

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós Graduação em Medicina – Ciências cirúrgicas

DUODENOJEJUNOSTOMIA EM MODELO EXPERIMENTAL DE
DIABETES *Mellitus* TIPO 2 INDUZIDO COM ESTREPTOZOTOCINA EM
RATOS: REPERCUSSÕES DE UMA POTENCIAL CIRURGIA
METABÓLICA



Cácio Ricardo Wietzycoski

Orientador: Prof. Dr. Manoel R. Maciel Trindade

PORTO ALEGRE

2011

Cácio Ricardo Wietzycoski

DUODENOJEJUNOSTOMIA EM MODELO EXPERIMENTAL DE
DIABETES *Mellitus* TIPO 2 INDUZIDO COM ESTREPTOZOTOCINA EM
RATOS: REPERCUSSÕES DE UMA POTENCIAL CIRURGIA
METABÓLICA

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós Graduação em Medicina:
Ciências Cirúrgicas da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul como requisito para
obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Manoel R. Maciel Trindade

PORTO ALEGRE

2011

CIP - Catalogação na Publicação

Wietzycoski, Cácio Ricardo
DUODENOJEJUNOSTOMIA EM MODELO EXPERIMENTAL DE
DIABETES Mellitus TIPO 2 INDUZIDO COM
ESTREPTOZOTOCINA EM RATOS: REPERCUSSÕES DE UMA
POTENCIAL CIRURGIA METABÓLICA / Cácio Ricardo
Wietzycoski. -- 2011.
88 f.

Orientador: Manoel Roberto Maciel Trindade.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas,
Porto Alegre, BR-RS, 2011.

1. Cirurgia metabólica. 2. Diabetes mellitus tipo
2. 3. Indução do diabetes. 4. Cirurgia do diabetes.
5. Streptozotocina. I. Trindade, Manoel Roberto
Maciel, orient. II. Título.

Dedicatória:

À minha família e à minha namorada Grasiene
pela compreensão, motivação e amor.

AGRADECIMENTOS:

Agradeço à minha família por ter acreditado que a minha saída de Paulo Bento não seria em vão. Obrigado pelo apoio, compreensão e carinho.

Agradeço à minha namorada Grasiene por entender as vezes que deixei de estar com ela para estar operando os “ratinhos”. Te amo muito minha futura Nutricionista e Pesquisadora.

Agradeço ao meu Professor Dr. Manoel R. M. Trindade pelo estímulo continuado à pesquisa, ao aprendizado de novas técnicas e à orientação do projeto. Prof. Manoel, um entusiasta da evolução da cirurgia digestiva que muito contribui para a formação dos melhores cirurgiões deste país.

Agradeço ao Dr. João Caetano Marchesini por desenvolver a idéia inicial do projeto, pelo esforço em angariar o patrocínio do estudo e pela orientação contínua. Obrigado, Dr. Marchesini, apesar da demora, aqui está o nosso trabalho. Obrigado também ao Dr Akihito que me ensinou os primeiros passos na cirurgia experimental em ratos.

I would like to give special thanks to Dr. Sultan Al-Themyatt, from *Al-Khobar, Saudi Arabia*, for believing in our project and providing funding that enabled this work. Thank you very much Dr. Sultan.

Agradeço à Fabíola S. Meyer, veterinária da UEA, que desde o início me ajudou em todos os experimentos. Muito obrigado, Fabíola, sem você, eu não terminaria este projeto, pode acreditar.

Agradeço ao pesquisador Luiz Felipe Forgiarini e sua equipe, que proporcionaram a realização dos exames referentes à atividade inflamatória. Obrigado pelo empenho e colaboração, sua participação foi fundamental.

Agradeço à chefe da UEA, Enfa. Marta, que sempre resolveu os problemas burocráticos e disponibilizou todo o material necessário para a pesquisa, e aos demais funcionários da UEA.

Agradeço à Gisele do Serviço de Cirurgia e à Estela e ao Prof Cléber Kruehl do PPG pelo incentivo constante.

Agradeço aos acadêmicos que auxiliaram nos experimentos: Karla, Cibele, Sheila, Everton, Ricardo e demais.

SUMÁRIO:

| | |
|---|----|
| ABREVIATURAS E SIGLAS:..... | 9 |
| LISTA DE FIGURAS: | 11 |
| LISTA DE TABELAS: | 14 |
| RESUMO:..... | 15 |
| ABSTRACT: | 16 |
| INTRODUÇÃO: | 17 |
| REFERENCIAL TEÓRICO: | 19 |
| Diabetes Mellitus (DM): | 19 |
| Diabetes Mellitus experimental: | 22 |
| Estresse Oxidativo (EO):..... | 24 |
| Estresse Oxidativo no DM: | 28 |
| Fator de transcrição nuclear Kappa B (NF-kB):..... | 29 |
| Cirurgia Metabólica como tratamento do DM tipo 2: | 31 |
| Papel das Incretinas no controle glicêmico: | 32 |
| Novas técnicas cirúrgicas:..... | 33 |
| Proposta cirúrgica para este estudo: | 37 |
| Modelos experimentais em cirurgia metabólica: | 39 |
| JUSTIFICATIVA: | 43 |
| OBJETIVO GERAL: | 44 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS:..... | 44 |
| MATERIAIS E MÉTODOS:..... | 45 |
| Animais de experimento: | 45 |
| Indução do DM tipo 2 experimental: | 45 |
| Protocolo Experimental:..... | 45 |
| Técnica Cirúrgica: | 46 |
| Seguimento pós-experimento: | 47 |
| Testes bioquímicos:..... | 48 |
| Preparação do homogeneizado: | 48 |
| Dosagem de proteínas: | 48 |
| Avaliação da lipoperoxidação: | 49 |
| Atividade da Superóxido Dismutase (SOD): | 49 |
| Atividade da Catalase (CAT): | 50 |
| ELISA TNF- α :..... | 50 |
| Análise da expressão protéica: | 50 |
| Preparação dos extratos citoplasmáticos: | 51 |
| Expressão protéica: | 51 |
| Análise Estatística: | 52 |
| Aspectos éticos: | 52 |
| RESULTADOS:..... | 54 |
| Indução do DM tipo 2: | 54 |
| Peso corporal:..... | 55 |
| Testes bioquímicos:..... | 55 |
| Estresse oxidativo – Lipoperoxidação: | 60 |
| Expressão protéica p65 NF-kB..... | 66 |
| TNF- alpha | 68 |

DISCUSSÃO 70
CONSIDERAÇÕES FINAIS: 77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS: 78

ABREVIATURAS E SIGLAS:

| | |
|--------------|---|
| 4-HNE | 4-Hidroxinonenal |
| ADA | Associação Americana de Diabetes |
| AGEs | Produtos finais da glicosilação avançada |
| ALT | Alanina aminotransferase |
| AST | Aspartato transaminase |
| BGYR | Bypass Gástrico em Y de Roux |
| CAT | Catalase |
| cm | Centímetro |
| CNPq | Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico |
| DAG | Diacilglicerol |
| DCV | Doença Cardiovascular |
| DM | Diabetes mellitus |
| DNA | Ácido Desoxirribonucléico |
| DPP4 | Dipeptidil peptidase 4 |
| DPT | Duodenopancreatectomia |
| ELISA | Enzime Linked Imunoabsorbant Assay |
| EO | Estresse oxidativo |
| ERO | Espécie reativa de oxigênio |
| FA | Fosfatase alcalina |
| FFA | Ácidos graxos livres |
| GAPDH | Gliceraldeído Fosfato Desidrogenase |
| GLP1 | Peptídeo glucagon-like 1 |
| GPx | Glutaciona peroxidase |
| GSH | Glutaciona reduzida |
| HAS | Hipertensão arterial sistêmica |
| HDL | Lipoproteína de alta densidade |
| HIPERDIA | Sistema de informação do diabetes e hipertensão |
| i.p. | Intraperitoneal |
| IKk-B | Complexo kinase kappa B |
| IL-1 β | Interleucina 1 beta |
| IL-6 | Interleucina 6 |
| IMC | Índice de Massa Corporal |
| IxB | Inibidor xB |
| Kg | Quilogramas |
| LDL | Lipoproteína de baixa densidade |
| LPO | Lipoperoxidação |
| MDA | Malondialdeído |
| mg | Miligramas |
| NAD | Nicotinamida adenina dinucleotídeo |
| NADPH | Nitocinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfatase |
| NF-kB | Fator de transcrição nuclear kappa B |
| NO | Óxido nítrico |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| PARP | Poli ADP-Ribose Polimerase |
| PCR | Proteína C Reativa |

| | |
|---------------|---|
| PKC | Proteína quinase C |
| QL | Quimioluminescência |
| PYY | Peptídeo YY |
| RAGE | Receptor para produtos de glicosilação avançada |
| RL | Radicais livres |
| SM | Síndrome Metabólica |
| SOD | Superóxido Dismutase |
| STZ | Streptozotocina |
| TBA | Ácido tiobarbitúrico |
| TBARS | Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico |
| TCA | Ácido tricloroacético |
| TGC | Triglicerídeos |
| TNF- α | Fator de Necrose Tumoral Alpha |
| TTGIP | Teste de tolerância a glicose intraperitoneal |
| UEA | Unidade de Experimentação Animal |
| VEGF | Fator de crescimento do endotélio vascular |
| VLDL | Lipoproteína de muito baixa densidade |

LISTA DE FIGURAS:

Figura 1: Mecanismo unificado de dano celular induzido pela hiperglicemia (Reis *et al.*, 2008). ERO: espécies reativas de oxigênio; PARP: poli ADP-ribose polimerase; GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase); AGEs: produtos finais da glicosilação avançada; PKC: Proteína quinase C; NF-κB: Fator de transcrição Kappa B.

Figura 2: Atuação da STZ nas células β pancreáticas (produtoras de insulina) Adaptado de Pickup e Williams, 1988. DNA: ácido desoxirribonucléico; NAD: nicotinamida-adenina dinucleotídeo.

Figura 3: Reações pró-oxidantes/antioxidantes relevantes no sistema biológico. Adaptado de Schnachenberg, 2002. $O_2^{\bullet-}$: ânion superóxido; ONOO⁻: peroxinitrito; NO: óxido nítrico; SOD: superóxido dismutase; CAT: catalase; OH[•]: radical hidroxila; H₂O: água; O₂: oxigênio; H₂O₂: peróxido de hidrogênio; GPx: glutathione peroxidase; GSH: glutathione reduzida; GSSG: glutathione oxidada; Fe²⁺: íon ferroso; Cu⁺: cobre; OH[•]: hidroxila.

Figura 4: Mecanismo de defesa enzimática contra as ERO (Adaptado de Del Maestro, 1980). CAT: catalase; GPx: glutathione peroxidase; O₂: oxigênio; $O_2^{\bullet-}$: ânion superóxido; H₂O₂: peróxido de hidrogênio; OH[•]: radical hidroxila; H₂O: água; SOD: superóxido dismutase.

Figura 5: Vias de ativação do NF-κB. Representação esquemática da translocação nuclear da molécula de NF-κB ativada frente diversos estímulos como hiperglicemia, estresse oxidativo, infecção, citocinas e radiação ultravioleta. No núcleo o NF-κB promove a transcrição de diversos moduladores como citocinas pró-inflamatórias e RAGE. IL-1: interleucina 1; TNF: fator de necrose tumoral; UV: raios ultra-violetas; NF-κB: fator transcrição kappa b; IκB: inibidor Kappa B p65: subunidade do NF-κB; p50: subunidade do NF-κB; IKK: inibidor kappa quinase.

Figura 6: Cirurgia proposta por Noya *et al.*, 1998.

Figura 7: Abordagem cirúrgica proposta por Rubino *et al.*, 2004.

Figura 8: Técnica proposta por Koopmans *et al.*

Figura 9: Mudança na técnica da DPT original através da ligadura da arteria gástrica direita (Sugiyama *et al.*, 2000).

Figura 10: Modelo da nova técnica proposta por Marchesini.

Figura 11: Teste de tolerância a glicose intraperitoneal – TTGIP nos animais induzidos com STZ e os animais CO que receberam somente tampão.

Figura 12: Diferença significativa no peso corporal dos animais do grupo CO em relação aos animais do grupo DM ($p < 0,01$) e DM+OP ($p < 0,001$).

Figura 13: Perfil glicêmico dos animais estudados, onde podemos observar um aumento significativo dos animais do grupo DM ($*p < 0,05$) em relação aos animais do grupo CO, e uma redução significativa dos animais do grupo DM+OP ($**p < 0,01$) em relação aos animais do grupo DM.

Figura 14: Triglicerídeos séricos dos animais estudados. Diferença significativa do grupo DM ($*p < 0,05$) em relação ao grupo CO; diferença significativa do grupo DM+OP ($***p < 0,001$) em relação ao grupo DM.

Figura 15: Colesterol total nos animais estudados. Diferença significativa dos animais do grupo DM ($*p < 0,05$) em relação ao grupo CO; diferença significativa do grupo DM+OP ($***p < 0,001$) em relação aos grupos DM e CO.

Figura 16: Colesterol HDL nos animais estudados. Diferença significativa dos animais do grupo DM ($*p < 0,05$) em relação ao grupo CO; diferença significativa do grupo DM+OP ($***p < 0,001$) em relação aos grupos DM e CO.

Figura 17: Colesterol LDL nos animais estudados. Diferença significativa do grupo DM (* $p < 0,05$) em relação ao grupo CO; diferença significativa do grupo DM+OP (** $p < 0,01$) em relação ao grupo DM.

Figura 18: Colesterol VLDL dos animais estudados. Diferença significativa do grupo DM (* $p < 0,05$) em relação ao grupo CO; diferença significativa do grupo DM+OP (** $p < 0,001$) em relação ao grupo DM.

LISTA DE TABELAS:

Tabela 1: Importantes espécies reativas no sistema biológico (adaptado de Halliwell, 2006).

Tabela 2: Valores de TNF- α através da técnica de ELISA nos animais estudados após Duodenojejunostomia , resultados em 3 meses de seguimento.

RESUMO:

O Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) é uma síndrome multifatorial com complicações graves e mortalidade significativa, mas seu tratamento até o momento tem mostrado resultados desapontadores. Apenas 50% dos pacientes com DM2 conseguem manter níveis glicêmicos adequados. Rubino et al em 2004 demonstraram uma técnica cirúrgica de exclusão duodenojejunal em ratos diabéticos não obesos com bons resultados no controle dos níveis glicêmicos. O desenvolvimento de uma técnica que não apresente perda ponderal pode prover base teórica e científica para justificar sua aplicação em pacientes com DM2 e IMC<35. Com este objetivo, iniciamos um estudo experimental utilizando a técnica proposta por Marchesini em 2008, que consiste na secção do duodeno imediatamente após o piloro, seguido de duodenojejunostomia com anastomose termino-lateral na porção média do intestino delgado. O objetivo foi demonstrar as alterações no perfil metabólico, inflamatório e de estresse oxidativo após a cirurgia metabólica. Foram utilizados 24 ratos Wistar com 2 dias de vida sendo que em 16 deles foi induzido o DM2 através de injeção i.p. de 100mg/kg de Streptozotocina. O desenvolvimento de diabetes foi confirmado após 10 semanas através de TTGIP. Oito ratos diabéticos compuseram o grupo diabético cirúrgico (DM+OP) e oito o grupo diabético controle (DM). Os outros oito animais que não tiveram indução do diabetes formaram o grupo controle clínico (CO). A técnica de Marchesini foi realizada no grupo DM+OP, e os grupos DM e CO receberam dieta padrão e seguimento. Foi realizado TTGIP aos 7, 15, 30, 60 e 90 dias após a cirurgia, quando os animais foram submetidos a eutanásia. Os animais do DM+OP não tiveram perda de peso importante após três meses da cirurgia, enquanto que o DM e o CO tiveram aumento significativo do peso. A glicemia dos animais operados foi significativamente menor no grupo operado em comparação ao diabético controle e os valores de colesterol seguiram a mesma tendência. Os níveis de TNF- α , NF-kB, SOD, TBARS e Catalase foram significativamente menores no grupo DM+OP em relação ao grupo DM. A duodenojejunostomia foi efetiva em controlar os níveis de glicemia e colesterol, bem como diminuiu significativamente os marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo.

Palavras-chave: Cirurgia metabólica, indução de diabetes, modelos de diabetes melitus tipo 2, cirurgia do diabetes, estresse oxidativo.

ABSTRACT:

Diabetes Mellitus type 2 (DMT2) is a multifactorial syndrome with severe complications and significant mortality. Until this moment, its treatment has proven disappointing. Only 50% of DM2 patients are able to maintain proper glycemic levels. In 2004 Rubino et al showed a surgical technique of duodenal-jejunal exclusion in diabetic non-obese rats with positive results in the control of glycemic levels. The development of a technique that does not imply weight loss may provide a theoretical and scientific basis for its application in DM2 patients who present BMI<35. With this aim, this experimental study was conducted using the technique proposed by Marchesini in 2008, which consists of a section of the duodenum immediately next to the pylorus, followed by duodenojejunosomy with end-to-side anastomosis in the medial portion of the small intestine. The objective was to demonstrate alterations in the metabolic and inflammatory profile and in oxidative stress after metabolic surgery. An amount of 24 2-day-old Wistar rats were used. In 16 of them DMT2 was induced through 100mg/kg injection i.p. of streptozotocin. The development of diabetes was confirmed after 10 weeks through TTGIP. Eight diabetic rats composed the diabetic surgical group (DM+OP); and 8 other rats composed the diabetic control group (DM). The other 8 animals which were not induced formed the clinical control group (CO). The Marchesini technique was used in the DM+OP, and the other groups received the standard diet and follow up. TTGIP was performed at 7, 15, 30, 60 and 90 days after surgery, when the animals were submitted to euthanasia. DM+OP animals presented no important weight loss 3 months after surgery, while the other groups presented a significant weight gain. Weight maintenance after surgery in DM+OP proves the effectiveness of this technique in preventing obesity progression, which is characteristic in obese diabetic patients. The glucose levels were significantly lower in the operated group compared to diabetic control and cholesterol values followed the same trend. The levels of TNF- α , NF- κ B, SOD, catalase and TBARS were significantly lower in DM + OP group compared to DM. The duodenojejunosomy was effective in controlling blood glucose levels and cholesterol, and significantly decreased inflammatory markers and oxidative stress.

Keywords: metabolic surgery; induction of diabetes; diabetes mellitus type 2 models; diabetes surgery; oxidative stress.

INTRODUÇÃO:

O Diabetes *Mellitus* (DM) é uma doença que apresenta elevada incidência e prevalência na população em diversas partes do mundo. Essa doença apresenta prevalência bastante elevada nos Estados Unidos e em países da Europa, contudo, o Brasil e outros países em desenvolvimento apresentam crescimento considerável no número de doentes (WHO, 1998). O crescimento da incidência de DM no Brasil representa importante preocupação da saúde pública, tendo em vista que a doença acomete diversos sistemas corporais com complicações freqüentes, decorrentes de alterações teciduais e vasculares, manifestando-se através de doença vascular periférica, doença isquêmica cardíaca e doenças cerebrovasculares.

Estima-se que o número de pessoas com DM aumente de 150 milhões, em 2000, para 220 milhões, em 2010, e 300 milhões, em 2025 (Wild, Roglic *et al.*, 2004). Além disso, a estimativa da prevalência mundial de DM para todos os grupos etários, em 2000, é de 2,8% e, em 2030, de 4,4% (Wild, Roglic *et al.*, 2004). Ainda que a prevalência de obesidade permaneça estável até 2030, o que parece improvável, o número de pessoas com DM será maior do que o dobro em consequência de envelhecimento e urbanização da população. Tais estimativas, provavelmente, estão subestimando os valores reais, visto que dados da Federação Internacional de Diabetes indicam que aproximadamente 246 milhões de pessoas no mundo têm DM, sendo, atualmente, uma das doenças não transmissíveis mais comuns (Unwin, Gan *et al.*).

No Brasil, segundo dados do Sistema de Informação do DM e Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) – (Hiperdia), do Ministério da Saúde, estima-se a existência de seis milhões de diabéticos, metade dos quais faz acompanhamento nas unidades básicas de saúde. No Rio Grande do Sul, desde o início da implantação do Hiperdia, em 2002, já foram cadastrados e acompanhados 10.763 doentes (Ministério da Saúde, 2009).

Existe crescente interesse na pesquisa experimental com a finalidade de investigar as principais vias fisiopatológicas do DM, principalmente em relação às

complicações crônicas da doença. O estresse oxidativo é aceito como fator causal das complicações crônicas, portanto, a pesquisa de tratamentos que atenuem o dano oxidativo ocasionado pela progressão do DM é de grande interesse para a comunidade científica. A realização desses trabalhos projeta a perspectiva de novos estudos que aprofundem o conhecimento sobre a ação da terapia no DM.

REFERENCIAL TEÓRICO:

Diabetes Mellitus (DM):

Os primeiros relatos dessa doença foram registrados pelos antigos egípcios por volta 1500 a.C. Entre os hebreus há relatos com suspeita da ocorrência do diabetes gestacional. Algumas complicações do DM como polifagia, polidipsia, poliúria e poliastenia foram observados pelo médico Areteu da Capadócia, por volta de 70 d.C (Oliveira, 2002).

