenvolver uma escala quantitativa para medir a associação (similaridade) entre objetos e depois proceder ao agrupamento propriamente dito. Na maioria dos casos, a AC é uma análise complementar a outros métodos multivariados, como a Análise de Componentes Principais (PCA) ou a Otimização de Razões (OR).

5.14.3 Análise de Componentes Principais (PCA)

A Análise de Componentes Principais é uma metodologia de identificação de padrões em grupos de dados, expressando-os de modo a enfatizar tendências. A vantagem principal desta metodologia é que quando os padrões são encontrados, os dados passam a ter um número reduzido de dimensões, facilitando sua interpretação. Como os cálculos desta técnica são baseados em análises de covariância, os dados trabalhados apresentam uma perda relativamente pequena de informação.²⁰⁷ Note-se então que a meta da PCA é resumir os dados coletados em tendências ou características específicas, diferentemente das técnicas de AC. São estes valores de tendência que fornecerão as informações sobre os padrões no conjunto de dados: o autovetor (do grupo de dados) que possuir maior autovalor será o componente principal (ou tendência principal); o autovetor que apresentar o segundo maior autovalor será o componente secundário (ou tendência secundária); e assim por diante com os componentes terciários, quaternários, etc. Quanto mais componentes forem considerados, mais detalhada fica a análise do conjunto de dados. É comum ordenar os autovetores em ordem de significância (com base nos autovalores).

5.14.4 Otimização de Razões (OR)

O espectro de absorção na região espectral do infravermelho próximo ($4000 - 400\text{cm}^{-1}$) é composto por bandas de absorção provenientes de ligações covalentes que apresentam vibrações moleculares que são ativas para a espectroscopia por FTIR. A diferenciação de grupos de amostras através da Otimização de Razões das áreas sob as bandas de absorção foi desenvolvida recentemente pelo Grupo de Fotobiofísica da FFCLRP/USP para a diferenciação de linhagens celulares.¹⁹⁸ A utilização do método de OR consiste no cálculo de

todas as características espectroscópicas das bandas de absorção, tais como área, posição e largura, e consequente cálculo de todas as razões matematicamente possíveis entre uma mesma amostra. Estas razões medirão a composição relativa dos diferentes compostos bioquímicos presentes na amostra. Extrapolando para todas as amostras do grupo e para outros grupos de amostras onde se tenha o interesse de diferenciar, é possível obter índices (razões de áreas, razões de posições ou razões entre larguras das bandas) que possam ser utilizados para agrupar amostras com características espectroscópicas similares e diferenciar grupos com características bioquímicas singulares.

6. Cronograma

Tempo	Jul a Dez/11	Jan a Jun/12	Jul a Dez/12	Jan a Jun/13	Jul a Dez/13
Pesquisa Bibliográfica	XXXX			XXXX	XXXX
Elaboração de Projeto	XXXX				
Pré-Teste (Piloto)		XXXX			
Proced. Cirúrgicos		XXXX			
Coleta de Dados			XXXX		
Tabulação de Dados			XXXX		
Análise dos Dados				XXXX	
Relatório de Pesquisa			XXXX		XXXX
Conclusão da Pesquisa					XXXX

7. Orçamento

QUADRO GERAL DO ORÇAMENTO	
Item	Valores
Espectroscopia Infravermelho	US\$ 37.928,20 + R\$ 6.194,61
Histologia HE e Imunohistoquímica	R\$ 9.451,00
	US\$ 600 + R\$ 7.605,00
Custos Diversos	
TOTAL	

11. Turner R, Holman R. Lessons from UK prospective diabetes study. *Diabetes Res Clin Pr.* 1995;28:S151-S7.
12. Hemmingsen B, Lund S, Gluud C, Vaag A, Almdal T, Hemmingsen C, et al. Targeting intensive glycaemic control versus targeting conventional glycaemic control for type 2 diabetes mellitus. *Cochrane database of systematic reviews (Online).* 2011;6:CD008143.
13. Hossain P, Kavar B, El Nahas M. Obesity and diabetes in the developing world—a growing challenge. *New Engl J Med.* 2007;356(3):213.
14. Mokdad AH, Ford ES, Bowman BA, Dietz WH, Vinicor F, Bales VS, et al. Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001. *JAMA: J Amer Med Assoc.* 2003;289(1):76.
15. Freeman JS. New therapeutic options: management strategies to optimize glycemic control. *J Am Osteopath Assoc.* 2010;110(3 Supplement 2):S15.
16. Blonde L. Current antihyperglycemic treatment guidelines and algorithms for patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Med.* 2010;123(3):S12-S8.
17. Stolar MW, Hoogwerf BJ, Boyle PJ, Gorshow SM, Wales D. Managing type 2 diabetes: going beyond glycemic control. *JManag Care Pharm.* 2008;14(5).
18. Krentz AJ, Patel MB, Bailey CJ. New drugs for type 2 diabetes mellitus: what is their place in therapy? *Drugs.* 2008;68(15):2131-62.
19. VanDeKoppel S, Choe H, Sweet B. Managed care perspective on three new agents for type 2 diabetes. *J Manag Care Pharm.* 2008;14(4):363.
20. Vinik A. Advancing therapy in type 2 diabetes mellitus with early, comprehensive progression from oral agents to insulin therapy. *Clin Ther.* 2007;29(6):1236-53.
21. Del Prato S. Unlocking the opportunity of tight glycaemic control. *DiabObes Metab.* 2005;7:S1-S4.
22. Fleury-Milfort E. Practical strategies to improve treatment of type 2 diabetes. *J Am Acad Nurse Prac.* 2008;20(6):295-304.
23. Liebl A. Challenges in optimal metabolic control of diabetes. *Diabetes-Metab Res.* 2002;18(S3):S36-S41.
24. Kunt T, Snoek F. Barriers to insulin initiation and intensification and how to overcome them. *Int J Clin Pract.* 2009;63:6-10.
25. Heinemann L. Overcoming obstacles: new management options. *Eur JEndocrinol.* 2004;151(Suppl_2):T23.
26. Brunton S. Beyond glycemic control: treating the entire type 2 diabetes disorder. *Postgrad Med.* 2009;121(5):68.
27. PETERS AL. Patient and treatment perspectives: Revisiting the link between type 2 diabetes, weight gain, and cardiovascular risk. *Clev Clin J Med.* 2009;76(Suppl 5):S20.
28. Hansen KB, Vilsbøll T, Knop FK. Incretin mimetics: a novel therapeutic option for patients with type 2 diabetes—a review. *Diabetes Metab Syndr Obes: targets and therapy.* 2010;3:155.
29. Czupryniak L, Wiszniewski M, Szymański D, Pawowski M, Loba J, Strzelczyk J. Long-term results of gastric bypass surgery in morbidly obese Type 1 diabetes patients. *Obes Surg.* 2010;20(4):506-8.
30. Rubino F, Gagner M. Potential of surgery for curing type 2 diabetes mellitus. *Ann Surg.* 2002;236(5):554.
31. Buchwald H, Avidor Y, Braunwald E. Bariatric Surgery: A Systematic Review. *Jama.* 2004;292(14):1724-37.
32. Santry HP, Gillen DL, Lauderdale DS. Trends in bariatric surgical procedures. *Jama.* 2005;294(15):1909.
33. van de Sande-Lee S, Pereira FRS, Cintra DE, Fernandes PT, Cardoso AR, Garlipp CR, et al. Partial Reversibility of Hypothalamic Dysfunction and