Pelo período de 1600 anos, a medicina não evoluiu no estudo do diabetes. Só em 1670, o médico inglês Thomas Willis descobriu, provando a urina de indivíduos que apresentavam os mesmos sintomas, que ela era "muitíssimo doce, cheia de açúcar". Em 1815, o químico Michael Chevreul demonstrou que o açúcar dos diabéticos era glicose, embora a causa desse excesso não tivesse sido estabelecida. Por essa razão, os médicos passaram a provar a urina das pessoas sob suspeita de diabetes. Desde essa época, a doença passou a chamar-se "diabetes açucarada" ou "Diabetes Mellitus". A palavra "Mellitus" é proveniente do latim e quer dizer "mel ou adocicado" (Oliveira, 2002; King e Rubin, 2003).

Em 1889, Joseph Von Mering e Oscar Minkowski descobriram que o pâncreas produz uma substância, capaz de controlar o açúcar no sangue e evitar os sintomas do diabetes. Essa substância, anos depois, foi descrita como insulina (Oliveira, 2002).

O DM não é uma doença única, mas apresenta um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos. Em comum a todos eles está a hiperglicemia (Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2007).

Atualmente, a classificação do DM é baseada na etiologia e não no tipo de tratamento, como até poucos anos. A classificação proposta pela OMS (Organização Mundial de Saúde) e pela Associação Americana de Diabetes (ADA) inclui quatro classes clínicas: DM tipo 1 e DM tipo 2 (essas representam as principais categorias), outros tipos específicos de DM e DM gestacional.

O DM tipo 1, forma presente em 5% a 10% do total dos casos, resulta na destruição das células β -pancreáticas e tem tendência à cetoacidose. Muitas vezes, essa destruição é mediada por autoimunidade, porém existem casos em que não há evidências de processo autoimune, sendo, portanto, referida como forma idiopática do DM tipo 1 (Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2007). O DM tipo 2 compreende 85% a 90% do total de casos de diabetes. Esse tipo apresenta graus variáveis de resistência tecidual à insulina, relativa deficiência na secreção desse hormônio pelas células β -pancreáticas, além de fatores genéticos, ambientais e obesidade (American Diabetes Association, 2007).

Uma epidemia de DM está em curso. Estima-se que o número de pessoas com DM aumente de 170 milhões, em 2000, para 194 milhões em 2003 e 334 milhões em 2030 (Wild *et al.*, 2004). No Brasil, um censo realizado pelo Ministério da Saúde e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), com o apoio da Sociedade Brasileira de Diabetes, demonstrou a prevalência de diabetes em 7,6% da população entre 30 e 69 anos (Ministério da Saúde, 2009).

No Brasil, existem aproximadamente 11 milhões de diabéticos, compreendendo cerca de 5,9% da população total. Desse universo, cerca de 90% delas são portadoras de diabetes do tipo 2 (Ministério da Saúde, 2009).

Existem quatro vias metabólicas que explicam como a hiperglicemia resulta nas complicações diabéticas. São elas: aumento no fluxo da via dos polióis, aumento na formação de produtos finais da glicosilação avançada (AGEs), ativação das isoformas da proteína quinase C (PKC) e aumento na atividade da via da hexosamina (Brownlee, 2001).

A hiperglicemia também é a causa principal de aumento na geração do ânion radical superóxido. O estresse oxidativo é aceito como principal fator desencadeante no desenvolvimento das complicações crônicas do DM (Brownlee, 2001).

A hiperglicemia permite a conversão de glicose em sorbitol pela via dos polióis, juntamente com a diminuição de fosfato nicotinamida adenina dinucleotídeo

(NADPH) e glutathiona reduzida (GSH). Posteriormente, o sorbitol é metabolizado à frutose pela sorbital desidrogenase e, dessa forma, aumenta a razão NADH/NAD⁺, o que aumentaria a síntese "de novo" de diacilglicerol (DAG), principal ativador fisiológico da PKC (Darley-Usmar *et al.*, 1995).

As complicações do DM apresentam origem multifatorial, porém o processo bioquímico de glicosilação avançada é acelerado devido à hiperglicemia crônica e ao estresse oxidativo. A glicosilação avançada envolve a geração de um grupo heterogêneo de substâncias químicas conhecidas como AGEs. Seus efeitos no diabetes podem ser classificados como independentes ou dependentes de receptores, podendo atuar de maneira intracelular ou através de ligação com a superfície celular por intermédio de receptores, como o receptor para produtos finais de glicosilação avançada (RAGE) (Goh e Cooper, 2008). Ao interagir com seu receptor, os AGEs ativam a via de transdução de sinais secundária como a proteína quinase C (PKC). O alvo chave da sinalização dos AGEs é o NF-κB, que é translocado para o núcleo, ativando a transcrição de numerosas proteínas celulares, incluindo as moléculas de adesão celular-1, E-selectina, endotelina-1, fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e citocinas pró-inflamatórias (Joral *et al.*, 1993; Schiekofer *et al.*, 2003; Goldin *et al.*, 2006).

A via de biossíntese da hexosamina é uma via adicional do metabolismo da glicose que pode mediar alguns dos efeitos tóxicos da glicose (Brownlee, 2001). Devido a esse mecanismo, o aumento da glicose intracelular tem como consequência a metabolização final de frutose-6-fosfato a uridina difosfato-N-acetil glucosamina, resultando em alterações patológicas na expressão gênica, aumentando a produção de citocinas inflamatórias e fatores de transcrição (Du *et al.*, 2000).

O mecanismo que parece ser comum a todas as células lesadas como consequência da hiperglicemia é a produção aumentada de ERO, sendo essa hipótese capaz de unificar todas as vias, como mostrado na Figura 1. A hiperglicemia leva ao aumento da PARP (poli ADP-ribose polimerase), enzima envolvida no reparo de danos ao ácido desoxirribonucleico (DNA) e, conseqüentemente, à diminuição da GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato

desidrogenase), responsável pela metabolização final da glicose, ativando todas as vias (Brownlee, 2005).

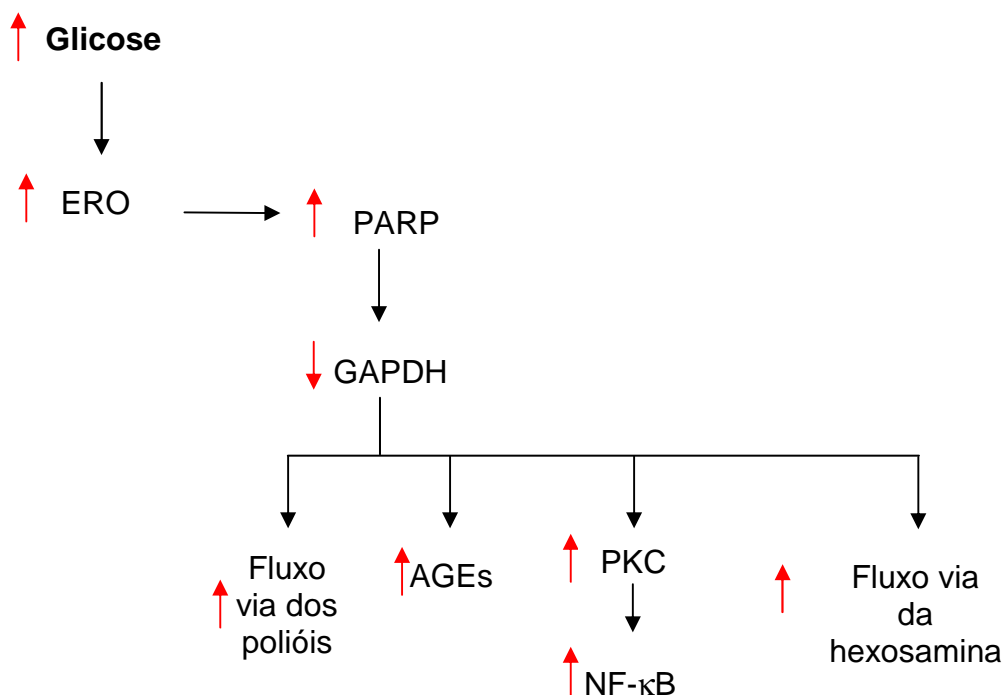


Figura 1: Mecanismo unificado de dano celular induzido pela hiperglicemia (Reis *et al.*, 2008). ERO: espécies reativas de oxigênio; PARP: poli ADP-ribose polimerase; GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase); AGEs: produtos finais da glicosilação avançada; PKC: Proteína quinase C; NF-κB: Fator de transcrição Kappa B.

Diabetes Mellitus experimental:

Grande parte dos conhecimentos científicos que o homem adquiriu na área da biomedicina visando, primordialmente, a saúde humana e a dos animais domésticos foi possível, em grande parte, graças ao uso dos animais de laboratório em suas pesquisas. Esta íntima relação entre pesquisa biomédica e uso de animais de laboratório deve-se, principalmente, ao conhecimento científico adquirido a respeito desses animais (Andersen *et al.*, 2004).

Os modelos experimentais utilizados para o estudo do DM contribuem para o esclarecimento sobre a doença, suas causas e consequências. A indução química do diabetes em animais experimentais ocorre após a destruição química seletiva das células β -pancreáticas. As substâncias diabetogênicas mais usadas são a estreptozotocina (STZ) e o aloxano. A dose dessas drogas para indução do diabetes depende da espécie do animal e do seu peso (Szkudelki, 2001).

A STZ é uma nitrosamina, inicialmente isolada do *Streptomyces achromogenes* (Herr *et al.*, 1960). É uma molécula de glicose com uma cadeia lateral altamente reativa, nitrosuréia, que inicia a ação citotóxica (Islas-Andrade *et al.*, 2000). A molécula de glicose direciona a STZ para as células β -pancreáticas, onde ela se liga ao transportador de membrana GLUT-2. Schnedl e colaboradores demonstraram que a toxicidade da STZ nas células β -pancreáticas é devida à similaridade da molécula da STZ com a da glicose, permitindo que seja internalizada via transportadores GLUT-2 (Schnedl *et al.*, 1994; Verspohl, 2002).

A ação celular da STZ envolve a produção de ERO, que são capazes de promover alquilação de bases de DNA em vários níveis, as quais, quando reparadas, causam alterações no metabolismo das células β -pancreáticas, acarretando depleção de nicotinamida-adenina dinucleotídeo (NAD), conforme ilustrado na Figura 2 (Asplund *et al.*, 1984). Evidências apontam para o envolvimento do óxido nítrico (NO) na lesão da célula β -pancreática durante o diabetes induzido por STZ (Haluzik e Nedvidkova, 2000).

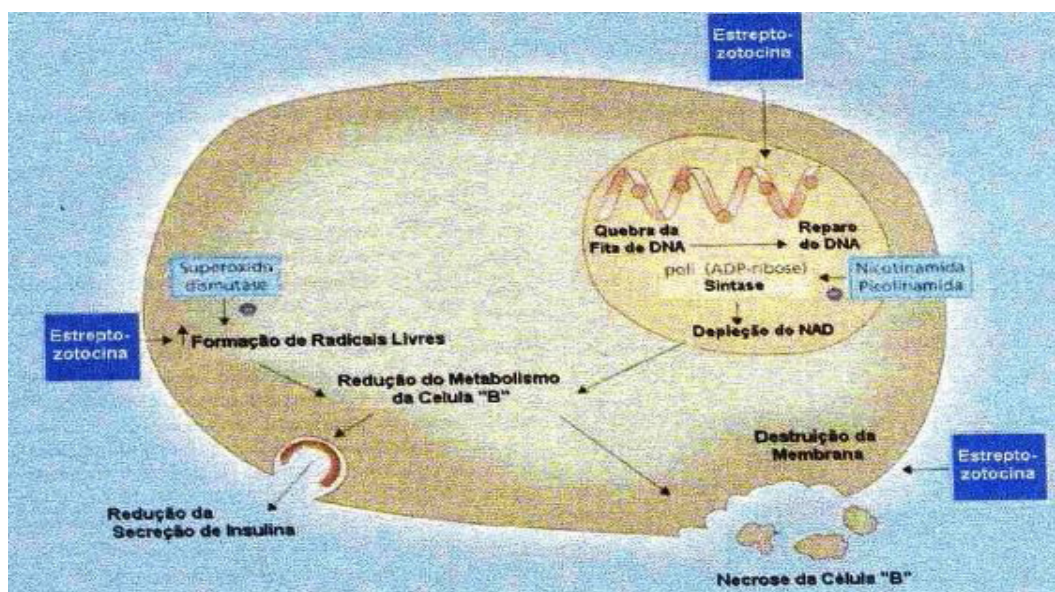


Figura 2: Atuação da STZ nas células β pancreáticas (produtoras de insulina) Adaptado de Pickup e Williams, 1988. DNA: ácido desoxirribonucléico; NAD: nicotinamida-adenina dinucleotídeo.

Estresse Oxidativo (EO):

O EO é definido como um desequilíbrio entre as substâncias oxidantes e as defesas antioxidantes, a favor dos oxidantes (Sies, 1993). Um importante aspecto do EO indica que a perda da sinalização óxido-redução é, às vezes, mais importante que o desequilíbrio pró-oxidante/antioxidante ou do dano tecidual induzido pelo desequilíbrio (Jones, 2006). As consequências do EO podem ser muito sutis ou muito agressivas, incluindo dano oxidativo às biomoléculas, interrupção do sinal de transdução, mutação e morte celular e isso depende do balanço entre a geração das espécies reativas formadas e das defesas antioxidantes presentes nas células (Halliwell e Whiteman, 2004).

As espécies reativas mais relevantes na biologia e na medicina são as de oxigênio, de nitrogênio e do cloro. Espécies reativas podem ser ou não um radical livre (RL), que é qualquer espécie química (átomo, molécula) capaz de existência independente, que possua um ou mais elétrons desemparelhados em qualquer orbital, normalmente no orbital mais externo. Espécie reativa de oxigênio (ERO) é

um termo coletivo que inclui os radicais do oxigênio e não radicais que são agentes oxidantes e/ou são facilmente convertidos em radicais (Del Maestro, 1980; Halliwell e Gutteridge, 1984; Southorn, 1988; Halliwell e Whiteman, 2004).

Dentre as espécies reativas, o RL ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é de grande importância por ser a primeira ERO gerada nas células. Várias outras espécies reativas de significado fisiológico são derivadas dele como produtos de uma reação em cascata (Munzel *et al.*, 2002), incluindo o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^{\bullet}) e o peroxinitrito ($ONOO^{\bullet-}$), este é derivado da reação entre o radical superóxido com o óxido nítrico. O $O_2^{\bullet-}$ pode ser produzido pela cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, por NADPH oxidase, xantina oxidase, ciclooxigenase, lipoxigenase, óxido nítrico sintase e citocromo P450 (Schnachenberg, 2002). A Tabela 1 mostra espécies reativas importantes no sistema biológico.

Tabela 1: Importantes espécies reativas no sistema biológico (adaptado de Halliwell, 2006).

| Radicais Livres | Não-radicais |
|---|-----------------------------------|
| Espécies Reativas de Oxigênio | Peróxido de hidrogênio, H_2O_2 |
| Superóxido, $O_2^{\bullet-}$ | Oxigênio singlet, 1O_2 |
| Hidroxila, OH^{\bullet} | Peróxidos orgânicos, ROOH |
| Peroxila, RO_2^{\bullet} | |
| Alcoxila, RO^{\bullet} | |
| Carbonato, $CO_3^{\bullet-}$ | |
| Espécies Reativas de Cloro | Ácido hipocloroso, HOCl |
| Cloro atômico, Cl^{\bullet} | Gás cloro, Cl_2 |
| | Nitro-cloro-benzeno, NO_2Cl |
| Espécies Reativas de Nitrogênio | Ácido nitroso, HNO_2 |
| Óxido nítrico, NO | Cátion nitrosila, NO^+ |
| Dióxido de nitrogênio, NO_2^{\bullet} | Ânion nitrosila, NO^- |
| | Tetraóxido dinitrogênio, N_2O_4 |
| | Trióxido dinitrogênio, N_2O_3 |
| | Peroxinitrito, $ONOO^{\bullet-}$ |
| | Ácido Peroxinitroso, $ONOOH$ |
| | Alquil Peroxinitrito, $ROONO$ |

As ERO's participam de várias funções fisiológicas e são parte integrante na defesa contra micro-organismos invasores. Elas são produzidas durante o metabolismo celular aeróbico normal e têm papel importante na manutenção do estado celular redox (Surh, 2005; Oktyabrsky e Smirnova, 2007).

As espécies reativas nem sempre são prejudiciais. Elas ajudam os fagócitos a eliminarem micro-organismos e a regularem eventos sinalizadores pela via redox e assim influenciar na fosforilação e desfosforilação de enzimas e fatores de transcrição (Halliwell, 2006). Algumas reações pró-oxidantes-antioxidantes foram resumidas na Figura 3.

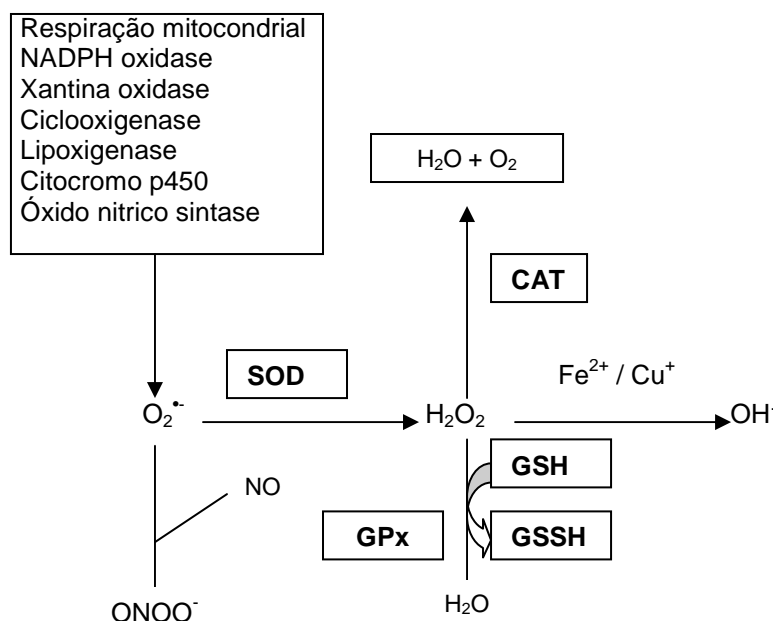


Figura 3: Reações pró-oxidantes/antioxidantes relevantes no sistema biológico. Adaptado de Schnachenberg, 2002. $O_2^{\bullet-}$: ânion superóxido; $ONOO^-$: peroxinitrito; NO: óxido nítrico; SOD: superóxido dismutase; CAT: catalase; OH^{\bullet} : radical hidroxila; H_2O : água; O_2 : oxigênio; H_2O_2 : peróxido de hidrogênio; GPx: glutatona peroxidase; GSH: glutatona reduzida; GSSH: glutatona oxidada; Fe^{2+} : íon ferroso; Cu^+ : cobre; OH^{\bullet} : hidroxila.

Quando um RL reage com um composto não radical, outro RL pode ser formado, induzindo, assim, as reações em cadeia, como é o caso da lipoperoxidação (LPO). Dessa forma, podem ser produzidos efeitos biológicos distantes do sítio de geração do primeiro RL formado. São efeitos gerais da peroxidação lipídica: diminuição da fluidez da membrana, dano das proteínas de membrana, desarranjos e inativação de receptores, de enzimas, de canais de íons e potenciação da lise celular (Halliwell, 2006).

O processo de LPO termina quando dois radicais peroxil reagem entre si, formam um tetróxido instável que se decompõe dando origem ao oxigênio *singlet*

(1O_2) e as carbonilas excitadas que retornam ao seu estado fundamental, emitindo quantas de luz visível (Russel, 1957). Podem ser medidas pelo processo de quimiluminescência (QL) e constituem-se num importante método de quantificação de LPO (Castro *et al.*, 1990). Outros lipídios hidroperóxidos também se decompõem numa reação catalisada por complexos de ferro e cobre, produzindo aldeídos como o malondialdeído (MDA), 4-hidroxyononal (4-HNE), hidrocarbonetos voláteis (como o gás etano e pentano) e outros produtos que podem ser detectados experimentalmente (Halliwell e Gutteridge, 1989; Lima e Abdalla, 2001).

Como citado anteriormente, o MDA é produto secundário da peroxidação lipídica por via enzimática, derivado da β -ruptura de ácidos graxos poli-insaturados, tais como ácido linoléico, araquidônico e docosahexanóico.

O desequilíbrio no estado redox tem efeitos potencialmente deletérios sobre a biologia celular. Por isso, existem vários mecanismos antioxidantes envolvidos na proteção das células e organismos para um eventual dano causado por quantidades excessivas desses mediadores altamente reativos (Soneja *et al.*, 2005; Blair, 2006).

Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, comparadas às de um substrato oxidável, retarda ou inibe significativamente a oxidação deste substrato. Os antioxidantes podem ser classificados em enzimáticos ou não enzimáticos (Halliwell e Gutteridge, 1989).

Entre as principais defesas antioxidantes enzimáticas (Figura 4) estão as enzimas superóxido dismutase (SOD), responsáveis pela dismutação do $O_2^{\bullet-}$, a catalase (CAT), responsável pela dismutação do H_2O_2 e glutathiona peroxidase (GPx). A GPx degrada, além do H_2O_2 , outros peróxidos (Droge, 2002; Halliwell e Gutteridge, 2007).

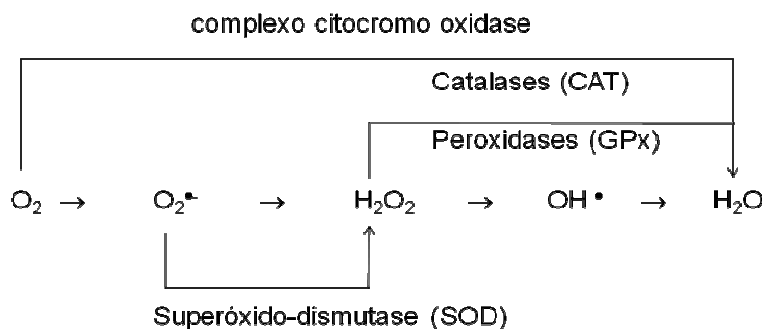


Figura 4: Mecanismo de defesa enzimática contra as ERO (Adaptado de Del Maestro, 1980). CAT: catalase; GPx: glutaciona peroxidase; O₂: oxigênio; O₂^{•-}: ânion superóxido; H₂O₂: peróxido de hidrogênio; OH[•]: radical hidroxila; H₂O: água; SOD: superóxido dismutase.

Entre as principais defesas antioxidantes não enzimáticas da célula estão as vitaminas C e E, os carotenóides, os flavonóides e a glutaciona. A glutaciona é considerada o antioxidante não enzimático hidrossolúvel mais importante por participar de inúmeras reações de óxido-redução (Blair, 2006; Oktyabrsky e Smirnova, 2007).

Estresse Oxidativo no DM:

A hiperglicemia ativa um mecanismo comum às quatro vias metabólicas anteriormente descritas através do aumento na produção do O₂^{•-} pela cadeia de transporte de elétrons mitocondrial. O EO é aceito como fator chave na mediação do desenvolvimento e progressão do diabetes e de suas complicações (Nishikawa *et al.*, 2000; Bonnefont-Rousselot, 2002; Evans *et al.*, 2003; Ceriello, 2003; Maritim *et al.*, 2003).

A hiperglicemia induz a aumento nos doadores de elétrons (NADH e FADH₂) e aumenta o fluxo de elétrons na cadeia transportadora mitocondrial. Conseqüentemente, ocorre aumento na relação ATP/ADP e hiperpolarização no potencial de membrana mitocondrial. Esta alta diferença de potencial eletroquímico gerada pelo gradiente de prótons leva a uma inibição parcial no complexo III do transporte de elétrons, resultando no acúmulo de elétrons na coenzima Q. Isto

levaria a uma redução parcial na formação de O_2 e à geração do RL $O_2^{\bullet-}$ (Korshunov *et al.*, 1997).

As ERO estariam aumentadas e seriam as principais responsáveis pelas alterações fisiopatológicas do DM (Ceriello *et al.*, 2003). Moléculas com elétrons desemparelhados, gerados a partir da hiperglicemia, podem reagir com o NO, que é um dos maiores sinalizadores biológicos em nosso organismo, e formar espécies reativas de nitrogênio (Squadrito e Pryor, 1995).

Fator de transcrição nuclear Kappa B (NF- κ B):

O NF- κ B é fator da transcrição que desempenha um importante e determinante papel, tanto em situações normais como na coordenação de respostas imunes adaptativas, regulando a expressão de muitos mediadores celulares (Zingarelli *et al.*, 2003).

Este fator foi descrito primeiramente em 1986 por Sen e Baltimore, sendo capaz de ligar-se a sítios específicos kappa no *enhancer* das imunoglobulinas em células B (Sen e Baltimore, 1986). Está bem estabelecido que NF- κ B está expresso na maioria dos tipos celulares, sendo constituído por um dímero composto dos membros da família da Rel.

A família do NF- κ B/Rel compreende cinco subunidades, chamadas p50, p52, p65 (RelA), c-Rel, e RelB. Tais subunidades formam homodímeros e heterodímeros em várias combinações. Geralmente, o NF- κ B consiste em dois polipeptídeos: um de 50 kDa (p50) e um de 65 kDa (p65). Em células em homeostase, o NF- κ B mantém-se no citoplasma em sua forma inativa, associado com as proteínas inibidoras do sítio kB, chamadas de inibidores kB (I κ B). Sete espécies de I κ Bs são descritas: I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ , Bcl-3, p100, e p105. (Zingarelli *et al.*, 2003).

Alterações na regulação do NF- κ B estão associadas a diversas doenças crônicas como DM, aterosclerose, artrite reumatóide e asma (Barnes e Karin, 1997; Evans *et al.*, 2002).

Diversos estudos clínicos foram realizados, utilizando-se pacientes com DM e avaliando a ativação do NF- κ B. O trabalho realizado por Hofmann e colaboradores (1998) avaliou pacientes com DM tipo I que possuíam controle glicêmico insuficiente. Houve maior ativação em células mononucleares sanguíneas periféricas, bem como uma correlação positiva entre a ativação do NF- κ B e o EO (Hofmann *et al.*, 1998). Schiekofer e colaboradores (2006) avaliaram pacientes com DM tipo I e concluíram que a normalização dos níveis de glicose sanguínea resulta na redução da ativação do NF- κ B.

Trabalhos experimentais também avaliaram a ativação do NF- κ B em animais diabéticos. Dias e colaboradores (2005) mostram que animais diabéticos apresentaram aumento na ativação do NF- κ B e que, após o tratamento com o antioxidante quercetina, a ativação deste fator diminuiu. Kwon e colaboradores (2006) mostraram que o NF- κ B está ativado em camundongos diabéticos induzidos por STZ e que o pré-tratamento com extrato da casca de *Cinnamomum cassia*, chamado de *Cortex cinnamomi* preveniu a ativação do fator de transcrição - κ B.

Para ativar o NF- κ B, são necessários estímulos intracelulares e ou extracelulares, cujos ativadores podem ser produtos bacterianos (endotoxinas, peptidoglicanos), vírus e componentes virais, protozoários, citocinas (fator de necrose tumoral [TNF- α], interleucinas), ligação de AGEs com seu receptor RAGE, hiperglicemia, RL e ou oxidantes (Zingarelli *et al.*, 2003 Verma, 2004; Ahmed, 2005).

A via intracelular mais investigada atualmente é a existente entre a hiperglicemia e o EO, em que o NF- κ B é o principal envolvido. Este fator regula a expressão de um grande número de genes, incluindo os que possuem grande ligação com as complicações do DM (Evans *et al.*, 2003).

A ativação do NF- κ B (Figura 5) requer a fosforilação de seus inibidores fisiológicos (particularmente o I κ B α) em resíduos específicos de Serina (Ser-32 e Ser-36). Tal fosforilação é mediada por um complexo protéico. O complexo quinase kappa B (IKKs) é composto de três subunidades, duas unidades catalíticas IKK- α , IKK- β , e uma unidade reguladora IKK γ (NF- κ B essencial modulador, NEMO). Após a

fosforilação, ocorre a subsequente degradação das IκBs através das ubiquitinas, formando um proteossoma 26S (Yamaoka *et al.*, 1998). A degradação proteolítica dos IκBs permite a translocação do NF-κB ao núcleo. No núcleo, o NF-κB regula a expressão de genes, incluindo fatores de crescimento, citocinas pró-inflamatórias, moléculas de adesão e RAGE. Muitos produtos dos genes regulados pelo NF-κB também funcionam como seus próprios ativadores, tal como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), TNF-α, interleucina 1 beta (IL1-β) e RAGE. (Didonato *et al.*, 1997; Karin, 1999).

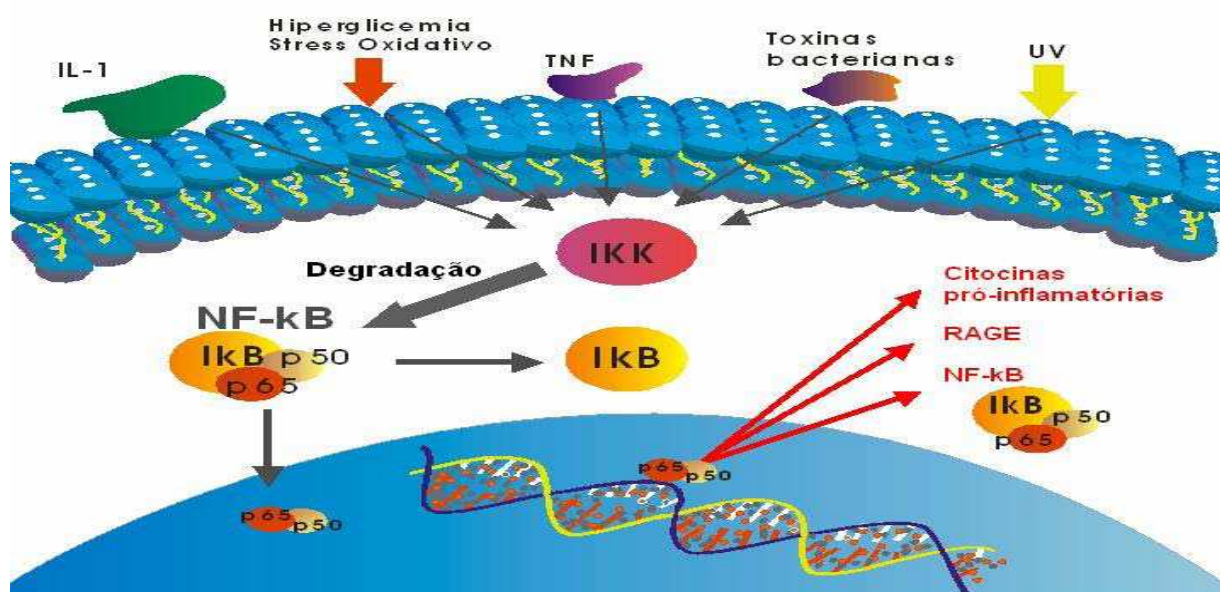


Figura 5: Vias de ativação do NF-κB. Representação esquemática da translocação nuclear da molécula de NF-κB ativada frente diversos estímulos como hiperglicemia, estresse oxidativo, infecção, citocinas e radiação ultravioleta. No núcleo o NF-κB promove a transcrição de diversos moduladores como citocinas pró-inflamatórias e RAGE. IL-1: interleucina 1; TNF: fator de necrose tumoral; UV: raios ultra-violetas; NF-κB: fator transcrição kappa b; IκB: inibidor Kappa B p65: subunidade do NF-κB; p50: subunidade do NF-κB; IKK: inibidor kappa quinase.

Cirurgia Metabólica como tratamento do DM tipo 2:

Nos últimos anos, a cirurgia metabólica vem sendo muito estudada com o intuito de tratar o DM tipo 2 e resultados de remissão sustentada em mais de 80% dos pacientes vem sendo demonstrados. As principais técnicas que têm demonstrado sucesso na remissão do diabetes são o *Duodenal Switch* e Derivação biliopancreática/Scopinaro com mais de 90% de remissão e o *Bypass Gástrico em Y*

de Roux – BGYR com 80% de resolução do DM2 (Scopinaro *et al.*, 2005; Buchwald *et al.*, 2004; Dixon *et al.*, 2005). A idéia de se tratar o DM tipo 2 em pacientes com sobrepeso ou obesidade leve a moderada está levando os pesquisadores a desenvolverem uma técnica que controle os níveis glicêmicos sem levar a uma perda de peso muito importante. Sendo assim, além das técnicas consagradas, outras mais recentemente desenvolvidas vêm sendo estudadas, como é o caso da Banda Gástrica Ajustável, Interposição Ileal e Manga Duodenal (Mari *et al.*, 2006; Chiellini *et al.*, 2009; Cohen *et al.*, 2006). Por se tratarem de técnicas cirúrgicas relativamente novas, estas cirurgias devem ser testadas inicialmente em modelos experimentais animais, antes de serem aplicada a seres humanos (Rubino *et al.*, 2010). Além do uso do estudo de novas técnicas, os modelos experimentais também são utilizados para avaliar o metabolismo dos carboidratos e o papel dos hormônios intestinais (incretinas) no controle da glicemia e deveriam preceder todos os estudos em humanos quando novas técnicas são desenvolvidas (Rubino *et al.*, 2004; Mistry *et al.*, 2009; Patriti *et al.*, 2006; Inabnet *et al.*, 2009). Recentemente, a *International Diabetes Federation* (IDF) publicou a sua posição em relação ao tratamento cirúrgico do DM tipo 2. Neste documento a IDF recomenda que a cirurgia metabólica deva ser considerada como um tratamento aceitável para pacientes com diabetes de difícil controle e índice de massa corporal (IMC) entre 30 e 35 kg/m². Isto vem a corroborar a importância do tratamento cirúrgico do diabetes mesmo em pacientes sem obesidade mórbida (IDF Statement 2011).

Papel das Incretinas no controle glicêmico:

É muito recente o conceito de efeito incretínico e de eixo enteroinsular, ou seja, a interação entre os hormônios, o intestino e as glândulas anexas ao sistema digestório. O eixo enteroinsular é uma estreita interação entre os hormônios produzidos localmente nas células intestinais que controlam a produção e liberação de insulina pelo pâncreas. O efeito incretínico é a capacidade de determinados procedimentos ou medicações em alterar alguns dos componentes do eixo enteroinsular levando a uma melhora dos níveis glicêmicos e conseqüentemente do controle do diabetes (Mingrone *et al.*, 2009; Wietzycoski *et al.*, 2010). A exclusão da

passagem do alimento pelo duodeno e pela porção proximal do jejuno configura a chamada teoria do intestino proximal ou *foregut theory*. Por outro lado, o desvio do intestino delgado proximal expõe precocemente o íleo distal aos nutrientes, aumentando a secreção de peptídeo glucagon-like 1 (GLP-1) e peptídeo YY (PYY) (Thaler et al, 2008). Este estímulo precoce do alimento no íleo, levando a produção de hormônios intestinais locais leva o nome de teoria do intestino distal, ou *hindgut theory*. As técnicas cirúrgicas desenvolvidas para tratamento do diabetes, baseadas nessas duas teorias, ou retiram o duodeno do trânsito intestinal ou fazem com que o alimento chegue mais rápido ao íleo distal, ou ainda, usam ambos os mecanismos. Outra teoria é a da Grelina, hormônio orexigênio produzido no fundo gástrico. Através desta teoria, a retirada do fundo gástrico levaria a uma diminuição do apetite, perda de peso e melhora dos níveis glicêmicos, este último efeito decorre de mecanismo ainda não esclarecido (Vetter et al, 2009, Thaler et al, 2008)

Novas técnicas cirúrgicas:

O efeito da cirurgia que mistura exclusão duodenal e o contato precoce de nutrientes na porção final do intestino delgado sobre as incretinas tem sido relatado em vários estudos (Guidone *et al.*, 2006; Masson, 1999; Stradder *et al.*, 2005). O conceito de “incretinas” foi definido como fatores secretados pelo intestino em resposta à glicose oral, ou sobrecarga de lipídios e capaz de aumentar a secreção de insulina induzida por glicose (Creutzfeldt, 1979). Os pacientes severamente obesos que foram submetidos à cirurgia de *Bypass* Biliopancreático, com ou sem *Switch* duodenal mostram melhores resultados na redução de DM tipo 2 (98,9 %), em comparação com pacientes em que foi realizada a cirurgia de *Bypass* gástrico com reconstrução em Y-de-Roux (83,7%) (Buchwald, *et al.*, 2004). Atualmente, acredita-se que isto é resultado da produção aumentada do GLP-1, um peptídeo produzido pelas células L do íleo terminal e cuja secreção está relacionada ao contato direto de nutrientes com a mucosa do íleo terminal (Lim e Brubaker, 2006; Service *et al.*, 2005).

Em 1977, Barry *et al.* descreveram níveis séricos elevados de enteroglucagon depois de uma cirurgia de *Bypass* gástrico (Barry *et al.*, 1977), enquanto em 1981, Sarson *et al.* demonstrou um aumento de nível semelhante em pacientes severamente obesos submetidos à cirurgia de *bypass* jejunoileal e cirurgia de *bypass* biliopancreático (Sarson *et al.*, 1981). Hoje, acredita-se que o enteroglucagon mencionado nas primeiras publicações provavelmente tenha sido o GLP-1 (Guidone *et al.*, 2006). Em 1998, Naslund *et al.* demonstrou que o aumento dos níveis de GLP-1 permanece em pacientes que foram submetidos à cirurgia de *bypass* jejunoileal mesmo depois de 20 anos (Naslund *et al.*, 1998).

Os efeitos positivos de GLP-1 sobre as células β -pancreáticas foram extensivamente demonstrados. As suas ações insulínótropas proliferam e o efeito de anti-apoptose em células β pode ser destacado (Lim e Brubaker, 2006; Farilla *et al.*, 2003; Holz *et al.*, 1993). Em consequência desses estudos, ultimamente novas drogas para tratar o DM tipo 2 surgiram baseadas em análogos do GLP-1 (Exendin-4), bem como no inibidor da enzima responsável pela sua degradação (dipeptidil peptidase-4, ou DPP4). Estes medicamentos, além de extremamente caros, demonstram efeitos colaterais importantes, desta forma não sendo utilizados em grande escala na prática clínica. Considerando os resultados positivos da cirurgia bariátrica em controlar o nível de glicose, atualmente modificações nessas abordagens cirúrgicas foram sugeridas, as quais permitem restringir o seu efeito na perda ponderal e assim permitir que essa cirurgia possa ser recomendada para o tratamento de pacientes com DM2 e IMC menor que 35.

Em 1998, Noya *et al.* executaram em 10 pacientes com DM tipo 2, hipercolesterolemia, e IMC entre 24 e 38, uma cirurgia de *bypass* biliopancreático com *switch* duodenal sem realizar gastrectomia vertical (Noya *et al.*, 1998). Neste estudo, a alça alimentar foi de 200 cm com alça comum de 50 cm (Figura 6).

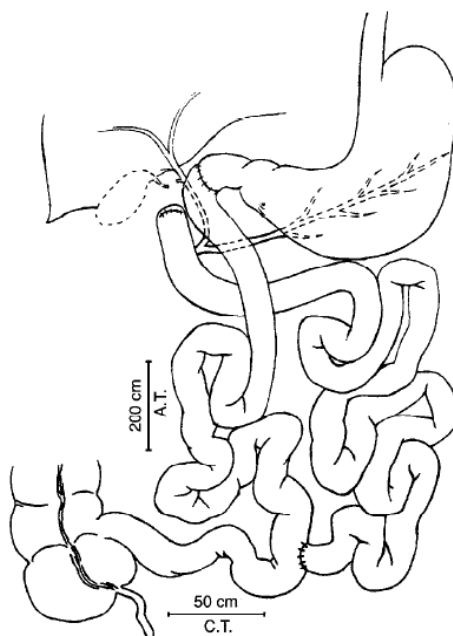


Figura 6: Cirurgia proposta por Noya *et al.*, 1998.

Os resultados mostraram uma pequena redução ponderal e uma redução completa da hipercolesterolemia e DM tipo 2. Duas abordagens cirúrgicas que apresentaram o mesmo objetivo atraíram a atenção da comunidade científica. A primeira foi sugerida por Rubino *et al.*, a qual é baseada na exclusão duodenal com anastomose duodeno-jejunal e reconstrução em Y-de-Roux a 80 cm da primeira anastomose (teoria do intestino proximal ou *foregut theory*) (Figura 7) (Rubino *et al.*, 2004).

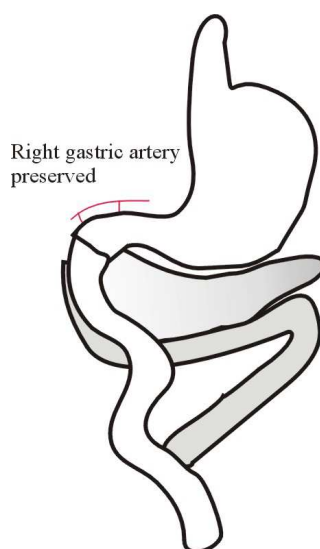


Figura 7: Abordagem cirúrgica proposta por Rubino *et al.*, 2004.

A teoria de exclusão duodenal (*foregut theory*) é baseada na secreção de uma substância desconhecida quando os nutrientes estão passando pelo duodeno, com um efeito contra-regulador na produção de insulina. Em adição ao efeito bem conhecido de induzir secreção de incretinas, os nutrientes também estimulariam esta substância que atuaria como uma substância anti-incretinica, cujo objetivo seria a prevenção da hipoglicemia. Esta substância atuaria como um inibidor incretinico, ou como um inibidor dos efeitos da insulina. Em pacientes suscetíveis, a estimulação crônica de certos nutrientes causaria um desequilíbrio entre a substância incretínica e a anti-incretina, resultando em resistência a insulina e DM tipo 2 (Rubino *et al.*, 2002). Originalmente esta técnica proposta por Rubino *et al.*, foi executada em ratos Goto-Kakizaki, um modelo de animais não-obesos com DM tipo 2 (Galli *et al.*, 1996).

A segunda abordagem é a transposição ileal proposta por Koopmans *et al.* (Figura 8) (Koopmans *et al.*, 1982), onde o íleo terminal é precocemente exposto aos nutrientes, resultando na estimulação de células L que existem nesta área, bem como o aumento da substância GLP-1 (teoria do intestino Distal, ou *hindgut theory*).

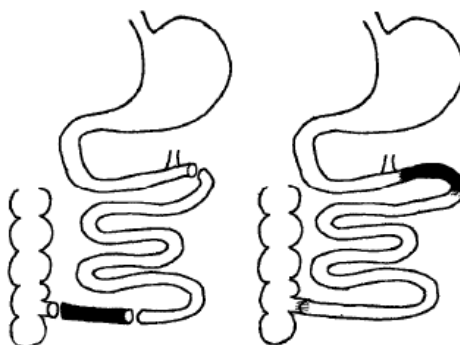


Figura 8: Técnica proposta por Koopmans *et al.*

Este estudo foi executado em ratos, mas mostrou aumento da taxa de mortalidade e complicações sérias, portanto esta técnica não foi recomendada para seres humanos.