- Changes in Brain Activity After Body Mass Reduction in Obese Subjects. *Diabetes*. 2011;60(6):1699.
34. Meijer RI, van Wagensveld BA, Siegert CE, Eringa EC, Serne EH, Smulders YM. Bariatric surgery as a novel treatment for type 2 diabetes mellitus: a systematic review. *ArchSurg*. 2011;146(6):744.
 35. Pories WJ, Swanson MS, MacDonald KG, Long SB, Morris PG, Brown BM, et al. Who would have thought it? An operation proves to be the most effective therapy for adult-onset diabetes mellitus. *Ann Surg*. 1995;222(3):339.
 36. Rubino F, Gagner M, Gentileschi P, Kini S, Fukuyama S, Feng J, et al. The early effect of the Roux-en-Y gastric bypass on hormones involved in body weight regulation and glucose metabolism. *Ann Surg*. 2004;240(2):236.
 37. Reinehr T, Roth CL, Scherthaner GH, Kopp HP, Kriwanek S, Scherthaner G. Peptide YY and glucagon-like peptide-1 in morbidly obese patients before and after surgically induced weight loss. *Obes Surg*. 2007;17(12):1571-7.
 38. 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-Endoc M*. 2005;288(2):E447.
 39. Näslund E, Hellström PM, Kral JG. The gut and food intake: an update for surgeons. *Journal of Gastrointestinal Surgery*. 2001;5(5):556-67.
 40. Van Citters GW, Lin HC. The ileal brake: a fifteen-year progress report. *CurrGastroenterolRep*. 1999;1(5):404-9.
 41. Hickey MS, Pories WJ, MacDonald Jr KG, Cory KA, Dohm GL, Swanson MS, et al. A new paradigm for type 2 diabetes mellitus: could it be a disease of the foregut? *Ann Surg*. 1998;227(5):637.
 42. Santoro S. Is the metabolic syndrome a disease of the foregut? Yes, excessive foregut. *Ann Surg*. 2008;247(6):1074.
 43. Dhanvantari S, Seidah NG, Brubaker PL. Role of prohormone convertases in the tissue-specific processing of proglucagon. *Mol Endocrinol*. 1996;10(4):342.
 44. Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology*. 2007;132(6):2131-57.
 45. Holst JJ. The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol Rev*. 2007;87(4):1409.
 46. Drucker DJ. Glucagon-like peptides: regulators of cell proliferation, differentiation, and apoptosis. *Molecular Endocrinology*. 2003;17(2):161.
 47. Pournaras DJ, Le Roux CW. Obesity, gut hormones, and bariatric surgery. *World J Surg*. 2009;33(10):1983-8.
 48. 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. *Ann Surg*. 2004;239(1):1.
 49. Melissas J. IFSO guidelines for safety, quality, and excellence in bariatric surgery. *Obes Surg*. 2008;18(5):497-500.
 50. Laferrere B, Teixeira J, McGinty J, Tran H, Egger JR, Colarusso A, 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 Endocr Metab*. 2008;93(7):2479.
 51. Koopmans H, Sclafani A, Fichtner C, Aravich P. The effects of ileal transposition on food intake and body weight loss in VMH-obese rats. *The Am J Clin Nutr*. 1982;35(2):284.
 52. Strader AD. Ileal transposition provides insight into the effectiveness of gastric bypass surgery. *Physiol Behav*. 2006;88(3):277-82.