A técnica proposta por Rubino *et al.* foi usada em vários protocolos, tanto no México como na América do Sul. Contudo, examinando alguns dados desta técnica é possível identificar vários aspectos negativos, que podem ser melhorados, como:

1. A execução de uma anastomose duodenojejunal no estômago inteiro é positivamente um modelo ulcerogênico, sendo necessário o uso em longo prazo de drogas antiulcerogênicas;

2. A execução de uma anastomose duodenojejunal no espaço sub-hepático é muito difícil;

3. Segundo os estudos feitos por Rubino *et al.* a sua técnica não contribui para aumentar os níveis de GLP-1 e este é o hormônio que se associou aos efeitos da redução de DM tipo 2 na cirurgia bariátrica.

Proposta cirúrgica para este estudo:

O propósito deste estudo foi desenvolver uma nova abordagem cirúrgica, que compreende os aspectos positivos daquelas baseadas na teoria do *hindgut* e do *foregut* e avaliar as suas repercussões sistêmicas e em órgãos alvo.

A primeira modificação sugerida pelos autores deste projeto nesta abordagem foi a ligadura da artéria gástrica direita proposta por Sugiyama *et al.*, 2000, como uma alternativa da conservação do piloro na duodenopancreatectomia (DPT) (Figura 9).

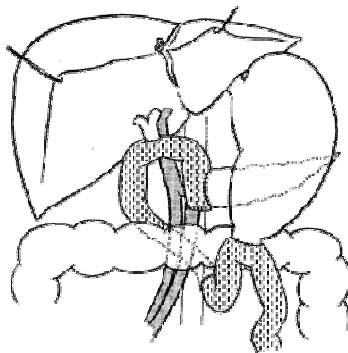


Figura 9: Mudança na técnica da DPT original através da ligadura da artéria gástrica direita (Sugiyama *et al.*, 2000).

Esta variação permite a inatividade da porção piloro-duodenal pela ligadura da artéria gástrica direita, assim, permitindo a anastomose duodenojejunal ser executada em uma posição mais cômoda e de um modo menos tenso, melhorando o esvaziamento gástrico e, por isso, reduzindo o tempo de recuperação pós-operatória.

A segunda modificação a ser estabelecida é uma anastomose duodenojejunal término-lateral a meio caminho do ângulo de Treitz até o íleo terminal. Com a anastomose duodenojejunal término-lateral o trânsito de bile previne o desenvolvimento de úlcera anastomótica, como a presença do piloro previne o refluxo de bile ao estômago. A ocorrência da úlcera anastomótica na DPT varia entre 0 a 2 %, comparando-se com 30 % descritos por Rubino *et al.* no seu modelo dos animais.

A alça biliopancreática com 50 % do intestino delgado é baseada na experiência de Scopinaro *et al.*, 2005, que publicou o processo da sua técnica onde eles usaram a alça biliopancreática na porção média entre o ângulo de Treitz e a válvula ileocecal. Este grupo de pacientes mostrou uma boa resposta metabólica (a remissão do diabetes e da hiperlipidemia) provavelmente devido à estimulação precoce de células L, que produzem o GLP-1, mas sem perda ponderal. Segundo a técnica original de Scopinaro *et al.*, uma extensa gastrectomia distal é executada, o que aumentaria a morbimortalidade pós-operatória, e isto é a razão por que este modelo não pode ser executado exatamente como foi descrito.

Na técnica cirúrgica proposta por este trabalho (Figura 10) é possível executar uma anastomose mais fácil, única (que teria preços mais baixos e menos morbidade) com menos ocorrência de úlcera anastomótica, inclusive de fácil execução por via laparoscópica. Esta técnica também permitiria reunir ambas as teorias (*foregut* e *hindgut*) na remissão do diabetes no período pós-operatório da cirurgia bariátrica, pela exclusão do duodeno e estimulação precoce das células L do íleo terminal (Marchesini, 2007).

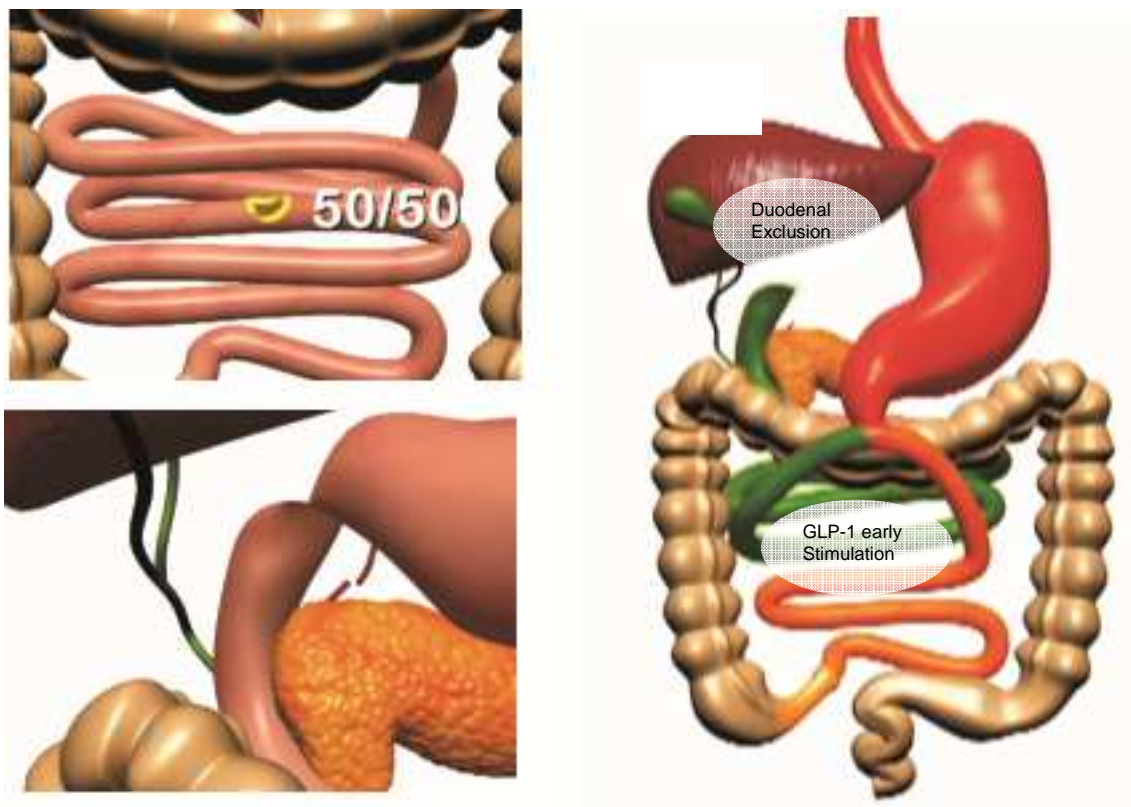


Figura 10: Modelo da nova técnica proposta por Marchesini.

Modelos experimentais em cirurgia metabólica:

Existem vários modelos experimentais de ratos em obesidade, diabetes e metabolismo. Os modelos em diabetes normalmente são divididos quanto ao modo de surgimento da doença: surgimento espontâneo por cruzamentos isogênicos (genético), induzido por dieta ou por drogas. Como ratos não obesos com DM tipo 2 seria o modelo experimental para nossos experimentos, as opções da literatura seriam: Goto Kakizaki (Goto *et al.*, 1976), Cohen Rat (Weksler-Zangen *et al.*, 2001), Torri Rat (Shinohara *et al.*, 2000) e modelos utilizando ratos Wistar ou Sprague-Dawley induzidos exclusivamente por dieta ou drogas, ou por associação destas duas. O modelo experimental animal considerado ideal por muitos autores para estudo dos efeitos da cirurgia metabólica em animais diabéticos é o rato Goto-Kakizaki (Rubino *et al.*, 2004; Mistry *et al.*, 2009; Inabnet *et al.*, 2009). Estes animais possuem um DM2 de surgimento espontâneo através de cruzamentos isogênicos e o padrão glicêmico é considerado bastante semelhante ao padrão do humano com DM tipo 2 (Mistry *et al.*, 2009).

No entanto, algumas dificuldades permeiam as tentativas de realização de experimentos com estes animais, especialmente no Brasil. Existe uma grande dificuldade na realização da importação destes animais, por vários fatores: custos elevados, barreiras alfandegárias, sanitárias e legais, o que impossibilitou a importação pelo nosso grupo de pesquisa, mesmo após 2 anos de tentativas infrutíferas. Outro ponto crucial e que normalmente é pouco relatado pela literatura, a alta mortalidade destes animais quando submetidos à cirurgia metabólica, podendo chegar a mais de 90% (Inabnet *et al.*, 2009). Além da alta mortalidade e difícil manejo pós-operatório já descritos, outros problemas dificultam a utilização do Goto Kakizaki para pesquisas no nosso meio. Os dois principais motivos são custo elevado e dificuldade na importação. A dificuldade devido aos custos foi suplantada através de apoio financeiro externo, no entanto, as barreiras legais de importação impediram a entrada dos Goto Kakizaki no país. O Rato Cohen (é um modelo com predisposição genética e que tem o diabetes induzido através de dieta específica, no entanto, o grupo que descreveu o modelo não disponibiliza o animal para venda, apenas para uso no próprio laboratório. O Rato Torri, modelo também genético, de origem japonesa, nunca foi utilizado para pesquisa em cirurgia metabólica e teríamos as mesmas dificuldades em importação que tivemos com o Goto Kakizaki. Os modelos baseados em indução do DM tipo 2 através de dieta exclusiva, normalmente se acompanham de obesidade e a indução é irregular quanto ao grau de hiperglicemia. Deste modo, optamos por realizar a indução do DM2 em ratos Wistar nacionais com baixo custo e fácil manejo.

Uma revisão sobre modelos experimentais em diabetes (Islam *et al.*, 2009) mostra que a popularidade do uso de modelos não-espontâneos induzidos experimentalmente para pesquisa sobre diabetes demonstram-se promissores devido ao custo relativamente baixo, a facilidade de indução do diabetes, facilidade de manutenção e maior disponibilidade em relação aos modelos espontâneos induzidos geneticamente. O uso desses modelos, no entanto, não é livre de limitações. Um modelo de DM tipo 2 deveria, idealmente, retratar a patogênese e o perfil bioquímico idêntico ao diabetes tipo 2 em humanos.

Os vários modelos de DM tipo 2 induzidos experimentalmente em ratos foram desenvolvidos ao longo dos últimos 30 anos e incluem: modelos adultos com STZ, induzidos com aloxano, neonatal com STZ, modelos de pancreatectomia parcial, alimentados com dieta altamente gordurosa, modelos de dieta altamente gordurosa com STZ, entre outros (Islam, 2009).

Desta forma, imbuídos no espírito da pesquisa básica em cirurgia experimental, buscamos dentre os acima um modelo experimental que pudesse ser considerado ideal para a realidade do nosso país. Um modelo com custo aceitável, que tivesse um DM2 reproduzível, com baixa mortalidade e que fosse em alguns aspectos semelhante ao diabetes dos humanos. Foi optado então por um modelo descrito ainda na década de 80, onde um comportamento glicêmico semelhante ao DM tipo 2 dos humanos é adquirido através de indução com STZ no período neonatal (Portha *et al.*, 1989).

Conforme este modelo, a injeção intraperitoneal de STZ, um antibiótico e antitumoral que destrói as células β -pancreáticas, em ratos recém-nascidos, levaria ao DM2 quando os ratos tivessem em torno de 10 semanas de vida. Essa técnica de indução leva a um diabetes leve a moderado, não dependente de insulina e que é piorado com dietas hipercalóricas, bastante semelhante ao que ocorre em humanos. (Portha *et al.*, 1989; Islam *et al.*, 2009). Os nossos achados iniciais confirmaram esta hipótese, no entanto, os dados quanto à manutenção da hiperglicemia ao longo do tempo ainda são pouco consistentes na literatura. Além disso, dados quanto às alterações no perfil lipídico, estresse oxidativo e atividade inflamatória neste modelo ainda são pouco conhecidos. Como este modelo tem grande potencial para realização de estudos em cirurgia metabólica no intuito de tratar o DM tipo 2, o conhecimento do comportamento do DM tipo 2 e do perfil lipídico em longo prazo é crucial neste modelo experimental. Além disso, sabemos que existe na literatura um bom conhecimento do modelo de DM tipo 1 induzido pela STZ em ratos já adultos, inclusive com estudos demonstrando modificações nos marcadores de estresse oxidativo e alterações pulmonares do diabetes nestes animais (Forgiarini *et al.*, 2010). No entanto, estes dados, no modelo de DM tipo 2 induzido por STZ, ainda não são conhecidos na literatura, sendo esta uma área bastante interessante para a cirurgia experimental.

Existem diversos estudos experimentais em cirurgia metabólica com diversas técnicas, todas elas de difícil execução e alta mortalidade (rubino, interposição e *sleeve*). Na tentativa de simplificar a técnica cirúrgica e estudar o papel do intestino distal na homeostase da glicose, hipotetizamos que uma Duodenojejunostomia término lateral realizada em ratos diabéticos, levaria a um controle da glicemia através da chegada precoce do alimento no íleo distal e conseqüente liberação de substâncias incretínicas. Baseados no relato prévio da técnica da Duodenojejunostomia (Marchesini, 2007), elaboramos este estudo para avaliar as alterações desta técnica no perfil metabólico, perfil lipídico, atividade inflamatória e estresse oxidativo de ratos diabéticos tipo 2 induzidos por STZ.

JUSTIFICATIVA:

A execução deste estudo se justifica na medida em que a técnica cirúrgica a ser utilizada foi apenas descrita na literatura, ainda não tendo sido realizada em caráter experimental, não sendo conhecida sua exeqüibilidade e os resultados em termos de controle metabólico e repercussões no quadro inflamatório e estresse oxidativo. O conhecimento dos mecanismos e resultados desta técnica em animais de experimento diabéticos pode ser o primeiro passo para uma nova técnica cirúrgica para tratamento de indivíduos diabéticos não obesos.

OBJETIVO GERAL:

O objetivo geral foi avaliar a repercussão de uma cirurgia metabólica (Duodenojejunostomia) em ratos diabéticos induzidos com STZ no período neonatal.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Avaliar os efeitos da duodenojejunostomia sobre:

- Os níveis de glicemia, triglicerídeos, colesterol total, HDL, LDL e VLDL;
- a LPO mediante a determinação das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no tecido pulmonar e hepático, bem como sanguíneo;
- a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT no tecido pulmonar, hepático e sanguíneo;
- expressão de TNF- α através do método de ELISA;
- expressão da subunidade p65 do NF-kB.

MATERIAIS E MÉTODOS:

Animais de experimento:

O trabalho foi desenvolvido na Unidade de Experimentação Animal (UEA) do HCPA, seguindo as orientações do *Ethical Code for Animal Experimentation* da OMS aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta instituição. Foram utilizados 24 ratos machos albinos da linhagem Wistar com aproximadamente dois dias de vida, gerados na própria UEA. Após o desmame os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro (12h/12h), em ambiente com temperatura controlada de 22 ± 2 °C com ração específica para ratos Labina (Purina Rat Chow®) e água *ad libitum*.

Indução do DM tipo 2 experimental:

Em 16 animais foi injetado 100mg/Kg de STZ em tampão citrato pH 4,5 por via intraperitoneal (i. p.). Após 10 semanas, foi realizada a confirmação da indução nos ratos através de Teste de Tolerância a Glicose Intraperitoneal (TTGIP) utilizando-se 2g/kg de glicose i. p. seguida de medida de glicemia por punção da cauda do rato e retirada de sangue suficiente para exame com fita de glicemia em aparelho de glicemia capilar MediSense Optium (Abbott Diabetes Care Inc, Alameda - CA) nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos. Animais com elevação da glicemia após glicose i. p. e manutenção de níveis maiores ou iguais a 200mg/dL após 120 minutos eram considerados diabéticos. Em outros 8 animais foi injetado apenas tampão citrato pH 4,5 por i. p. e realizado o mesmo TTGIP após 10 semanas.

Protocolo Experimental:

Após o TTGIP, descrito acima, os animais diabéticos foram divididos em 2 grupos, aleatoriamente. Um grupo com 8 animais que seriam submetidos a cirurgia

metabólica, configurando o Grupo Diabetes operado (DM+OP) e outro grupo com 8 animais diabéticos (DM) que seguiram apenas acompanhamento clínico. Finalmente, os 8 animais em que foi injetado apenas tampão citrato, sem STZ, formaram o Grupo Controle (CO). Ao completarem 12 semanas de vida, os ratos do grupo DM+OP foram submetidos a uma duodenojejunostomia término-lateral, com o objetivo de controlar os níveis glicêmicos nestes animais.

Técnica Cirúrgica:

Os experimentos animais foram executados na Unidade de Experimentação Animal (UEA) do HCPA – Porto Alegre, sob supervisão de Médica Veterinária especializada no cuidado de animais de experimentação.

Grupos cirúrgicos: No dia anterior ao procedimento cirúrgico os ratos foram mantidos em jejum parcial, receberam por 18hs apenas uma solução de glicose a 5% diluída em mesmo volume de Soro fisiológico 0,9%, a fim de diminuir a quantidade de resíduo sólido no estômago e evitar desidratação e hipoglicemia.

A indução anestésica foi realizada com uma mistura de oxigênio e Isoflurano a 0,5% através de máscara facial apropriada. Quando atingido o plano anestésico ideal, avaliado pela Médica Veterinária da Unidade, a manutenção se deu pelo uso do mesmo isoflurano em concentrações entre 0,3 e 0,4% enriquecido com oxigênio. Uma dose única intramuscular de 5mg/Kg de Enrofloxacino (Baytril, Bayer, Shawnee Mission, KS) foi administrada em cada animal antes do início do procedimento cirúrgico, para a profilaxia da infecção pós-operatória.

Os animais foram colocados em uma mesa cirúrgica aquecida, com os membros fixados por fita e submetidos a laparotomia mediana mínima com 1,5 a 2 cm, identificação do duodeno e secção do mesmo a 0,5 cm do piloro. Realizado o fechamento do coto duodenal com Prolene 6-0 (Ethicon). Foi então identificado o ponto da anastomose aos 50 cm proximal ao ceco, realizada incisão longitudinal na alça e confecção de anastomose duodenojejunal término-lateral com pontos contínuos em plano único de Prolene 6-0 com auxílio de lupa. Durante o ato operatório, a cada 10 minutos, era injetado na cavidade um volume de 5 mL de Solução fisiológica aquecida que foi repetida imediatamente antes do fechamento.

Esse artifício teve o objetivo de prevenir a desidratação e hipotermia transoperatória e promover uma rehidratação no pós-operatório imediato.

Após o procedimento, foi injetada na cicatriz da laparotomia uma dose de 3mg/Kg de Cloridrato de Bupivacaína 0,5% (Hypofarma Ltda, MG) para anestesia local e 5 mg/kg de Cloridrato de Tramadol (Tramal® Pfizer Ltda, SP) intramuscular, para analgesia sistêmica. No pós operatório os animais foram mantidos por 6 horas em NPO em incubadora aquecida e com oxigênio suplementar. Seis horas depois foi reintroduzida solução dada no pré-operatório (Soro fisiológico e soro glicosado) e doze horas após a cirurgia foi liberada a dieta habitual.

Seguimento pós-experimento:

Os animais foram seguidos por 90 dias após a cirurgia, quando os animais já estavam, portanto, com 6 meses de vida. O peso corporal de cada animal foi avaliado em uma balança eletrônica digital no dia da cirurgia (dia zero) e a cada 7 dias. Os níveis de glicose e TTGIP, conforme já descrito, foram avaliados em 0, 15, 30, 60 e 90 dias de pós-operatório. As amostras de sangue foram retiradas da cauda dos ratos através de glicosímetro portátil. Ao completarem 90 dias de pós-operatório, os animais de ambos os grupos sofreram eutanásia através de aprofundamento do nível anestésico com uma dose de 300 mg/Kg de quetamina e 60 mg/Kg de xilazina. Foram imediatamente coletadas amostras de sangue arterial e venoso para exames laboratoriais. Em seguida foi realizada toracolaparotomia, inventário da cavidade e coleta de pulmão, fígado, pâncreas e gordura intraabdominal.

Os animais dos Grupos DM e CO foram mantidos no mesmo ambiente dos animais operados, com dieta padrão livre e foram submetidos à medidas de peso e de glicose seguindo os mesmos períodos do grupo cirúrgico.

Testes bioquímicos:

Amostras de sangue venoso foram coletadas através de punção cardíaca e centrifugadas a 4000 rpm, durante 15 minutos. Após a centrifugação o soro foi separado e congelado a -80°C. Os eritrócitos foram lavados três vezes com solução fisiológica 0,9% com intervalos de centrifugação entre as lavagens. Os eritrócitos foram separados em tampão sulfato de magnésio e ácido acético, para a realização das análises de enzimas antioxidantes no sangue.

As amostras de soro foram utilizadas para a realização de ensaio imunoenzimático (ELISA) para TNF- α e para realização dos exames de glicemia, triglicerídeos, colesterol (HDL, LDL e VLDL) através de kits comerciais da Labtest[®] e o procedimento seguiu o preconizado pelo fabricante.

Preparação do homogeneizado:

Utilizou-se 9 mL de solução tampão fosfato por grama de tecido. Homogeneizou-se o órgão em Ultra-Turrax durante um minuto à temperatura de 4°C. Centrifugou-se por 10 minutos a 3000rpm em centrífuga refrigerada. O precipitado foi desprezado e o sobrenadante retirado e congelado no freezer a - 80° C para posterior utilização nas dosagens.