53. Ferri GL, Koopmans H, Ghatei M, Vezzadini P, Labo G, Bloom S, et al. Heal Enteroglucagon Cells after Ileal–Duodenal Transposition in the Rat. *Digestion*. 1983;26(1):10–6.
54. Sarson D, Scopinaro N, Bloom S. Gut hormone changes after jejunoileal (JIB) or biliopancreatic (BPB) bypass surgery for morbid obesity. *Int J Obesity*. 1981;5(5):471.
55. Näslund E, Backman L, Juul Holst J, Theodorsson E, Hellström PM. Importance of small bowel peptides for the improved glucose metabolism 20 years after jejunoileal bypass for obesity. *Obes Surg*. 1998;8(3):253–60.
56. Mason EE. Iliac transposition and enteroglucagon/GLP–1 in obesity (and diabetic?) surgery. *Obes Surg*. 1999;9(3):223–8.
57. De Luis D, Pacheco D, Izaola O, Romero A, Marcos J, Pelaz J, et al. Early clinical and surgical results of biliopancreatic diversion. *Obes Surg*. 2005;15(6):799–802.
58. Wickremesekera K, Miller G, Naotunne TDS, Knowles G, Stubbs RS. Loss of insulin resistance after Roux–en–Y gastric bypass surgery: a time course study. *Obes Surg*. 2005;15(4):474–81.
59. Schauer PR, Burguera B, Ikramuddin S, Cottam D, Gourash W, Hamad G, et al. Effect of laparoscopic Roux–en Y gastric bypass on type 2 diabetes mellitus. *Ann Surg*. 2003;238(4):467.
60. Weber M, Müller MK, Bucher T, Wildi S, Dindo D, Horber F, et al. Laparoscopic gastric bypass is superior to laparoscopic gastric banding for treatment of morbid obesity. *Ann Surg*. 2004;240(6):975.
61. Scopinaro N, Marinari GM, Camerini GB, Papadia FS, Adami GF. Specific effects of biliopancreatic diversion on the major components of metabolic syndrome. *Diabetes Care*. 2005;28(10):2406.
62. Cohen R, Uzzan B, Bihan H, Khochtali I, Reach G, Catheline JM. Ghrelin levels and sleeve gastrectomy in super–super–obesity. *Obes Surg*. 2005;15(10):1501–2.
63. Bohdjalian A, Langer FB, Shakeri–Leidenmühler S, Gfrerer L, Ludvik B, Zacherl J, et al. Sleeve gastrectomy as sole and definitive bariatric procedure: 5–year results for weight loss and ghrelin. *Obes Surg*. 2010;20(5):535–40.
64. Vidal J, Ibarzabal A, Romero F, Delgado S, Momblán D, Flores L, et al. Type 2 diabetes mellitus and the metabolic syndrome following sleeve gastrectomy in severely obese subjects. *Obes Surg*. 2008;18(9):1077–82.
65. Melissas J, Daskalakis M, Koukouraki S, Askoxylakis I, Metaxari M, Dimitriadis E, et al. Sleeve gastrectomy—a “food limiting” operation. *Obes Surg*. 2008;18(10):1251–6.
66. Braghetto I, Davanzo C, Korn O, Csendes A, Valladares H, Herrera E, et al. Scintigraphic evaluation of gastric emptying in obese patients submitted to sleeve gastrectomy compared to normal subjects. *Obes Surg*. 2009;19(11):1515–21.
67. De Paula AL, Stival AR, Macedo A, Ribamar J, Mancini M, Halpern A, et al. Prospective randomized controlled trial comparing 2 versions of laparoscopic ileal interposition associated with sleeve gastrectomy for patients with type 2 diabetes with BMI 21–34 kg/m². *Surg Obes Relat Dis*. 2010;6(3):296–304.
68. 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.
69. DePaula AL, Macedo ALV, Schraibman V, Mota B, Vencio S. Hormonal evaluation following laparoscopic treatment of type 2 diabetes mellitus patients with BMI 20–34. *Surg Endosc*. 2009;23(8):1724–32.
70. DePaula A, Macedo ALV, Mota B, 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.* 2009;23(6):1313–20.
71. DePaula A, Macedo ALV, Rassi N, Vencio S, Machado C, Mota B, et al. Laparoscopic treatment of metabolic syndrome in patients with type 2 diabetes mellitus. *Surg Endosc.* 2008;22(12):2670–8.
72. Tinoco A, El-Kadre L, Aquiar L, Tinoco R, Savassi-Rocha P. Short-term and mid-term control of type 2 diabetes mellitus by laparoscopic sleeve gastrectomy with ileal interposition. *World J Surg.* 2011.
73. Koopmans H, Sclafani A. Control of body weight by lower gut signals. *Int J Obesity.* 1981;5(5):491.
74. Smithy W, Cuadros C, Johnson H, Kral J. Effects of ileal interposition on body weight and intestinal morphology in dogs. *Int J Obesity.* 1986;10(6):453.
75. Kotler DP, Koopmans H. Preservation of intestinal structure and function despite weight loss produced by ileal transposition in rats. *Physiol Behav.* 1984;32(3):423–7.
76. Chu KU, Tsuchiya T, Ishizuka J, Uchida T, Townsend Jr CM, Thompson JC. Trophic response of gut and pancreas after ileojejunal transposition. *Ann Surg.* 1995;221(3):249.
77. Tsuchiya T, Ishizuka J, Sato K, Shimoda I, Rajaraman S, Uchida T, et al. Effect of ileo-jejunal transposition on the growth of the GI tract and pancreas in young and aged rats. *J Gerontol A-Biol.* 1995;50(3):M155.
78. Menge H, Robinson J. Functional and structural characteristics of the rat intestinal mucosa following ileo-jejunal transposition. *Acta Hepato-Gastro.* 1978;25(2):150.
79. Patrity A, Facchiano E, Annetti C, Aisa MC, Galli F, Fanelli C, et al. Early improvement of glucose tolerance after ileal transposition in a non-obese type 2 diabetes rat model. *Obes Surg.* 2005;15(9):1258–64.
80. 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-Endoc M.* 2005;288(2):E447.
81. Patrity A, Aisa MC, Annetti C, Sidoni A, Galli F, Ferri I, et al. 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(1):74–85.
82. Pannacciulli N, Le DSNT, Salbe AD, Chen K, Reiman EM, Tataranni PA, et al. Postprandial glucagon-like peptide-1 (GLP-1) response is positively associated with changes in neuronal activity of brain areas implicated in satiety and food intake regulation in humans. *Neuroimage.* 2007;35(2):511–7.
83. Meier J, Gethmann A, Götze O, Gallwitz B, Holst J, Schmidt W, et al. Glucagon-like peptide 1 abolishes the postprandial rise in triglyceride concentrations and lowers levels of non-esterified fatty acids in humans. *Diabetologia.* 2006;49(3):452–8.
84. Nagell CF, Wettergren A, Ørskov C, Holst JJ. Inhibitory effect of GLP-1 on gastric motility persists after vagal deafferentation in pigs. *Scand J Gastroentero.* 2006;41(6):667–72.
85. Tolessa T, Gutniak M, Holst JJ, Efendic S, Hellström PM. Inhibitory effect of glucagon-like peptide-1 on small bowel motility. Fasting but not fed motility inhibited via nitric oxide independently of insulin and somatostatin. *J Clin Invest.* 1998;102(4):764.
86. Farilla L, Hui H, Bertolotto C, Kang E, Bulotta A, Di Mario U, et al. Glucagon-like peptide-1 promotes islet cell growth and inhibits apoptosis in Zucker diabetic rats. *Endocrinology.* 2002;143(11):4397.
87. Farilla L, Bulotta A, Hirshberg B, Li Calzi S, Khoury N, Noushmehr H, et al. Glucagon-like peptide 1 inhibits cell apoptosis and improves glucose

- responsiveness of freshly isolated human islets. *Endocrinology*. 2003;144(12): 5149.
88. Valverde I, Puente J, Martín-Duce A, Molina L, Lozano O, Sancho V, et al. Changes in glucagon-like peptide-1 (GLP-1) secretion after biliopancreatic diversion or vertical banded gastroplasty in obese subjects. *Obes Surg*. 2005;15(3):387-97.
89. 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.
90. Cummings DE, Shannon MH. Ghrelin and gastric bypass: is there a hormonal contribution to surgical weight loss? *J Clin Endocr Metab*. 2003;88(7): 2999.
91. Strader AD, Woods SC. Gastrointestinal hormones and food intake. *Gastroenterology*. 2005;128(1):175-91.
92. Strader AD, Clausen TR, Goodin SZ, Wendt D. Ileal interposition improves glucose tolerance in low dose streptozotocin-treated diabetic and euglycemic rats. *Obes Surg*. 2009;19(1):96-104.
93. Baksheev L, Fuller PJ. Gene expression in the adapting small bowel after massive small bowel resection. *J Gastroenterol*. 2006;41(11):1041-52.
94. Thomson A, Wild G. Adaptation of Intestinal Nutrient Transport in Health and Disease (Part I). *Digest Dis Sci*. 1997;42(3):453-69.
95. Thomson A, Wild G. Adaptation of Intestinal Nutrient Transport in Health and Disease (Part II). *Digest Dis Sci*. 1997;42(3):470-88.
96. Ferraris RP, Carey HV. Intestinal transport during fasting and malnutrition. *Annu Rev Nutr*. 2000;20(1):195-219.
97. Drozdowski LA, Clandinin MT, Thomson ABR. Morphological, kinetic, membrane biochemical and genetic aspects of intestinal enteroplasticity. *World J Gastroentero: WJG*. 2009;15(7):774.
98. Sturm A, Layer P, Goebell H, Dignass AU. Short-bowel syndrome: an update on the therapeutic approach. *Scand J Gastroentero*. 1997;32(4):289.
99. Wolvekamp M, Heineman E, Taylor R, Fuller P. Towards understanding the process of intestinal adaptation. *Digest Dis*. 1996;14(1):59-72.
100. O'Connor TP, Lam MM, Diamond J. Magnitude of functional adaptation after intestinal resection. *Am J Physiol-Reg I*. 1999;276(5):R1265.
101. Tavakkolizadeh A, Whang EE. Understanding and augmenting human intestinal adaptation: a call for more clinical research. *JPEN-Parenter Enter*. 2002;26(4):251.
102. Dowling R. Small bowel adaptation and its regulation. *Scand J Gastroentero*. 1982;74:53.
103. Helmrath MA, VanderKolk WE, Can G, Erwin CR, Warner BW. Intestinal adaptation following massive small bowel resection in the mouse. *J Am Coll Surgeons*. 1996;183(5):441.
104. Taylor R, Beveridge D, Fuller P. Expression of ileal glucagon and peptide tyrosine-tyrosine genes. Response to inhibition of polyamine synthesis in the presence of massive small-bowel resection. *BiochemJ*. 1992;286(Pt 3):737.
105. Jump DB, Clarke SD. Regulation of gene expression by dietary fat. *Annu Rev Nutr*. 1999;19(1):63-90.
106. Keelan M, Cheeseman C, Clandinin M, Thomson A. Intestinal morphology and transport after ileal resection in rat is modified by dietary fatty acids. *Clin Invest med*. 1996;19(2):63-70.
107. Diamond JM, Karasov WH, Cary C, Enders D, Yung R. Effect of dietary carbohydrate on monosaccharide uptake by mouse small intestine in vitro. *J Physiol*. 1984;349(1):419.