Dosagem de proteínas:

A concentração de proteínas no homogeneizado foi determinada utilizando o método de Bradford, que utiliza como padrão uma solução de albumina bovina (Sigma Aldrich[®]). As amostras foram mensuradas espectrofotometricamente em 595 nm e os valores expressos em mg/mL (Bradford 1976). Sendo essa utilizada para os cálculos de TBARS, enzimas antioxidantes e cálculo de proteínas a serem aplicadas no gel de *Western Blot*.

Avaliação da lipoperoxidação:

A técnica de TBARS consiste no aquecimento do homogeneizado com ácido tiobarbitúrico e na conseqüente formação de um produto corado, medido em espectrofotômetro a 535nm. O aparecimento da coloração ocorre devido à presença do malondialdeído e outras substâncias provenientes da peroxidação lipídica no material biológico.

As amostras de tecido foram pipetados em microtubos, nesta ordem de adição, 0,25mL de ácido tricloroacético (TCA) 10%, 0,10mL do homogeneizado, 0,067mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67% e 0,033mL de água destilada. O TBA reage com produtos da lipoperoxidação formando uma base de Schiff, e o TCA tem a função de desnaturar as proteínas presentes, além de acidificar o meio da reação. Agitou-se cada tubo e foram aquecidos a uma temperatura de 100 graus Celsius. Após, os tubos resfriados, acrescentou-se 0,20mL de álcool n-butílico para extrair o pigmento formado. Agitou-se por 45 segundos e centrifugado por 10 minutos a 3000 rpm. O produto corado, presente na fração superior, foi lido em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 535 nm. A concentração de TBARS obtida foi expressa em nmol por mg de proteína (Buege and Aust 1978).

Atividade da Superóxido Dismutase (SOD):

A atividade desta enzima é definida por sua capacidade para inibir um sistema de detecção que reage com $O^{\bullet-2}$.

A técnica de medida da SOD é baseada na inibição dessa reação. Para isto, utilizou-se adrenalina que, no meio alcalino, transforma-se em adrenocromo, produzindo $O^{\bullet-2}$ que é o substrato da enzima (Misra e Fridovich, 1972). Realizou-se a medida do meio de reação (glicina-NaOH 50 mM, pH 10) com 10,5 μ L de adrenalina (60 mM, pH 2,0), esta corresponde a 100% da reação. Agitou-se essa mistura e leu-se a 480 nm. Foram pipetados três diferentes volumes do homogeneizado e mediu-se a inibição da reação. A atividade enzimática foi

expressa em unidades SOD/mg de proteína (quantidade de SOD que inibe em 50% a velocidade de redução da adrenalina).

Atividade da Catalase (CAT):

A enzima catalase catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. A velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio é diretamente proporcional à atividade enzimática e obedece a uma cinética de pseudo primeira ordem com respeito ao peróxido de hidrogênio. O ensaio consiste em medir a diminuição da absorção a 240 nm (longitude de onda pela qual absorve o peróxido de hidrogênio).

A medida espectrofotométrica consistiu-se em pipetar o meio de reação (solução reguladora de fosfato 50 mM) com distintas alíquotas da amostra, formando-se um gráfico com uma linha de base. Em seguida, se adicionou 7 μ L de H_2O_2 300 mM. A concentração foi expressa em pmol/g de tecido (Aebi 1984).

ELISA TNF- α :

A quantificação da citocina pró-inflamatória TNF- α do soro proveniente dos animais foi determinado por ensaio imuno-enzimático (ELISA), empregando anticorpos monoclonais de rato específicos para a detecção. Foi utilizado kit comercial da empresa eBioscience[®] e os procedimentos realizados de acordo com o fabricante.

Análise da expressão protéica:

Preparação dos extratos citoplasmáticos:

Os extratos citoplasmáticos utilizados para detecção da expressão da proteína p65 foram preparados a partir de um homogeneizado do fígado e de pulmão em um tampão de lise (NaCl 140 mM, EDTA 15 mM, glicerol 10%, Tris 20 mM; pH 8,0), ao qual foram adicionados inibidores de proteases. O homogeneizado foi incubado durante 30 minutos a 4 °C, sendo centrifugado durante 30 minutos a 13.000 xg a 4 °C, o sobrenadante retirado em alíquotas e armazenado a -80°C.

Expressão protéica:

A técnica utilizada para detecção da expressão da p65 foi a de *Western blot*, sendo utilizado o sistema descrito por Laemmli (1970) para a eletroforese, e para o blotting a técnica descrita por Towbin e colaboradores (Towbin et al, 1979).

Será selecionada uma quantidade de amostra equivalente a 50 µg de proteína. Adiciona-se a solução H₂O, Tris/HCl 0,5M, DTT 1% e azul de bromofenol, incubando durante 5 minutos a 100°C. Após, foi realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida a 9-12% em tampão de eletroforese (Tris 25 mM, glicina 0,2 M, SDS 3,5 mM; pH 8,8). Depois de separadas, as proteínas foram transferidas para uma membrana de Fluoreto de polivinilideno (PVDF), a fim de permitir a sua exposição aos anticorpos. Para realizar a transferência, uma vez extraído o gel este foi equilibrado num tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 0,2 M e metanol 20). A transferência realizou-se a 13 volts durante 25 minutos. Para comprovar que a transferência estava correta se introduziu a membrana de PVDF numa solução de vermelho Ponceau para visualização das proteínas totais. A membrana foi lavada com agitação durante 5 minutos com PBS (0,14 M NaCl, 1,4 mM KH₂PO₄, 8 mM Na₂HPO₄, 2,7 mM KCl). Depois foi colocada durante 30 minutos em solução de bloqueio (5% de leite em pó desnatado em PBS-Tween 20 frio) a 37°C.

A membrana de PVDF foi então incubada em overnight a 4° C com o anticorpo primário policlonal específico para p65 (65 kDa). Após este período, a mesma foi lavada cinco vezes com PBS-Tween 20. Posteriormente foi incubada durante uma hora e meia com um anticorpo anti-imunoglobulina de rato unido a HRP (DAKO A/S, Glostrup, Dinamarca). Transcorrido este tempo, foi novamente lavada cinco vezes em PBS-Tween.

A detecção das proteínas foi realizada por quimioluminescência utilizando um kit comercial ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Grã-Bretanha), expondo a membrana durante 2 minutos a esta mistura comercial. Posteriormente, foi introduzida em um cassete junto com o filme de revelação (Amersham Hyperfilm ECL, UK) durante aproximadamente 2 minutos.

Depois de revelado, o filme foi secado e as bandas foram quantificadas por densitometria utilizando o programa Scion Image 4.02 para Windows (Scion Corporation, Frederick, USA). Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias.

Análise Estatística:

Os dados foram expressos como média +/- desvio padrão (DP). Análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Statistical Package for the Social Sciences versão 17 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). Diferenças entre médias foram avaliadas utilizando a ANOVA seguido de *post hoc* de Tukey ou Student Newman-Keuls. Foi considerado um nível de significância para $p < 0,05$.

Aspectos éticos:

O estudo obedeceu à Legislação Brasileira (Lei 11.794/08), às políticas locais no cuidado e uso de animais de acordo com os códigos relacionados à prática.

Este estudo foi submetido e aprovado ao Comitê de Ética e Pesquisa do Grupo de Pesquisa e Pós Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, no qual foi aprovado sob o número 09-065.

RESULTADOS:

Indução do DM tipo 2:

Todos os animais induzidos com STZ i.p. na dose de 100mg/kg foram considerados diabéticos após o TTGIP realizado com 10 semanas, pois a glicemia era maior que 200mg/dL após 120 minutos da sobrecarga de Glicose i.p. Este resultado foi significativo quando comparado ao CO que recebeu apenas tampão citrato 4,5 i.p. ($p < 0,05$) (FIGURA 11) A Glicemia de jejum também foi significativamente maior nos animais induzidos quando comparados ao controle (DM 131mg/dl +/- 16 versus CO 99mg/dl +/- 12, $p=0,01$) No entanto, se usarmos a glicemia de jejum para diagnóstico veremos que a maioria dos animais teria uma tolerância diminuída a glicose e diabetes leve a moderado, com glicemias entre 110 e 150mg/dL.

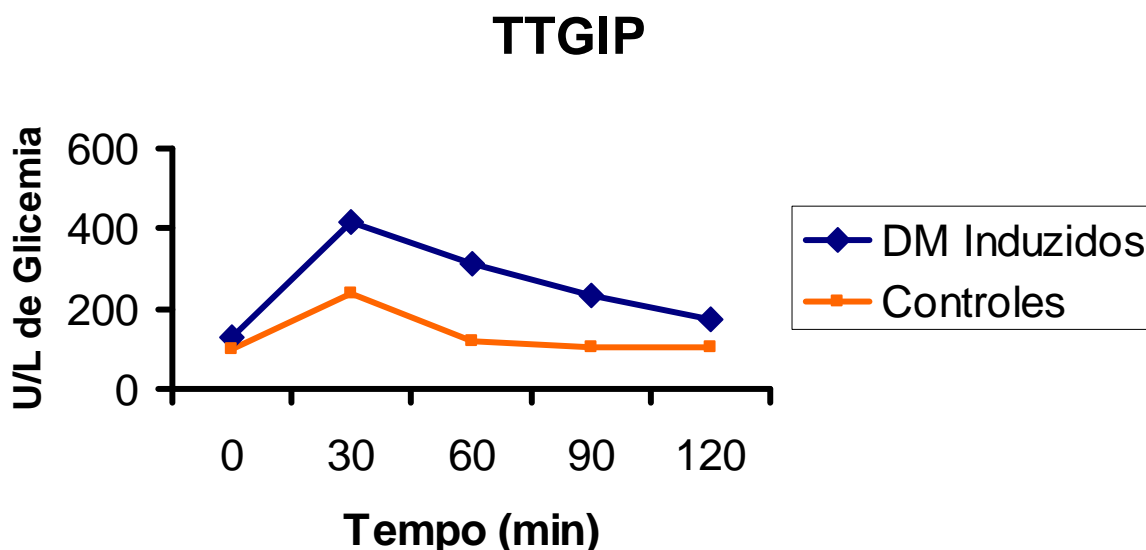


Figura 11: Teste de tolerância a glicose intraperitoneal – TTGIP nos animais induzidos com STZ e os animais CO que receberam somente tampão.

Peso corporal:

Na avaliação do peso corporal final dos animais, houve uma redução significativa no peso dos animais do grupo DM ($p < 0,01$) e DM+OP ($p < 0,001$) em relação aos animais do grupo CO (CO 497 ± 25 , DM 462 ± 28 , DM+OP 370 ± 55), conforme demonstrado na figura 12.

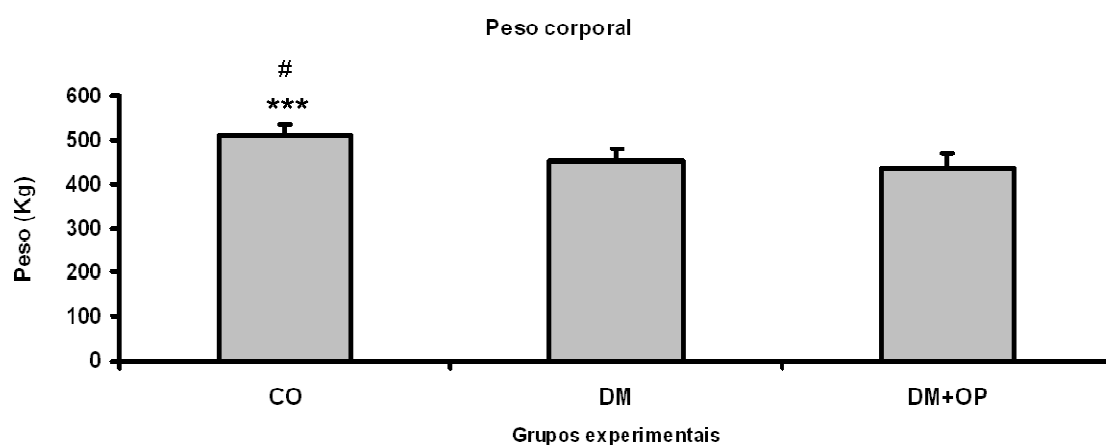


Figura 12: Diferença significativa no peso corporal dos animais do grupo CO em relação aos animais do grupo DM ($p < 0,01$) e DM+OP ($p < 0,001$).

Testes bioquímicos:

Os animais do grupo DM apresentaram níveis elevados de glicemia em relação aos animais do grupo CO ($p < 0,05$), demonstrando a eficácia do modelo em gerar elevação nos níveis glicêmicos nos animais devido à resistência insulínica característica do DM tipo 2 (Figura 11). Quando realizado a cirurgia nos animais diabéticos, observamos uma diminuição significativa nos níveis glicêmicos destes animais em relação ao grupo DM ($p < 0,01$) (Figura 13).

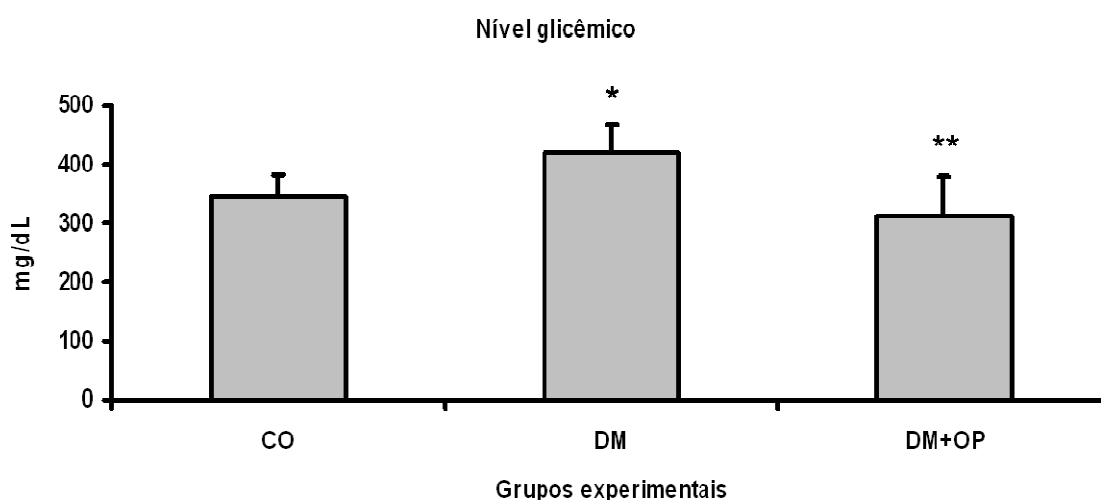


Figura 13: Perfil glicêmico dos animais estudados, onde podemos observar um aumento significativo dos animais do grupo DM ($*p < 0,05$) em relação aos animais do grupo CO, e uma redução significativa dos animais do grupo DM+OP ($**p < 0,01$) em relação aos animais do grupo DM.

Com relação ao perfil lipídico, todos os itens analisados: colesterol total, LDL, VLDL, TGC e HDL se mostraram aumentados nos animais com DM induzido, em comparação aos animais não-diabéticos (Figuras 14 a 18).

Comparando os grupos DM+OP e DM, vemos que os valores séricos de triglicerídeos dos animais submetidos à duodenojejunostomia foram significativamente menores que nos animais diabéticos controle (DM+OP 97 ± 15 versus DM 127 ± 10) (Figura 14).

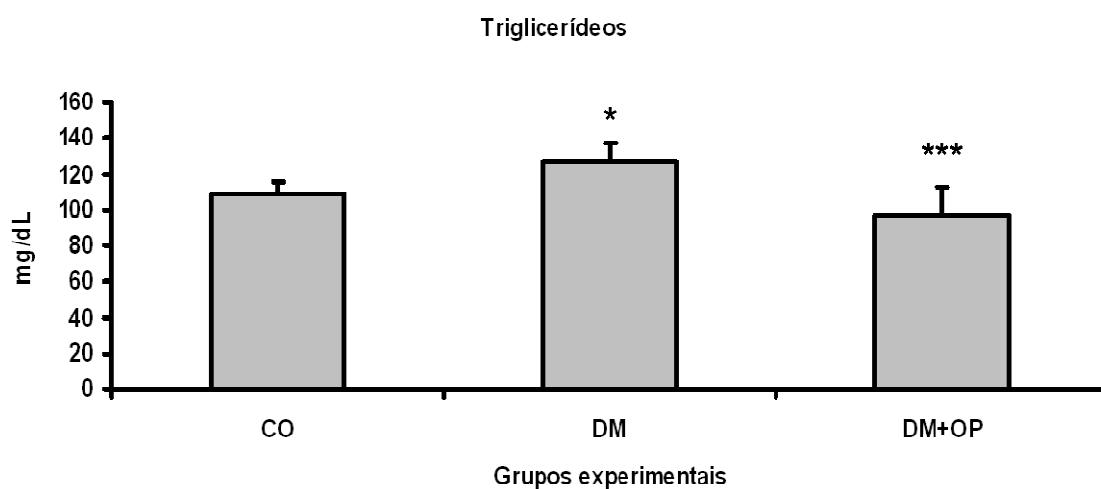


Figura 14: Triglicerídeos séricos dos animais estudados. Diferença significativa do grupo DM (* $p < 0,05$) em relação ao grupo CO; diferença significativa do grupo DM+OP (** $p < 0,001$) em relação ao grupo DM.

Os animais do grupo DM+OP apresentaram níveis de colesterol total significativamente menores que os animais diabéticos controle (DM+OP 76 ± 5 versus DM 96 ± 5). Além disso, mesmo quando comparamos os animais controle não diabéticos com os ratos operados, vemos que os níveis de colesterol são menores nestes últimos (CO 88 ± 5 versus DM+OP 76 ± 5) (Figura 15). Os outros parâmetros analisados, LDL, VLDL e HDL também estavam diminuídos nos animais operados em relação aos diabéticos não submetidos a duodenojejunostomia, todos eles demonstrando diferença estatística significativa. (Figuras 16 a 18)

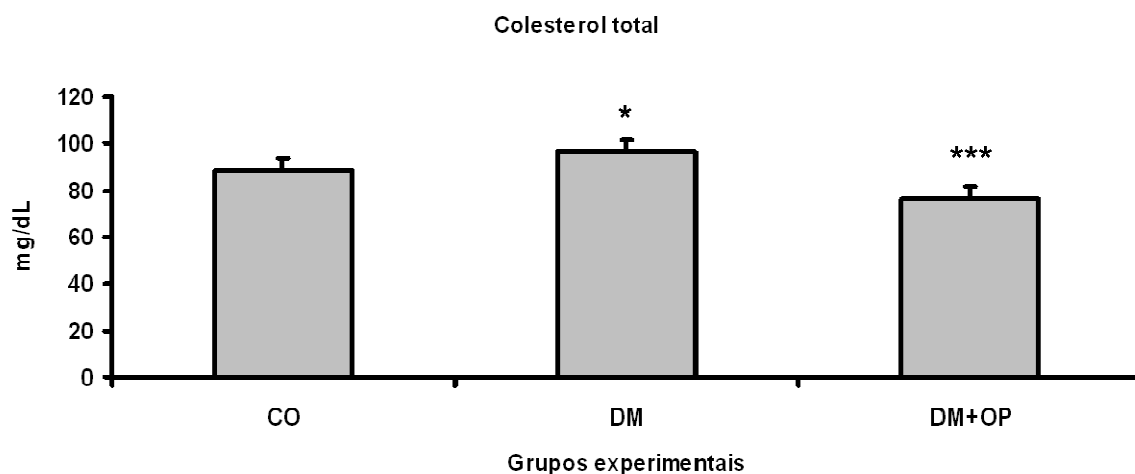


Figura 15: Colesterol total nos animais estudados. Diferença significativa dos animais do grupo DM ($*p<0,05$) em relação ao grupo CO; diferença significativa do grupo DM+OP ($***p<0,001$) em relação aos grupos DM e CO.

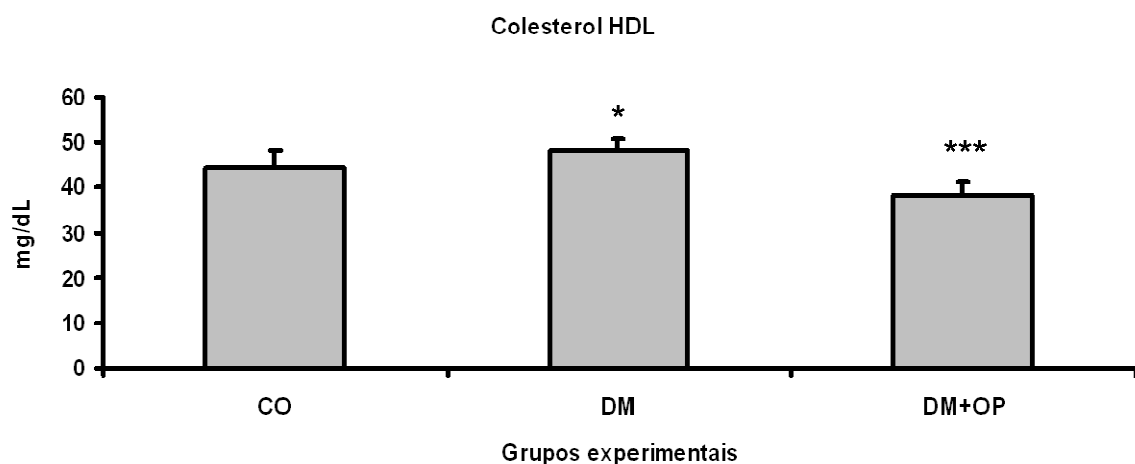


Figura 16: Colesterol HDL nos animais estudados. Diferença significativa dos animais do grupo DM ($*p<0,05$) em relação ao grupo CO; diferença significativa do grupo DM+OP ($***p<0,001$) em relação aos grupos DM e CO.