108. Ziegler TR, Mantell MP, Chow JC, Rombeau JL, Smith RJ. Gut adaptation and the insulin-like growth factor system: regulation by glutamine and IGF-I administration. *Am J Physiol-Gastr L*. 1996;271(5):G866.
109. Knop FK. Bile-induced secretion of glucagon-like peptide-1: pathophysiological implications in type 2 diabetes? *Am J Physiol-Endoc M*. 2010;299(1):E10.
110. Chu ZL, Jones RM, He H, Carroll C, Gutierrez V, Lucman A, et al. A role for beta-cell-expressed G protein-coupled receptor 119 in glycemic control by enhancing glucose-dependent insulin release. *Endocrinology*. 2007;148(6):2601-9. Epub 007 Feb 8.
111. Hirasawa A, Tsumaya K, Awaji T, Katsuma S, Adachi T, Yamada M, et al. Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat Med*. 2005;11(1):90-4. Epub 2004 Dec 26.
112. Katsuma S, Hirasawa A, Tsujimoto G. Bile acids promote glucagon-like peptide-1 secretion through TGR5 in a murine enteroendocrine cell line STC-1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;329(1):386-90.
113. Whalley N, Pritchard L, Smith DM, White A. Processing of proglucagon to GLP-1 in pancreatic alpha cells: is this a paracrine mechanism enabling GLP-1 to act on beta cells? *J Endocrinol*. 2011;27:27.
114. Yi F, Brubaker PL, Jin T. TCF-4 mediates cell type-specific regulation of proglucagon gene expression by β -catenin and glycogen synthase kinase-3. *J Biol Chem*. 2005;280(2):1457.
115. Qandeel HG, Alonso F, Hernandez DJ, Madhavan S, Duenes JA, Zheng Y, et al. Peptide absorption after massive proximal small bowel resection: Mechanisms of ileal adaptation. *J Gastrointest Surg*. 2009:1-11.
116. Brittan M, Wright N. The gastrointestinal stem cell. *Cell Proliferat*. 2004;37(1):35-53.
117. Sancho E, Batlle E, Clevers H. Live and let die in the intestinal epithelium. *Curr Opin Cell Biol*. 2003;15(6):763-70.
118. Crosnier C, Stamatakis D, Lewis J. Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat Rev Genet*. 2006;7(5):349-59.
119. May CL, Kaestner KH. Gut endocrine cell development. *Mol Cell Endocrinol*. 2010;323(1):70.
120. Rindi G, Leiter AB, Kopin AS, Bordi C, Solcia E. The "normal" endocrine cell of the gut: changing concepts and new evidences. *Ann NY Acad Sci*. 2004;1014(1):1-12.
121. Gutierrez-Aguilar R, Woods SC. Nutrition and L and K-enteroendocrine cells. *Curr Opin Endocrinol Diab Obes*. 2011;18(1):35.
122. Lee CS, Kaestner KH. Development of gut endocrine cells. *Best Pract Res Clin En*. 2004;18(4):453-62.
123. Moran GW, Leslie FC, Levison SE, McLaughlin JT. Review: Enteroendocrine cells: Neglected players in gastrointestinal disorders? *Therap Adv Gastroenterol*. 2008;1(1):51.
124. Barker N, Van De Wetering M, Clevers H. The intestinal stem cell. *Gene Dev*. 2008;22(14):1856.
125. Barker N, Clevers H. Tracking down the stem cells of the intestine: strategies to identify adult stem cells. *Gastroenterology*. 2007;133(6):1755-60.
126. Barker N, Van Es JH, Kuipers J, Kujala P, Van Den Born M, Cozijnsen M, et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature-London*. 2007;449(7165):1003.
127. Hoffman J, Kuhnert F, Davis CR, Kuo CJ. Wnts as essential growth factors for the adult small intestine and colon. *Cell cycle*. 2004;3(5):554.

128. Sei Y, Lu X, Liou A, Zhao X, Wank SA. A stem cell marker-expressing subset of enteroendocrine cells resides at the crypt base in the small intestine. *Am J Physiol-Gastr L.* 2011;300(2):G345.
129. Gerbe F, van Es JH, Makrini L, Brulin B, Mellitzer G, Robine S, et al. Distinct ATOH1 and Neurog3 requirements define tuft cells as a new secretory cell type in the intestinal epithelium. *J Cell Biol.* 2011;192(5):767.
130. Lai EC. Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development.* 2004;131(5):965.
131. Ray WJ, Yao M, Mumm J, Schroeter EH, Saftig P, Wolfe M, et al. Cell surface presenilin-1 participates in the -secretase-like proteolysis of Notch. *J Biol Chem.* 1999;274(51):36801.
132. Jensen J, Pedersen EE, Galante P, Hald J, Heller RS, Ishibashi M, et al. Control of endodermal endocrine development by Hes-1. *Nature Genetics.* 2000;24(1):36-44.
133. van den Brink GR, de Santa Barbara P, Roberts DJ. Epithelial Cell Differentiation—a Mather of Choice. *Science.* 2001;294(5549):2115.
134. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science.* 1999;284(5415):770.
135. Åsa Apelqvist HL, Lukas Sommer PB, David JA, Tasuku Honjo MH, de Angelis UL. Notch signalling controls pancreatic cell differentiation. *Nature.* 1999;400(6747):877-81.
136. Jenny M, Uhl C, Roche C, Duluc I, Guillermin V, Guillemot F, et al. Neurogenin3 is differentially required for endocrine cell fate specification in the intestinal and gastric epithelium. *The EMBO Journal.* 2002;21(23):6338-47.
137. Lee CS, Perreault N, Brestelli JE, Kaestner KH. Neurogenin 3 is essential for the proper specification of gastric enteroendocrine cells and the maintenance of gastric epithelial cell identity. *Gene Dev.* 2002;16(12):1488.
138. Yang Q, Bermingham NA, Finegold MJ, Zoghbi HY. Requirement of Math1 for secretory cell lineage commitment in the mouse intestine. *Science.* 2001;294(5549):2155.
139. Naya FJ, Huang HP, Qiu Y, Mutoh H, DeMayo FJ, Leiter AB, et al. Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice. *Gene Dev.* 1997;11(18):2323.
140. Shroyer NF, Wallis D, Venken KJT, Bellen HJ, Zoghbi HY. Gfi1 functions downstream of Math1 to control intestinal secretory cell subtype allocation and differentiation. *Gene Dev.* 2005;19(20):2412.
141. Mori-Akiyama Y, van den Born M, van Es JH, Hamilton SR, Adams HP, Zhang J, et al. SOX9 is required for the differentiation of paneth cells in the intestinal epithelium. *Gastroenterology.* 2007;133(2):539-46.
142. Katz JP, Perreault N, Goldstein BG, Lee CS, Labosky PA, Yang VW, et al. The zinc-finger transcription factor Klf4 is required for terminal differentiation of goblet cells in the colon. *Development.* 2002;129(11):2619.
143. Shroyer NF, Helmuth MA, Wang VYC, Antalffy B, Henning SJ, Zoghbi HY. Intestine-specific ablation of mouse atonal homolog 1 (Math1) reveals a role in cellular homeostasis. *Gastroenterology.* 2007;132(7):2478-88.
144. Schwitzgebel VM, Scheel DW, Connors JR, Kalamaras J, Lee JE, Anderson DJ, et al. Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas. *Development.* 2000;127(16):3533.
145. Mutoh H, Fung BP, Naya FJ, Tsai MJ, Nishitani J, Leiter AB. The basic helix-loop-helix transcription factor BETA2/NeuroD is expressed in mammalian enteroendocrine cells and activates secretin gene expression. *Proc Natl Acad Sci.* 1997;94(8):3560.
146. Huang HP, Liu M, El-Hodiri HM, Chu K, Jamrich M, Tsai MJ. Regulation of the pancreatic islet-specific gene BETA2 (neuroD) by neurogenin 3. *Mol Cell Biol.* 2000;20(9):3292.

147. Jarriault S, Brou C, Logeat F, Schroeter EH, Kopan R, Israel A. Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature*. 1995; 377:355.
148. Fujita Y, Cheung AT, Kieffer TJ. Harnessing the gut to treat diabetes. *Pediatr Diabetes*. 2004;5:57-69.
149. Cani PD, Hoste S, Guiot Y, Delzenne NM. Dietary non-digestible carbohydrates promote L-cell differentiation in the proximal colon of rats. *BritJNutr*. 2007;98(1):32-7.
150. Roberfroid M, Delzenne N. Dietary fructans. *Annu rev Nutr*. 1998;18(1): 117-43.
151. Ye DZ, Kaestner KH. Foxa1 and Foxa2 control the differentiation of goblet and enteroendocrine L- and D-cells in mice. *Gastroenterology*. 2009;137(6):2052-62.
152. Das P, May CL. Expression analysis of the Islet-1 gene in the developing and adult gastrointestinal tract. *Gene Expr Patterns*. 2011.
153. Gierl MS, Karoulias N, Wende H, Strehle M, Birchmeier C. The Zinc-finger factor Insm1 (IA-1) is essential for the development of pancreatic cells and intestinal endocrine cells. *Gene Dev*. 2006;20(17):2465.
154. Leonard J, Serup P, Gonzalez G, Edlund T, Montminy M. The LIM family transcription factor Isl-1 requires cAMP response element binding protein to promote somatostatin expression in pancreatic islet cells. *ProcNatl Acad Sci*. 1992;89(14):6247.
155. Sosa-Pineda B, Chowdhury K, Torres M, Oliver G, Gruss P. The Pax4 gene is essential for differentiation of insulin-producing cells in the mammalian pancreas. *Nature*. 1997;386(6623):399-402.
156. St-Onge L, Sosa-Pineda B, Chowdhury K, Mansouri A, Gruss P. Pax6 is required for differentiation of glucagon-producing β -cells in mouse pancreas. *Nature*. 1997;387(6631):406-9.
157. Larsson LI, St-Onge L, Hougaard DM, Sosa-Pineda B, Gruss P. Pax 4 and 6 regulate gastrointestinal endocrine cell development. *Mech Develop*. 1998;79(1-2):153-9.
158. Trinh DK, Zhang K, Hossain M, Brubaker PL, Drucker DJ. Pax-6 activates endogenous proglucagon gene expression in the rodent gastrointestinal epithelium. *Diabetes*. 2003;52(2):425-33.
159. Hill ME, Asa SL, Drucker DJ. Essential requirement for Pax6 in control of enteroendocrine proglucagon gene transcription. *Mol Endocrinol*. 1999;13(9): 1474.
160. Wen J, Chen Y, Song S, Ding J, Gao Y, Hu Q, et al. Paired box 6 (PAX6) regulates glucose metabolism via proinsulin processing mediated by prohormone convertase 1/3 (PC1/3). *Diabetologia*. 2009;52(3):504-13.
161. Tucker JD, Dhanvantari S, Brubaker PL. Proglucagon processing in islet and intestinal cell lines. *Regul Peptides*. 1996;62(1):29-35.
162. Rouille Y, Westermark G, Martin SK, Steiner DF. Proglucagon is processed to glucagon by prohormone convertase PC2 in alpha TC1-6 cells. *Proc Natl Acad Sci*. 1994;91(8):3242.
163. Fujita Y, Chui JWY, King DS, Zhang T, Seufert J, Pownall S, et al. Pax6 and Pdx1 are required for production of glucose-dependent insulinotropic polypeptide in proglucagon-expressing L cells. *Am J Physiol-Endoc M*. 2008;295(3):E648.
164. Øster A, Jensen J, Edlund H, Larsson LI. Homeobox gene product Nkx 6.1 immunoreactivity in nuclei of endocrine cells of rat and mouse stomach. *J HistochemCytochem*. 1998;46(6):717.
165. Desai S, Loomis Z, Pugh-Bernard A, Schrunk J, Doyle MJ, Minic A, et al. Nkx2. 2 regulates cell fate choice in the enteroendocrine cell lineages of the intestine. *Dev Biol*. 2008;313(1):58-66.