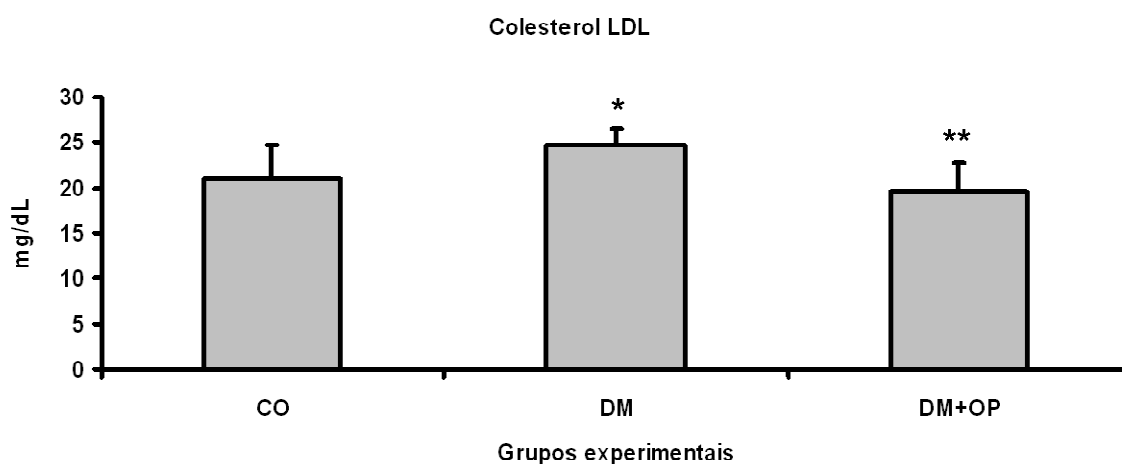


Figura 17: Colesterol LDL nos animais estudados. Diferença significativa do grupo DM (* $p < 0,05$) em relação ao grupo CO; diferença significativa do grupo DM+OP (** $p < 0,01$) em relação ao grupo DM.

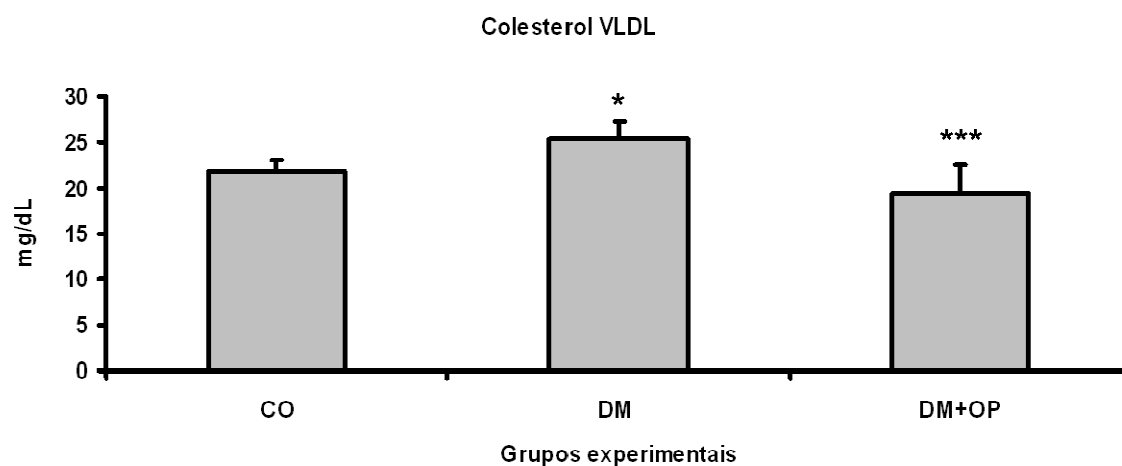


Figura 18: Colesterol VLDL dos animais estudados. Diferença significativa do grupo DM (* $p < 0,05$) em relação ao grupo CO; diferença significativa do grupo DM+OP (***) $p < 0,001$) em relação ao grupo DM.

Estresse oxidativo – Lipoperoxidação:

Na avaliação da lipoperoxidação no tecido pulmonar através de TBARS, podemos observar um aumento significativo dos animais do grupo DM ($3,072 \pm 0,31$) em relação aos animais do grupo CO ($1,416 \pm 0,07$) e DM+OP ($0,815 \pm 0,08$). Observa-se que com a utilização da duodenojejunostomia houve uma redução significativa na lipoperoxidação do tecido pulmonar, ou seja, uma proteção contra o estresse oxidativo (Figura 19).

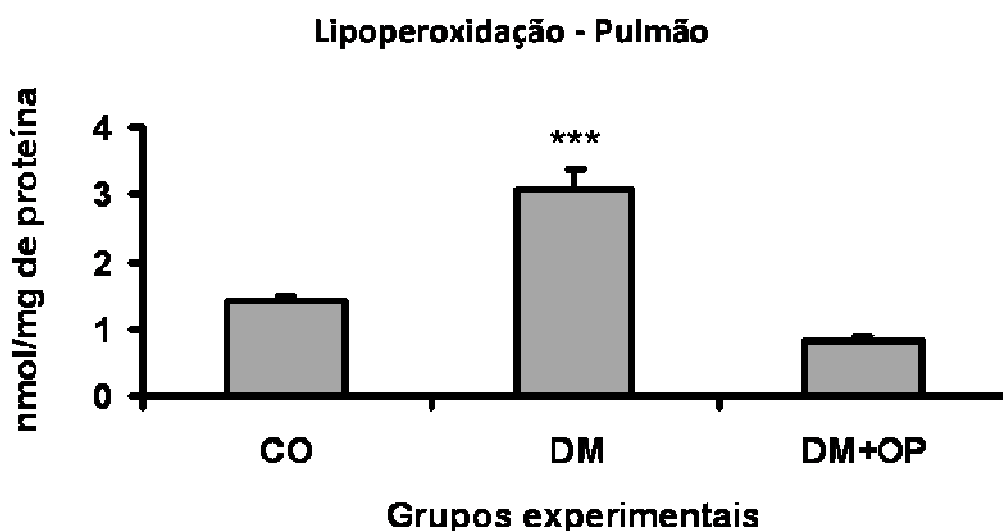


Figura 19: Análise da lipoperoxidação pulmonar através de TBARS. Diferença significativa dos animais do grupo DM ($p < 0,001$) em relação aos animais do grupo CO e DM+OP.

Na análise da lipoperoxidação no tecido hepático, observamos um comportamento semelhante ao tecido pulmonar, onde há um aumento significativo no grupo DM ($4,379 \pm 0,17$) em relação aos animais do grupo CO ($1,699 \pm 0,12$) e uma redução significativa quando realizada a duodenojejunostomia nos animais do grupo DM+OP ($2,915 \pm 0,13$) (Figura 20).

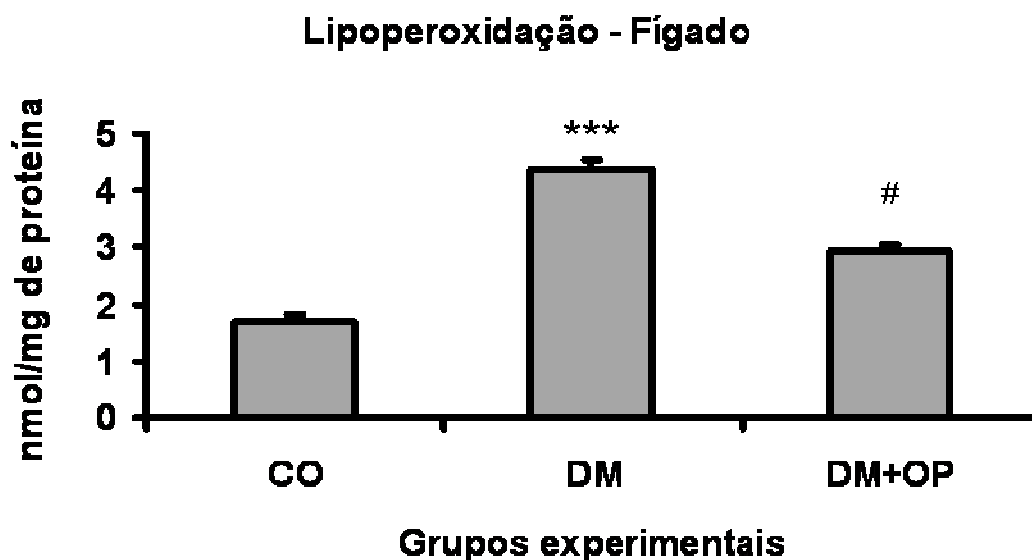


Figura 20: Análise da lipoperoxidação hepática através de TBARS. Diferença significativa dos animais do grupo DM ($p < 0,001$) em relação aos animais do grupo CO e DM+OP.

Quando analisada no tecido sanguíneo, observamos um aumento na lipoperoxidação nos animais do grupo DM ($1,573 \pm 0,30$) em relação aos animais do grupo CO ($0,646 \pm 0,14$) e uma redução significativa quando realizada a cirurgia nos animais do grupo DM+OP ($0,993 \pm 0,13$), demonstrando mais uma vez o papel protetor da cirurgia nos animais com diabetes, porém com números estatisticamente significantes em relação aos animais do grupo CO (Figura 21).

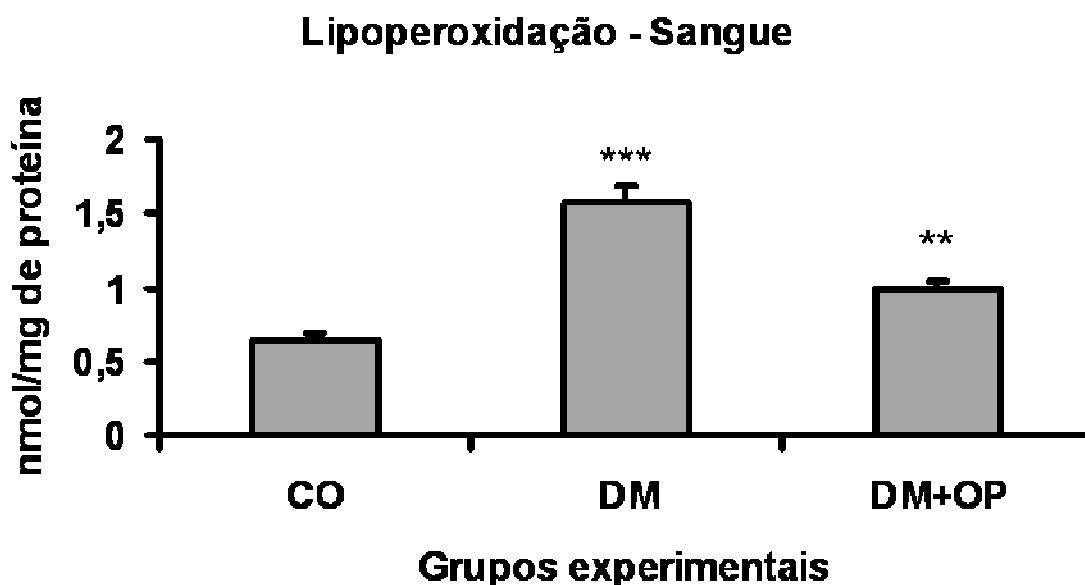


Figura 21: Análise da lipoperoxidação sanguínea através de TBARS. Diferença significativa dos animais do grupo DM ($***p<0,001$) em relação aos animais do grupo CO e DM+OP; diferença significativa do grupo DM+OP ($**p<0,01$) em relação aos animais do grupo CO.

Ao analisarmos a atividade da enzima antioxidante SOD no tecido pulmonar, observamos um aumento significativo no grupo DM ($24,792\pm 0,25$) em relação aos animais do grupo CO ($21,776\pm 0,38$) e uma redução significativa quando realizada a cirurgia no grupo DM+OP ($18,077\pm 0,40$) demonstrando assim, no grupo DM, a presença de um dano oxidativo e uma conseqüente tentativa de minimização pelo aumento da atividade da enzima antioxidante. Podemos relacionar o mesmo entendimento em relação ao grupo DM+OP, pois houve um menor dano oxidativo e uma conseqüente menor atividade da enzima SOD (Figura 22).

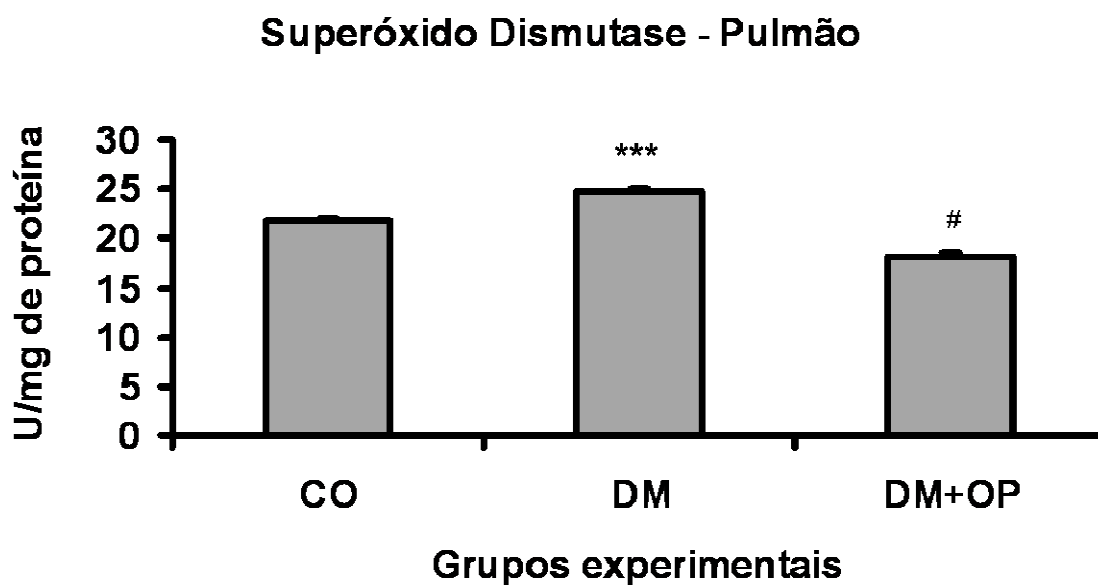


Figura 22: Análise da atividade da enzima antioxidante SOD no tecido pulmonar. Diferença significativa dos animais do grupo DM (** $p < 0,001$) em relação aos animais do grupo CO e DM+OP; diferença significativa do grupo DM+OP ($\#p < 0,001$) em relação aos animais do grupo CO.

Ao analisarmos a atividade da enzima antioxidante SOD no tecido hepático, não é possível observar diferença significativa entre os grupos DM ($15,23 \pm 0,31$), CO ($15,246 \pm 0,40$) e DM+OP ($14,848 \pm 0,11$). Este falta de diferença no tecido hepático pode ser devido ao ânion radical superóxido que já tenha sido dismutado pela enzima e convertido em peróxido de hidrogênio (Figura 23).

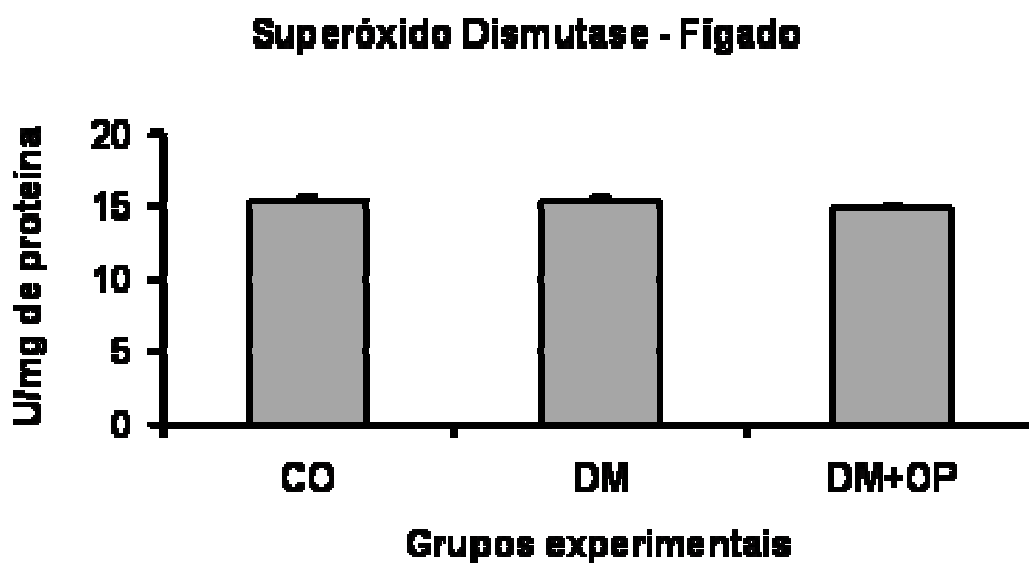


Figura 23: Análise da atividade da enzima antioxidante SOD no tecido hepático. Sem diferença estatística entre os grupos.

Na análise da enzima antioxidante catalase no tecido pulmonar, podemos observar um aumento significativo em sua atividade no grupo DM ($2,436 \pm 0,24$) em relação aos animais dos grupos CO ($0,787 \pm 0,21$) e DM+OP ($0,939 \pm 0,24$) (Figura 24). Este aumento comprova uma tentativa das defesas antioxidantes de agir contra um estresse gerado pela grande formação de radicais livres no Diabetes. Os animais do grupo diabético em que foi realizada a duodenojejunostomia demonstram uma atividade reduzida desta enzima, pois houve uma proteção contra a formação de radicais livres, comprovada através da análise da lipoperoxidação.

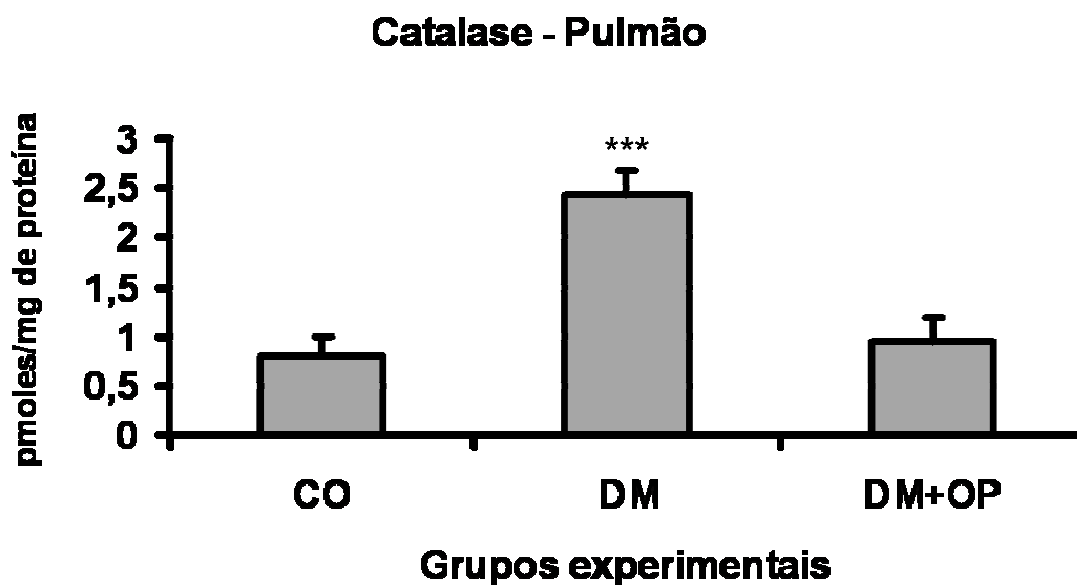


Figura 24: Análise da atividade da enzima antioxidante catalase no tecido pulmonar. Diferença significativa dos animais do grupo DM (***) em relação aos animais do grupo CO e DM+OP.

Um comportamento semelhante na atividade da enzima pode ser observado no tecido hepático, com um aumento significativo na atividade da enzima no grupo DM ($1,516 \pm 0,17$) em relação aos animais dos grupos CO ($0,46 \pm 0,03$) e DM+OP ($0,658 \pm 0,10$) (Figura 25).

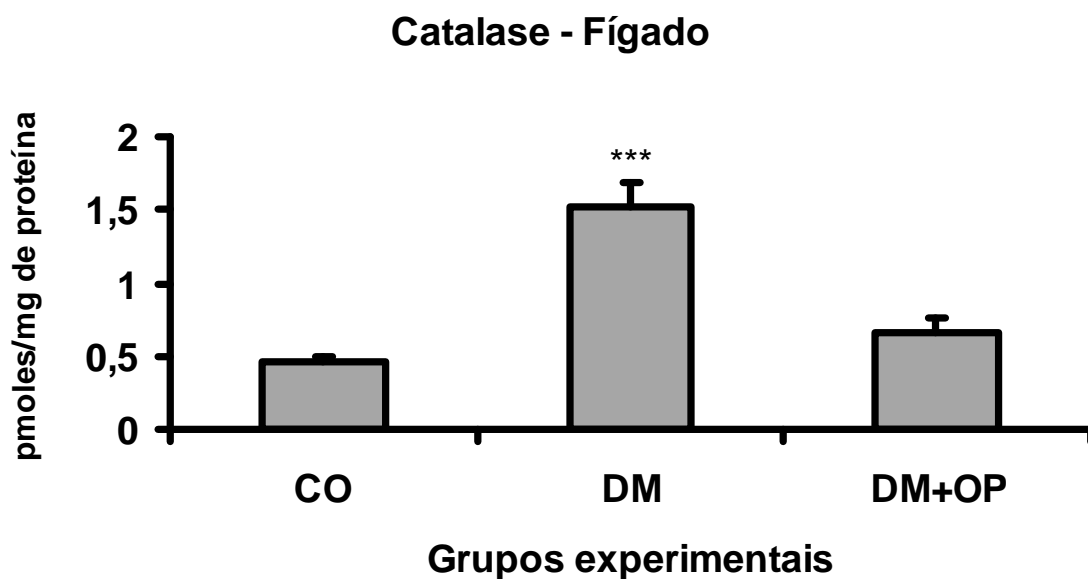


Figura 25: Análise da atividade da enzima antioxidante catalase no tecido hepático. Diferença significativa dos animais do grupo DM (***) em relação aos animais do grupo CO e DM+OP.