166. Choi MY, Romer AI, Wang Y, Wu MP, Ito S, Leiter AB, et al. Requirement of the tissue-restricted homeodomain transcription factor Nkx6. 3 in differentiation of gastrin-producing G cells in the stomach antrum. *Mol Cell Biol.* 2008;28(10):3208.
167. Beuling E, Baffour-Awuah NYA, Stapleton KA, Aronson BE, Noah TK, Shroyer NF, et al. GATA factors regulate proliferation, differentiation, and gene expression in small intestine of mature mice. *Gastroenterology.* 2011.
168. Battle MA, Bondow BJ, Iverson MA, Adams SJ, Jandacek RJ, Tso P, et al. GATA4 is essential for jejunal function in mice. *Gastroenterology.* 2008;135(5):1676–86. e1.
169. Bosse T, Piaseckyj CM, Burghard E, Fialkovich JJ, Rajagopal S, Pu WT, et al. Gata4 is essential for the maintenance of jejunal-ileal identities in the adult mouse small intestine. *Mol Cell Biol.* 2006;26(23):9060.
170. Dusing MR, Wiginton DA. Epithelial lineages of the small intestine have unique patterns of GATA expression. *J Mol Histol.* 2005;36(1):15–24.
171. Jin T, Drucker DJ. Activation of proglucagon gene transcription through a novel promoter element by the caudal-related homeodomain protein cdx-2/3. *Mol Cell Biol.* 1996;16(1):19–28.
172. Drucker DJ, Jin T, Asa SL, Young TA, Brubaker PL. Activation of proglucagon gene transcription by protein kinase-A in a novel mouse enteroendocrine cell line. *Mol Endocrinol.* 1994;8(12):1646–55.
173. Erwin CR, Falcone RA, Stern LE, Kemp CJ, Warner BW. Analysis of intestinal adaptation gene expression by cDNA expression arrays. *JPen-Parenter Enter.* 2000;24(6):311.
174. Stern LE, Erwin CR, Falcone RA. cDNA microarray analysis of adapting bowel after intestinal resection. *J Pediatr Surg.* 2001;36(1):190–5.
175. Quinn R. Comparing rat's to human's age: How old is my rat in people years? *Nutrition.* 2005;21:775–7.
176. De Luis, D.A.; Sagrado, M.G.; Conde, R.; Aller, R.; Izaola, O. The effects of two different hypocaloric diets on glucagon-like peptide 1 in obese adults, relation with insulin response after weight loss. *J.Diabetes Complicat.*, doi: 10.1016/j.jdiacomp.2007.12006,2008.
177. Barker, N., Clevers, H., Tracking down the stem cells of the intestine: strategies to identify adult stem cells. *Gastroenterology*2007;133:1755–60.
178. Sangiorgi, E., Capecchi, M.R. Bmi1 is expressed in vivo in intestinal stem cells. *Nat. Genet.*2008; 40:915–20.
179. German, M.J., Hammiche, A., Ragavan, N., Tobin, M.J., Cooper, L.J., Matanhelia, S.S., Hindley, A.C., Nicholson, C.M., Fullwood, N.J., Pollock, H.M., Martin, F.L.,. Infrared spectroscopy with multivariate analysis potentially facilitates the segregation of different types of prostate cell. *Biophys. J.* 2006a; 90:3783–95.
180. Walsh, M.J., Singh, M.N., Pollock, H.M., Cooper, L.J., German, M.J., Stringfellow, H.F., Fullwood, N.J., Paraskevaidis, E., Martin- Hirsch, P.L., Martin, F.L.,. ATR microspectroscopy with multivariate analysis segregates grades of exfoliative cervical cytology. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007B; 352: 213–9.

181. Walsh, M.J., German, M.J., Singh, M., Pollock, H.M., Hammiche, A., Kyrgiou, M., Stringfellow, H.F., Paraskevaïdis, E., Martin-Hirsch, P.L., Martin, F.L., IR microspectroscopy: potential applications in cervical cancer screening. *Cancer Lett.* 2007A; 246:1-11.
182. Walsh, M.J., Singh, M.N., Stringfellow, H.F., Pollock, H.M., Hammiche, A., Grude, O., Fullwood, N.J., Pitt, M.A., Martin-Hirsch, P.L., Martin, F.L. FTIR microspectroscopy coupled with two-class discrimination segregates markers responsible for inter- and intracategory variance in exfoliative cervical cytology. *Biomark Insights* 2008A;3:179-89.
183. Walsh, M.J., Fellous, T.G., Hammiche, A., Lin, W.R., Fullwood, N.J., Grude, O., Bahrami, F., Nicholson, J.M., Cotte, M., Susini, J., Pollock, H.M., Brittan, M., Martin-Hirsch, P.L., Alison, M.R., Martin, F.L.,. Fourier transform infrared microspectroscopy identifies symmetric PO₂- modifications as a marker of the putative stem cell region of human intestinal crypts. *Stem Cells.* 2008B; 26:108-18.
184. Walsh, M.J., Bruce, S.W., Pant, K., Carmichael, P.L., Scott, A.D., Martin, F.L.. Discrimination of a transformation phenotype in Syrian golden hamster embryo (SHE) cells using ATR-FTIR spectroscopy. *Toxicology*, 2009;258:33-8.
185. Ami, D., Neri, T., Natalello, A., Mereghetti, P., Doglia, S.M., Zanoni, M., Zuccotti, M., Garagna, S., Redi, C.A.,. Embryonic stem cell differentiation studied by FT-IR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.* 2008; 1783: 98-106.
186. Krafft, C., Salzer, R., Seitz, S., Ern, C., Schieker, M.,. Differentiation of individual human mesenchymal stem cells probed by FTIR microscopic imaging. *Analyst.* 2007; 132: 647-53.
187. Martin, F.L., German, M.J., Wit, E., Fearn, T., Ragavan, N., Pollock, H.M. Identifying variables responsible for clustering indiscriminant analysis of data from infrared microspectroscopy of a biological sample. *J. Comput. Biol.* 2007; 14: 1176-84.
188. Mordechai, S., Sahu, R.K., Hammody, Z., Mark, S., Kantarovich, K., Guterman, H., Podshyvalov, A., Goldstein, J., Argov, S. Possible common biomarkers from FTIR microspectroscopy of cervical cancer and melanoma. *J. Microsc.* 2004: 215; 86-91.
189. B. Valeur. *Molecular Fluorescence.* Wiley-VCH Publishers, 2002.
190. J. R. Lakowicz. *Topics in Fluorescence Spectroscopy, volume Vol 4 of Probe Design and Chemical Sensing.* Plenum Press, N. York & London, 1994.

191. Andrew H A Clayton, Quentin S Hanley, Donna J Arndt-Jovin, Vinod Subramaniam, and Thomas M Jovin. Dynamic fluorescence anisotropy imaging microscopy in the frequency domain (rflim). *Biophys J*, 200; 83(3):1631-49.
192. Jonathan V Rocheleau, Michael Edidin, and David W Piston. Intrasequence gfp in class i mhc molecules, a rigid probe for fluorescence anisotropy measurements of the membrane environment. *Biophys J*, 2003; 84(6):4078-86.
193. Brian Cannon, Garrett Heath, Juyang Huang, Pentti Somerharju, Jorma A Virtanen, and Kwan Hon Cheng. Time-resolved fluorescence and fourier transform infrared spectroscopic investigations of lateral packing defects and superlattice domains in compositionally uniform cholesterol/phosphatidylcholine bilayers. *Biophys J*, 2003; 84(6):3777-91.
194. M. Edidin. Rotational and translational diffusion in membranes. *Annu Rev Biophys Bioeng*, 1974; 3(0):179-201.
195. E. L. Elson. J. Schlessinger. *Biophysical Methods. Methods of Experimental Physics*. Academic Press, New York, 1979.
196. J. R. Lakowicz, editor. *Topics in Fluorescence Spectroscopy, volume Vol 6 of Protein Fluorescence*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, N. York, 2000.
197. I. Parker G. Marriott. *Biophotonics, volume Vol. 360 & 361 of Methods in Enzymology*. 2003.
198. Mostaçõ-Guidolin L. M. Caracterização bioquímica de células sadias e neoplásicas através de espectroscopia vibracional. Dissertação de mestrado, Orientador: Luciano Bachmann (2009).
199. Mostaco-Guidolin Leila Buettner; Murakami Luciana Sayuri; Batistuti Marina Ribeiro; et al. Molecular and chemical characterization by Fourier transform infrared spectroscopy of human breast cancer cells with estrogen receptor expressed and not expressed. *Spectroscopy—an International Journal* . 2010;24(5):501-10.
200. Bachmann Luciano; Zzell Denise Maria; Ribeiro Adriana da Costa; et al. Fluorescence spectroscopy of biological tissues. 2006; 41(6): 575-90.
201. D.K. Buslov and N.A. Nikonenko. A priori estimation of the parameters of the method of spectral curve deconvolution. *Applied Spectroscopy*, 1998; 52(4):613-20.
202. Víctor A Lórenz-Fonfría and Esteve Padrós. Curve-fitting of fourier manipulated spectra comprising apodization, smoothing, derivation and deconvolution. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2004; 60(12): 2703-10.
203. Griffiths and J.M. Chalmers. *Handbook of vibrational specstroscopy*. Wiley, 2002.

204. A.L. Stancik and E.B. Brauns. A simple asymmetric lineshape for fitting infrared absorption spectra. *Vibrational Spectroscopy*, 2008; 47(1):66-9.
205. M. V. Doni and R. Oliveira. *Análise de Cluster: Métodos hierárquicos e de particionamento*. Universidade Presbiteriana Mackenzie, 2004.
- 206.A. K. Jain, M. N. Murty, and P. J. Flynn. Data clustering: A review. *ACM Computing Surveys*, 1999.;31(3):264 - 323.
207. Lindsay I. Smith. A tutorial on principal components analysis, February 2002.