Expressão protéica p65 NF-kB

A análise da expressão protéica de p65 no tecido pulmonar demonstrou um aumento significativo no grupo DM ($1,023 \pm 0,05$) em relação aos animais do grupo CO ($0,762 \pm 0,01$) e DM+OP ($0,780 \pm 0,06$). Este resultado demonstra um aumento da atividade inflamatória no grupo diabético, o qual foi atenuado no grupo que foi submetido a cirurgia. Este fato demonstra um fator protetor da duodenojejunostomia nos animais do grupo diabético, através da diminuição da expressão da proteína (Figura 26).

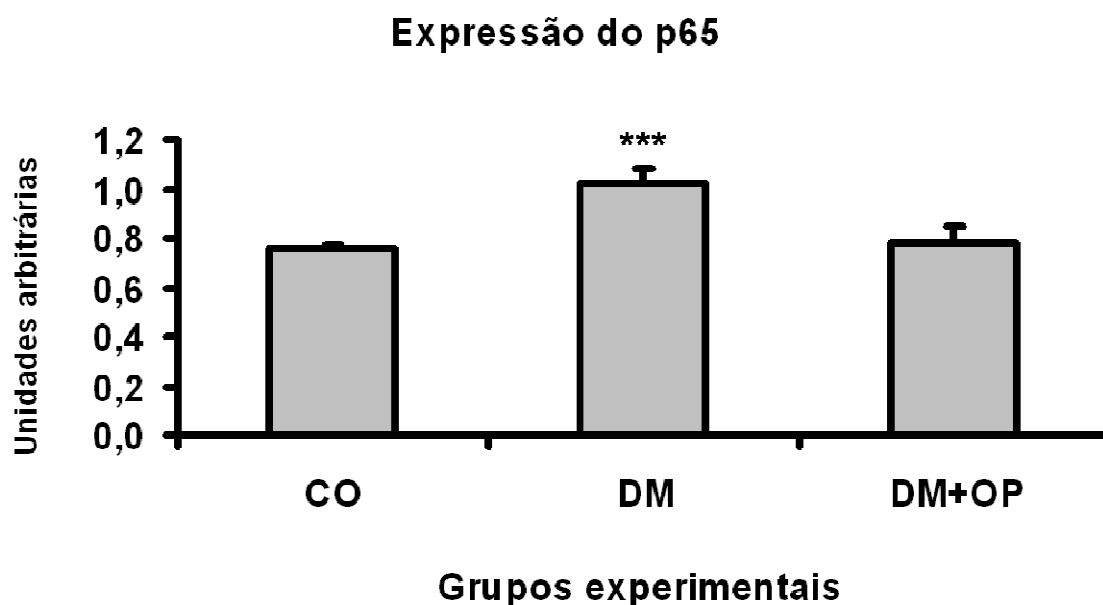


Figura 26: Análise da expressão da proteína p65 no tecido pulmonar. Diferença significativa dos animais do grupo DM (***) em relação aos animais do grupo CO e DM+OP.

No tecido hepático ocorre um comportamento semelhante nos grupos estudados, onde o grupo DM ($1,527 \pm 0,68$) tem um aumento significativo na expressão em relação aos animais do grupo CO ($0,475 \pm 0,07$). Há uma redução significativa do grupo DM+OP ($0,728 \pm 0,15$) em relação aos animais do grupo DM, demonstrando, assim, uma redução da expressão protéica e da inflamação (Figura 27).

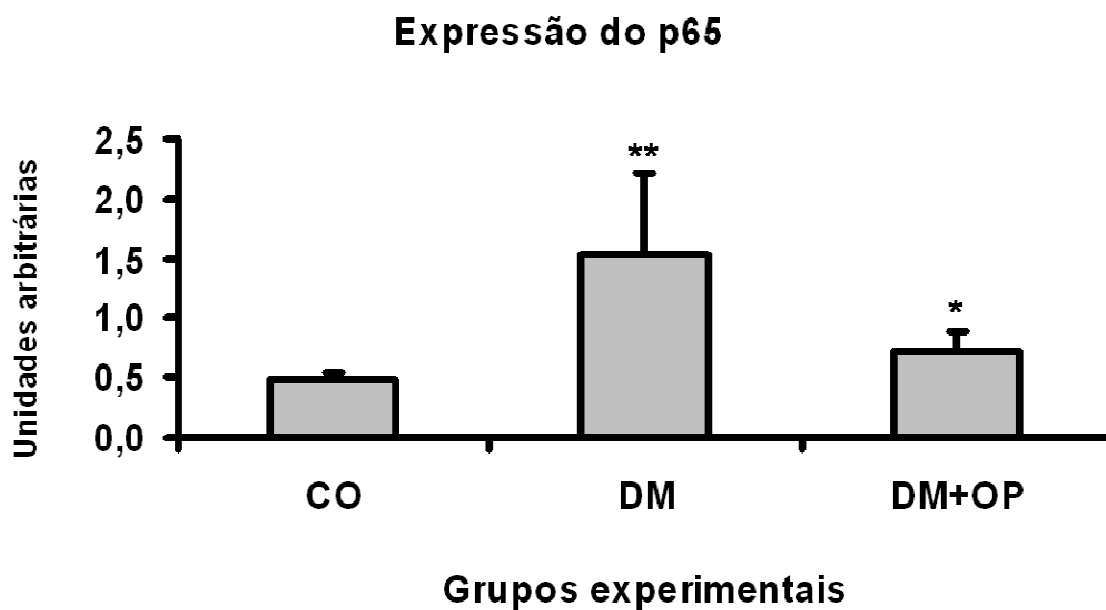


Figura 27: Análise da expressão da proteína p65 no tecido hepático. Diferença significativa dos animais do grupo DM (** $p < 0,01$) em relação aos animais do grupo CO e DM+OP ($p < 0,05$) em relação ao grupo DM.

TNF- alpha

Os valores de TNF- α mostraram-se aumentados nos animais do grupo DM. Nos animais operados os valores de TNF- α voltaram para valores próximos aos dos controles. Todos os resultados foram semelhantes para TNF- α no sangue, pulmão e fígado dos ratos.

Tabela 2: Valores de TNF- α através da técnica de ELISA nos animais estudados após Duodenojejunostomia , resultados em 3 meses de seguimento.

| | CO | DM | DM+OP | Valor de p |
|---|-------------------|-----------------------|----------------------|--------------------------|
| TNF-α sangue | 5,74 \pm 1,05 | 10,18 \pm 1,66*** | 7,49 \pm 0,36** # | ***p<0,001 (CO x DM) |
| | | | | **p<0,01 (DM x DM+OP) |
| | | | | #p<0,05 (CO x DM+OP) |
| TNF-α pulmão | 12,65 \pm 1,25 | 25,59 \pm 9,48** | 15,66 \pm 3,17# | **p<0,01 (CO x DM) |
| | | | | #p<0,05 (DM x DM+OP) |
| | | | | ***p<0,001 (CO x DM) |
| TNF-α fígado | 83,31 \pm 17,69 | 281,99 \pm 86,23*** | 145,94 \pm 34,48** | **p<0,01 (DM x DM+OP) |

DISCUSSÃO

Quanto à indução do DM tipo 2, notamos que o modelo utilizando STZ 100mg/kg em ratos Wistar com 2 dias de vida é efetivo em produzir um diabetes leve a moderado na idade adulta (DM 131mg/dl +/- 16 *versus* CO 99mg/dl +/- 12, $p=0,01$), como já demonstrado por outros autores (Portha *et al.*, 1989; Sinzato *et al.*, 2009). Podemos observar pelo TTGIP da Figura 11 que a intolerância à glicose é nítida, tanto ao observarmos o pico muito mais elevado de glicemia nos primeiros 30 min de sobrecarga, quanto ao vermos que a glicemia não retorna a menos de 200mg/dl após 120 minutos no grupo induzido, sendo que no grupo controle a glicemia em 90 minutos já é muito próxima a glicemia basal. O TTGIP feito aos 6 meses é muito semelhante a este (por isso não publicado) sendo assim, podemos afirmar que este distúrbio da glicose se mantém estável pelo menos até os 6 meses de vida do animal, o que ainda não havia sido descrito na literatura.

O fato de os animais diabéticos terem um ganho de peso menor que os controles já foi descrito por outros autores (Takada *et al.* 2007) e foi comprovado no nosso estudo. Isto se deve a ação tóxica da hiperglicemia no período puberal dos animais (7-8 semanas), levando a diminuição da taxa de crescimento nesta fase. Além disso, a cirurgia também leva a uma perda de peso inicial, seja pelo trauma cirúrgico, seja pela diminuição da ingesta alimentar inicial, no entanto o peso estabiliza após duas semanas da realização da cirurgia. A manutenção do peso estável após a cirurgia, nos animais do grupo DM+OP, comprova a efetividade desta técnica na prevenção da progressão da obesidade que é característica dos pacientes obesos diabéticos. Apesar de ter havido uma perda de peso significativa nos ratos operados em relação aos controles, os animais que se submeteram à cirurgia permaneceram eutróficos. Este dado também confirma a hipótese de que esta técnica cirúrgica não leva a perda de peso importante, podendo ser utilizada em pacientes não obesos.

A idéia de que o desvio do duodeno e a chegada mais precoce do alimento não digerido ao íleo terminal (“Hindgut and Foregut Theory”) foram comprovadas neste estudo, já que a duodenojejunostomia, uma cirurgia que comporta estes dois mecanismos, leva a uma diminuição dos níveis glicêmicos nos ratos diabéticos

operados. Os resultados são semelhantes ao encontrado no estudo da exclusão duodenojejunal (Rubino *et al.*, 2004) e na interposição ileal (Patriiti *et al.*, 2006; Strader *et al.*, 2009), com as vantagens de a duodenojejunostomia ser tecnicamente mais simples e de fácil execução e ainda não estar relacionada a úlcera de boca anastomótica, mostrando-se como uma possibilidade para realização de estudos em humanos utilizando esta técnica.

Um dos problemas principais em realizar uma cirurgia metabólica em animais diabéticos era a mortalidade, como já relatado, Inabnet *et al* demonstraram taxas de mortalidade tão altas quanto 90% em ratos Goto-Kakizaki. Após treinamento adequado e padronização da técnica cirúrgica, seguindo os preceitos sugeridos pelo autor acima, não tivemos taxa de óbito significativo no grupo de animais operados neste estudo.

A hipercolesterolemia é mais um dos componentes da SM e está freqüentemente associado ao DM tipo 2 (World Health Organization, 1998, Dluhy e McMahon, 2008) e freqüentemente tem seus níveis controlados após a cirurgia metabólica (Scopinaro *et al.*, 2005) Nossos dados demonstram exatamente isso, animais com DM induzidos tem níveis significativamente mais elevados de colesterol total e demais frações em relação aos animais normais. Após a duodenojejunostomia, esses valores são diminuídos chegando a níveis até inferiores aos animais não diabéticos. Isto provavelmente está relacionado ao controle metabólico exercido por essa cirurgia e também, em parte, pela diminuição do TNF- α que parece ser um indutor de hipercolesterolemia (Baud e Karin, 2001; Yudkin *et al.*, 1999).

Ao discutirmos a importância da inflamação no surgimento e manutenção do diabetes, vemos que o TNF- α é um dos principais marcadores deste processo. Ele é predominantemente produzido nos macrófagos e afeta a sinalização intracelular da insulina no músculo esquelético, gordura, células endoteliais, e outros tecidos responsivos à insulina pela inibição da atividade quinase na via de sinalização da insulina (Rui *et al.*, 2001). O possível envolvimento do TNF- α na resistência à insulina tem sido sugerido em vários estudos. TNF- α também pode aumentar os triglicerídeos (TG) plasmáticos e concentrações de lipoproteínas de densidade muito

baixa (VLD>L), aumentando a lipólise em camundongo, rato e células de gordura humana (Baudi e Karin, 2001; Yudkin *et al.*, 1999).

O TNF- α também pode diminuir a expressão do receptor de insulina IRS-1 (*Insulin receptor substrate 1*) e GLUT-4, quando em concentrações mais elevadas, bem como aumentar a fosforilação da serina 307 em IRS-1, prejudicando assim sua capacidade de se ligar ao receptor de insulina e iniciar a sinalização (Yudkin *et al.*, 1999; Rosenstock *et al.*, 2001).

A partir dos dados que obtivemos no presente estudo, nota-se que a indução do DM2 com STZ leva a um aumento importante do TNF- α , que pode estar relacionado a atividade inflamatória presente no quadro de intolerância à glicose destes animais, tanto em nível sistêmico como nos órgãos alvo. A duodenojejunosomia se mostrou efetiva em diminuir os níveis de TNF- α , provavelmente em virtude do controle metabólico e diminuição da LPO. Uma quantidade crescente de evidências indicam que o TNF- α e a IL-6 inibem a captação de glicose induzida pela insulina, tendo como alvo a cascata de sinalização da insulina, incluindo o receptor de insulina (IRS) e o Glut-4, o que leva ao desenvolvimento e progressão da resistência à insulina (Pickup *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2003). Isto leva a crer que a cirurgia metabólica interfere neste mecanismo, na medida em que diminui o quadro inflamatório sistêmico associado a hiperglicemia constante.

Como ocorreu após a nossa cirurgia, o uso de substâncias com efeitos antiinflamatório que estão associados à diminuição dos níveis de TNF alpha também mostraram melhora dos níveis glicêmicos e da sensibilidade à insulina (Maity *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2011). Estes dados nos fazem concluir que a cirurgia funciona como uma espécie de modulador da inflamação relacionada ao diabetes e, diferente das medicações, não é dose dependente e nem sofre influência da aderência ao tratamento, podendo atingir resultados mais consistentes a longo prazo.

Outro estudo, também utilizando antiinflamatório, neste caso a Aspirina, demonstrou diminuição importante do TNF- α , Ácidos graxos livres (FFA), Insulina e HOMA-IR, sem que houvesse melhora na glicemia de jejum (Sun *et al.*, 2011). Isto

sugere um efeito benéfico da diminuição da inflamação sobre a resistência insulínica, que inicialmente pode ser independente do controle dos níveis glicêmicos, Isto corrobora com os nossos resultados, onde vemos uma expressiva melhora nos marcadores de inflamação mesmo em animais com níveis glicêmicos não tão elevados, pois como descrevemos anteriormente, a maioria dos animais possuía diabetes leve a moderado.

Outras substâncias também estão relacionadas aos distúrbios da glicose, entre eles o NF-kB, um agente pró-inflamatório que controla a produção de uma série de marcadores e mediadores inflamatórios, incluindo TNF- α , IL-6, PCR e PAI-1. Muitos estudos sugerem que o NF-kB está intimamente relacionado ao desenvolvimento de resistência à insulina nos diabéticos tipo 2 (Cai *et al.*, 2005; Arkan *et al.*, 2005).

O mecanismo pelo qual o NF-kB causa resistência insulínica ainda não foi completamente esclarecido, mas estudos mostraram que o NF-kB pode ser ativado por níveis sustentadamente elevados de glicose sanguínea (Yang *et al.*, 2009; Soriano *et al.*, 2001). Os nossos dados mostram uma elevação consistente do NF-kB nos ratos diabéticos em relação aos controles. Em nosso estudo, a cirurgia metabólica realizada se mostrou eficaz em diminuir a atividade inflamatória como se percebe pelos níveis significativamente menores de NF-kB nos ratos diabéticos submetidos a cirurgia em comparação com os não operados.

Sabe-se ainda, que a ativação do NF-kB induz a expressão de muitas citocinas inflamatórias, como TNF- α , IL-6, que são fatores cruciais na resistência à insulina. No entanto, o TNF- α não é apenas induzido por NF-kB, mas também é um forte ativador do NF-kB. A ligação do TNF- α ao NF-kB induz a ativação de IKK quinases, as quais regulam a atividade transcricional do NF-kB, finalmente levando à degradação de IRS e conseqüente resistência insulínica (Wunderlich *et al.*, 2008). Nossos achados demonstraram essa relação linear entre TNF- α e NF-kB tanto nos animais controle, quanto nos operados, pois os níveis de ambos os marcadores estão elevados em proporções semelhantes nos animais diabéticos e caem de modo parecido após a cirurgia. O que confirma essa interação importante entre esses dois mediadores da inflamação sistêmica no DM2.

Há crescentes evidências tanto em estudos experimentais quanto clínicos, sugerindo que o estresse oxidativo desempenha um papel importante na patogênese da Diabetes *mellitus* (Maritim *et al.*, 2003; Wohaieb e Godin, 1987; Sinzato *et al.*, 2009). Nossos estudos demonstraram um aumento importante da atividade do TBARS tanto no sangue, quanto no tecido pulmonar e hepático nos ratos diabéticos em relação aos controles. Além disso, a realização da Duodenojejunostomia levou a uma diminuição da atividade TBARS para níveis significativamente menores em relação aos ratos diabéticos não operados. Além disso, a medida do TBARS no pulmão foi significativamente menor após a cirurgia mesmo quando comparado com os ratos controles não diabéticos. Estes achados demonstram que a cirurgia tem um efeito benéfico na diminuição da lipoperoxidação e consequente diminuição do quadro de estresse oxidativo exacerbado observado nos animais diabéticos.

O fígado tem um papel importante na homeostase da glicose sanguínea. Ratos diabéticos induzidos com STZ mostram um aumento na concentração de produtos da peroxidação dos lipídeos como o TBARS, uma evidência indireta da produção intensificada de radicais livres (Maritim *et al.*, 2003). Reforçando ainda mais esta tese, vemos que após a Duodenojejunostomia, o TBARS dos ratos diabéticos voltou a níveis muito semelhantes ao encontrado em ratos não diabéticos, o que demonstra uma importante diminuição da lipoperoxidação e consequente diminuição da produção de radicais livres. O aumento da concentração de produtos de peroxidação lipídica no fígado indica que o fígado é suscetível à peroxidação lipídica no DM. Aumento de peroxidação lipídica no DM se deve ao aumento do estresse oxidativo na célula como resultado da diminuição de sistemas antioxidantes. Estudos já demonstraram um aumento significativo da peroxidação lipídica de ratos expostos à STZ e que substâncias protetoras como o ácido gálico podem atenuar essa peroxidação exacerbada. Isto sugere que existe um papel protetor de antioxidantes, devido ao seu efeito de limpeza dos radicais livres (Punithavathi *et al.*, 2011).

Um estudo nacional com modelo de DM2 semelhante ao nosso, não conseguiu demonstrar elevação do TBARS em ratos diabéticos (Sinzato *et al.*, 2009). Os autores formularam a hipótese de que o modelo foi insuficiente em

aumentar a glicemia suficientemente para alterar o TBARS, no entanto, poderia se acrescentar que o tempo de seguimento também pode ter sido curto demais, apenas 4 meses, para se observar o resultado esperado. No nosso modelo, apesar de a GJ também não ser bastante elevada, em 6 meses de seguimento, o aumento do TBARS é evidente e altamente significativo. Isto pode estar relacionado a um maior tempo de exposição dos animais a lipoperoxidação, pois o nosso estudo teve um tempo de seguimento de 2 meses a mais, o que corresponde a 50% além do seguimento do estudo citado.

Com relação às enzimas antioxidantes SOD e Catalase, os dados obtidos no nosso estudo parecem um pouco conflitantes. Obtivemos valores significativamente maiores de SOD no tecido pulmonar de ratos diabéticos em relação aos controles, no tecido hepático os valores foram essencialmente iguais e ratos operados tiveram níveis de SOD pulmonar menores que os não operados. No entanto estes resultados não são exclusivos do nosso estudo, pois a literatura mostra resultados também conflitantes (Sinzato *et al.*, 2009; Muruganandan *et al.*, 2002; Tormo *et al.*, 2004; Sailaja *et al.*, 2000). Em relação à SOD, a enzima responsável pela neutralização de ânions superóxido, os resultados da literatura são também conflitantes quanto ao seu comportamento no DM. Enquanto os autores do mesmo estudo acima sobre o TBARS demonstram que não houve alteração no SOD em ratos com diabetes induzido por STZ (Sinzato *et al.*, 2009), o que é corroborado por outros autores (Muruganandan *et al.*, 2002; Tormo *et al.*, 2004), existe evidência de que animais com DM induzido por aloxana têm níveis diminuídos de SOD (Sailaja *et al.*, 2000). Nos humanos, tanto em indivíduos com DM tipo 1 quanto DM tipo 2 são observados aumentos no SOD plasmático (Seghrouchni *et al.*, 2002). Em modelo experimental de diabetes tipo 1 induzido por STZ se observou aumento do estresse oxidativo pulmonar dos ratos diabéticos em relação aos controles, assim como uma redução na atividade da enzima antioxidante SOD (Forgiarini Jr, *et al.*, 2009).

Esses dados corroboram com os achados de outros autores, os quais demonstraram o aumento do estresse oxidativo e a redução da enzima antioxidante SOD no pulmão de ratos diabéticos. Esses autores demonstraram ainda haver um aumento na expressão da enzima óxido nítrico sintase indutível no tecido pulmonar dos animais diabéticos (Hürdag *et al.*, 2008). A outra enzima antioxidante testada no

nosso estudo, a catalase, se mostrou muito aumentada em animais com diabetes em relação aos animais do CO, e bastante diminuída após a cirurgia em relação aos ratos diabéticos não operados. Esses resultados foram expressos tanto no fígado quanto no pulmão. Como já citado anteriormente, os processos patológicos causadores do diabetes podem ser relacionados a um desequilíbrio da produção de ERO, tais como radicais hidroxila (HO^\cdot), superóxido (O_2^\cdot) e H_2O_2 . Portanto, as células devem ser protegidas desta lesão oxidativa por enzimas antioxidantes. Provavelmente por esse motivo é que observamos uma maior atividade da catalase em ratos diabéticos comparados com controles. Da mesma forma, quando o estresse oxidativo diminui após a realização da Duodenojejunostomia, como foi o caso do nosso estudo, a atividade antioxidante também tende a diminuir, conferindo um efeito de *down-regulation* nas enzimas antioxidantes. Esse efeito já foi observado em outro modelo experimental no qual se demonstrou aumento semelhante da catalase e dos níveis de ERO em ratos diabéticos tratados com insulina (Wohaieb e Godin, 1987). Tudo isso, sugere uma alteração do equilíbrio oxidante-antioxidante nos ratos diabéticos que pode ser reestabelecido, ao menos parcialmente, pela cirurgia metabólica.

CONSIDERAÇÕES FINAIS:

Em conclusão, observamos que a duodenojejunostomia em ratos diabéticos induzidos por STZ foi efetiva em controlar os níveis glicêmicos e de lipídeos, bem como demonstrou um importante papel na modulação da atividade inflamatória e no estresse oxidativo que ocorre no DM tipo 2. Esses achados nos levam a crer que a duodenojejunostomia pode ser uma cirurgia metabólica promissora no controle do DM2 e dos outros componentes da SM. Mais dados provenientes de estudo em andamento poderá correlacionar estes achados com as alterações nos hormônios intestinais que estão sendo medidos (incretinas).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Aebi, H. "Catalase in vitro." *Methods Enzymol* 105: 121-126. 1984.
- Ahmed, N. Advanced glycation endproducts-role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Research and Clinical Practice*, v.67(1), p.3-21, 2005.
- American Diabetes Association. Standards of medical care for diabetes. *Diabetes Care*, v. 17, p. 1514-1522, 2007.
- Andersen, M.L.; D'Almeida, V.; Ko Mi, G.; Kawakami, R.; Martins, P.J.F.; Magalhães, L.E.; Tufik, S. *Princípios Éticos e Práticos do uso de animais de experimentação*. 1. ed. São Paulo: Unifesp, 2004. p.167.
- Arkan, M.C.; Hevener, A.L.; Greten, F.R.; Maeda, S.; Li, Z.W.; Long, J.M.; Wynshaw-Boris, A.; Poli, G.; Olefsky, J.; Karin, M. IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med* 2005; 11: 191-8.
- Asplund, K.; Grankvist, K.; Marklund, S.; Taljedal, I.R. Partial protection against Streptozotocin-induced hyperglycaemia by superoxide dismutase linked to polyethylene glycol. *Acta Endocrinologica*, v. 107, p. 390-394, 1984.
- Barnes, P.J.; Karin, M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *The New England Journal of Medicine*, v. 336, p.1066-71, 1997.
- Barry, R.E.; Barisch, J.; Bray, G.A.; Sperling, M.A.; Morin, R.J.; Benfield, J. vIntestinal adaptation after jejunoileal bypass in man. *Am J Clin Nutr*. 1977 Jan;30(1):32-42.
- Baud, V.; Karin, M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol*. 11:372-377; 2001.
- Blair, I.A. Endogenous glutathione adducts. *Current Drug Metabolism*, v. 7(8), p. 853-72, 2006.
- Bonnefont-Rousselot, D. Glucose and reactive oxygen species. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, v. 5, p.561-8, 2002.

Brownlee, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, v. 414, p.813-20, 2001.

Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* 72: 248-254.

Brownlee, M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*, v. 54 (6), p. 1615-1625, 2005.

Buchwald, H.; Avidor, Y.; Braunwald, E.; Jensen, M.D.; Pories, W.; Fahrbach, K. *et al.* Bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. *Jama*. 2004 Oct 13;292(14):1724-37.

Buege, J.A.; Aust, S.D. Microsomal lipid peroxidation. *Meth Enzimol*. 52:302-309. 1978.

Cai, D.; Yuan, M.; Frantz, D.F.; Melendez, P.A.; Hansen, L.; Lee, J.; Shoelson, S.E. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med* 2005; 11: 183-90.

Castro, L.S.; Coelho, A.C.J.; Bogossian, L.; Umberto, P. Radicais livres de oxigênio. Aspectos químicos, biológicos e fisiopatológicos em medicina. *Jornal Brasileiro de Medicina*, v. 59, p.11-21,1990.

Ceriello, A. New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a "causal" antioxidant therapy. *Diabetes Care*, v.26, p. 1589-96, 2003.

Chiellini, C.; Rubino, F.; Castagneto, M.; Nanni, G.; Mingrone, G. The effect of biliopancreatic diversion on type 2 diabetes in patients with BMI <35 kg/m². *Diabetologia* 2009;52:1027–30.

Cohen, R.; Pinheiro, J.S.; Correa, J.L.; Schiavon, C.A. Laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass for BMI <35 kg/m²: a tailored approach. *Surg Obes Relat Dis* 2006;2:401-404, discussion 404

Creutzfeldt, W. The incretin concept today. *Diabetologia*. 1979 Feb;16(2):75-85.

Darley-Usmar, V.; Wiseman, H.; Halliwell, B. Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS Letters*, v.369, p.131-151, 1995.

Del Maestro, R.F. An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta physiologica Scandinavica Supplementum*, v.492, p.153-167, 1980.

Dias, A.S.; Porawski, M.; Alonso, M.; Marroni, N.; Collado, P.S.; Gonzalez-Gallego, J. Quercetin decreases oxidative stress, NF-kappaB activation, and iNOS overexpression in liver of streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal Nutrition*, v. 135 p. 2299-304, 2005.

Didonato, J.A.; Hayakawa, M.; Rothwarf, D.M.; Zandi, E.; Karin, M. A cytokine-responsive I-kappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB. *Nature*, v.388 (6642), p. 548-54, 1997.

Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes. http://ww2.prefeitura.sp.gov.br//arquivos/secretarias/saude/programas/0007/Diretrizes_SBD_2007.pdf Acessado em 2010.

Dixon, J.B.; Pories, W.J.; O'Brien, P.E.; Schauer, P.R.; Zimmet, P. Surgery as an Effective Early Intervention for Diabetes. Why the reluctance? *Diabetes Care* 2005;28 (2):472-74.

Dluhy, R.G.; McMahon, G.T. Intensive glycemic control in the ACCORD and ADVANCE trials. *N Engl J Med*. 2008;358:2630-33.

Droge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, v. 82(1), p. 47-95, 2002.

Du, X.L.; Edelstein, D.; Rossetti, L.; Fantus, I.G.; Goldberg, H.; Ziyadeh, F.; Wu, J.; Brownlee, M. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 97(22), p. 12222-6, 2000.

Evans, J.L.; Goldfine, I.D.; Maddux, B.A.; Grodsky, G.M. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocrine Reviews*, v.23 (5), p.599-622. 2002.

Evans, J.L.; Goldfine, I.D.; Maddux, B.A.; Grodsky, G.M. Are oxidative stress – activated signaling pathways mediators of insulin resistance and B cell dysfunction? *Diabetes*, v. 52, p. 1-8, 2003.

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 Dec;144(12):5149-58.

Forgiarini Junior, L.A.; Kretzmann, N.A.; Porawski, M.; Dias, A.S.; Marroni, N.P. Experimental diabetes mellitus: oxidative stress and changes in lung structure. *J Bras Pneumol*. 2009;35(8):788-791.

Galli, J.; Li, L.S.; Glaser, A.; Ostenson, C.G.; Jiao, H.; Fakhrai-Rad, H.; *et al.* Genetic analysis of non-insulin dependent diabetes mellitus in the GK rat. *Nat Genet*. 1996 Jan;12(1):31-7.

Guidone, C.; Manco, M.; Valera-Mora, E.; Iaconelli, A.; Gniuli, D.; Mari, A.; *et al.* Mechanisms of recovery from type 2 diabetes after malabsorptive bariatric surgery. *Diabetes*. 2006 Jul;55(7):2025-31.

Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. Oxygen Toxicity, Oxygen Radicals, Transition Metal and Diseases. *Biochemical Journal*, v. 219, p. 1–14, 1984.

Halliwell, B.; Whiteman, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, v.142, p. 231-255, 2004.

Halliwell, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, v. 141, p.312-322, 2006.

Halliwell, B.; Gutteridge, J. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Nova York: Oxford University Press, v.1, 2007. 851p.

Haluzik, M.; Nedvidkova, J. The role of nitric oxide in the development of streptozotocin-induced diabetes mellitus: experimental and clinical implications. *Physiological Research*. v. 49, p. 37–42, 2000.

Herr, R.R.; Eble, T.E.; Jahnke, H.R. Isolation and characterization of streptozotocin. *Antibiotics annual*, v.7, p.236-40, 1960.

Hofmann, M.A.; Schiekofer, S.; Kanitz, M.; Klevesath, M.S.; Loswig, M.; Lee, V.; Morcos, M.; Tritschler, H.; Ziegler, R.; Wahl, P.; Bierhaus, A.; Nawroth, P.P. Insufficient glycemic control increases nuclear factor κ -B binding activity in peripheral blood mononuclear cells isolated from patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care*, v. 21, n. 8, p. 1310-1316, 1998.

Holz, G.G.; Kuhlreiber, W.M.; Habener, J.F. Pancreatic beta-cells are rendered glucose-competent by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1(7-37). *Nature*. 1993 Jan 28;361(6410):362-5.

Hürdağ, C.; Uyaner, I.; Gürel, E.; Utkusavas, A.; Atukeren, P.; Demirci, C. The effect of alpha-lipoic acid on NOS dispersion in the lung of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Diabetes Complications*. 2008;22(1):56-61.

Inabnet, W.B.; Milone, L.; Korner, J.; Durak, E.; Ahmed, L.; Pomrantz, J.; Harris, P.E.; Bessler, M. A rodent model of metabolic surgery for study of type 2 diabetes and positron emission tomography scanning of beta cell mass. *Surg for Obes and Relat Dis* 2009,5(2):212-217.

Islas-Andrade, S.; Monsalve, C.R.M.; De le Pena, J.E.; Polanco, A.C.; Palomino, M.A.; Velasco, A.F. Streptozotocin and alloxan in experimental diabetes: Comparison of the two models in rats. *Acta Histochemica Cyto chemica*. v.33(3), p. 201-208, 2000.

Jones, D.P. Disruption of mitochondrial redox circuitry in oxidative stress. *Chemico-Biological Interactions*, v. 163(1-2), p. 38-53, 2006.

Karin, M. How NF-kappaB is activated: the role of the IkappaB kinase (IKK) complex. *Oncogene*, v. 18, p. 6867-74, 1999.

King, K.M.; Rubin, G. A history of diabetes: from antiquity to discovering insulin. *British Journal of Nursing*, v. 12(18), p. 1091 – 1095, 2003.

Koopmans, H.S.; Sclafani, A.; Fichtner, C.; Aravich, P.F. The effects of ileal transposition on food intake and body weight loss in VMH-obese rats. *Am J Clin Nutr.* 1982 Feb;35(2):284-93.

Korshunov, S.S.; Skulachev, V.P.; Starkovv, A.A. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Letters*, v. 416, p. 15-8, 1997.

Kwon, K.B.; Kim, E.K.; Jeong, E.S.; Lee, Y.H.; Lee, Y.R.; Park, J.W.; Ryu, D.G.; Park, B.H. Cortex cinnamomi extract prevents streptozotocin- and cytokine-induced beta-cell damage by inhibiting NF-kappaB. *World Journal of Gastroenterology*, v. 12, p. 4331-4337, 2006.

Laemmli, U. K. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680-685. 1970.

Lim, G.E.; Brubaker, P.L. Glucagon-Like Peptide 1 Secretion by the L-Cell: The View From Within. *Diabetes*. 2006 Dec;55(Supplement_2):S70-S7.

Lima, E.S.; Abdalla, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 37, p. 293-303, 2001.

Marchesini, J.C.D. End-to-side duodeno-jejunosomy with half-and-half biliopancreatic limb for the treatment of type 2 diabetes: a proposal for a simpler technique. *Obes Surg*. 2007 Jan;17(1):138-9.

Mari, A.; Manco, M.; Guidone, C.; Nanni, G.; Castagneto, M.; Mingrone, G.; *et al.* Restoration of normal glucose tolerance in severely obese patients after biliopancreatic diversion: role of insulin sensitivity and beta cell function. *Diabetologia* 2006; 49:2136–43.

Maritim, A.C.; Sanders, R.A.; Watkins, J.B. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *Journal Biochemical Molecular Toxicology*. V.17, p. 24-38, 2003.

Mason, E.E. Ileal [correction of ilial] transposition and enteroglucagon/GLP-1 in obesity (and diabetic?) surgery. *Obes Surg*. 1999 Jun;9(3):223-8.

Mingrone G. Role of the incretin system in the remission of type 2 diabetes following bariatric surgery. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* 2008; 18:574-79.

Ministério da Saúde. Taxa de prevalência de Diabetes Mellitus no Brasil. Brasil: www.datasus.br . 2009.

Mirsa, H.P.; Fridovich, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*, 247:3170-75. 1972.

Mistry, S.B.; Omana, J.J.; Kini, S. Rat models for bariatric surgery and Surgery for type 2 Diabetes Mellitus. *Obes Surg* 2009, published online.

Münzel, T.; Afanas'ev, I.B.; Kleschyov, A.L.; Harrison, D.G. Detection of superoxide in vascular tissue. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v,22, p.1761-8, 2002.

Muruganandan, S.; Gupta, S.; Kataria, M.; Lal, J.; Gupta, P.K. Mangiferin protects the streptozotocin-induced oxidative damage to cardiac and renal tissues in rats. *Toxicology*. 2002;176(3):165-73.

Naslund, E.; Backman, L.; Holst, J.J.; Theodorsson, E.; Hellstrom, P.M. Importance of small bowel peptides for the improved glucose metabolism 20 years after jejunioileal bypass for obesity. *Obes Surg*. 1998 Jun;8(3):253-60.

Nishikawa, T.; Edelstein, D.; Du, X.L.; Yamagishi, S.I.; Matsumura, T.; Kaneda, Y.; Yorek, M.A.; Beebe, D.; Oates, P.J.; Hammes, H.P.; Giardino, I.; Brownlee, M. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*, v. 404, p. 787-90, 2000.

Noya, G.; Cossu, M.L.; Coppola, M.; Tonolo, G.; Angius, M.F.; Fais, E.; *et al.* Biliopancreatic diversion preserving the stomach and pylorus in the treatment of hypercholesterolemia and diabetes type II: results in the first 10 cases. *Obes Surg.* 1998 Feb;8(1):67-72.

Oktyabrsky, O.N.; Smirnova, G.V. Redox regulation of cellular functions. *Biochemistry (Mosc)*, v. 72(2), p.132-45, 2007.

Oliveira, R.F. Diabetes dia-a-dia: guia para o diabético, seus familiares, amigos e membros das equipes de saúde. 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter. 2002.

Patriti, A.; Facchiano, E.; Annetti, C.; Aisa, M.C.; Galli, F.; Fanelli, C.; Donini, A. Early improvement of glucose tolerance after ileal transposition in a non-obese type 2 Diabetes rat model. *Obes Surg*, 15, 1258 - 1264.

Pickup, J.; Willians, G. Textbook of diabetes. 2. ed. Blackwell Scince, 1998. 164p.

Pickup, J.C.; Chusney, G.C.; Thomas, S.M.; Burt, D. Plasma interleukin-6, tumor necrosis factor alpha and blood cytokine production in types 2 diabetes. *Life Sci* 2000, 67: 291–300.

Portha, B.; Blondel, O.; Serradas. P.; Mc Evoy, R.; Giroix, M.H.; Kergoat, M.; Bailbe, D. The rat models of non-insulin-dependent diabetes induced by neonatal streptozotocin. *Diabetes Metab* 1989,15:61-75.

Punithavathi, V.R.; Mainzen Prince, P.S.; Kumar, M.R.; Selvakumari, C.J.. Protective Effects of Gallic Acid on Hepatic Lipid Peroxide Metabolism, Glycoprotein Components and Lipids in Streptozotocin-Induced Type II Diabetic Wistar Rats. *J Biochem Molecular Toxicology* Volume 25, Number 2, 2011 pag 68-76.

Reis, J.S.; Veloso, C.A.; Mattos, R.T.; Purish, S.; Machado, J.A.N. Estresse Oxidativo: revisão da sinalização metabólica no diabetes tipo1. *Revista Brasileira de Endocrinologia e Metabolismo*, v.52, p. 1096-1105, 2008.

Rosenstock, M.; Greenberg, A. S.; Rudich, A. Distinct long-term regulation of glycerol and non-esterified fatty acid release by insulin and TNF-alpha in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetologia* 44:55–62; 2001.

Rubino, F.; Gagner, M. Potential of surgery for curing type 2 diabetes mellitus. *Ann Surg.* 2002 Nov;236(5):554-9.

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):1-11.

Rubino, F.; Kaplan, L.M.; Schauer, P.R.; Cummings, D.E. The Diabetes Surgery Summit consensus conference: recommendations for the evaluation and use of gastrointestinal surgery to treat type 2 diabetes mellitus. *Ann Surg.* 2010;251(3):399-405.

Rui, L.; Aguirre, V.; Kim, J. K.; Shulman, G. I.; Lee, A.; Corbould, A.; Dunaif, A.; White, M. F. Insulin/IGF-1 and TNF- stimulate phosphorylation of IRS-1 at inhibitory Ser307 via distinct pathways. *J. Clin. Invest.* 107: 181–189; 2001.

Russel, G.A. Deuterium-isotope Effects in the Autoxidation of Aromatic Hydrocarbons. Mechanism of the Interaction of Peroxy Radicals. *Journal American Chemical Society*, v.79, p. 3871-3880, 1957.

Sailaja Devi, M.M.; Suresh, Y.; Das, U.N. Preservation of the antioxidant status in chemically-induced Diabetes mellitus by melatonin. *J Pineal Res.* 2000;29(2):108-15.

Sarson, D.L.; Scopinaro, N.; Bloom, S.R. Gut hormone changes after jejunoileal (JIB) or biliopancreatic (BPB) bypass surgery for morbid obesity. *Int J Obes.* 1981;5(5):471-80.

Schiekofer, S.; Galasso, G.; Andrassy, M.; Aprahamian, T.; Schneider, J.; Rocnik, E. Glucose control with insulin results in reduction of NF- κ B-binding activity in mononuclear blood cells of patients with recently manifested type 1 diabetes. *Diabetes, obesity and metabolism*, v.8, p. 473-482, 2006.

Schnachenberg, C.G. Oxygen radicals in cardiovascular-renal disease. *Current Opinion Pharmacology*, v. 2, p. 121-125, 2002.

Schnedl, W.J.; Ferber, S.; Johnson, J.H.; Newgard, C.B. STZ transport and cytotoxicity: specific enhancement in GLUT2- expressing cells. *Diabetes*, v. 43, p. 1326-33, 1994.

Scopinaro, N.; Marinari, G.M.; Camerini, G.B.; Papadia, F.S.; Adami, G.F. Specific effects of biliopancreatic diversion on the major components of metabolic syndrome: a long-term follow-up study. *Diabetes Care*. 2005 Oct;28(10):2406-11.

Seghrouchni, I.; Draï, J.; Bannier, E.; Riviere, J.; Calmard, P.; García, I.; et al. Oxidative stress parameters in type I, type II and insulin-treated type 2 Diabetes mellitus: insulin treatment efficiency. *Clin Chim Acta*. 2002;321(1-2):89-96.

Sen, R.; Baltimore, D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF-kB by a posttranslational mechanism. *Cell*, v. 47, p. 921–928, 1986.

Service, G.J.; Thompson, G.B.; Service, F.J.; Andrews, J.C.; Collazo-Clavell, M.L.; Lloyd, R.V. Hyperinsulinemic hypoglycemia with nesidioblastosis after gastric-bypass surgery. *N Engl J Med*. 2005 Jul 21;353(3):249-54.

Sharma, A.K.; Bharti, S.; Goyal, S.; Arora, S.; Nepal, S.; Kishore, K.; Joshi, S.; Kumari, S.; Arya, D.S. Upregulation of PPAR γ by Aegle marmelos Ameliorates Insulin Resistance and β - cell Dysfunction in High Fat Diet Fed - Streptozotocin Induced Type 2 Diabetic Rats *Phytother. Res*. 2011, 25: 1457–1465.

Sinzato, Y.K.; Lima, P.H.O.; Campos, K.E.; Kiss, A.C.I.; Rudge, M.V.C.; Damasceno, D.C. Neonatally-induced diabetes: lipid profile outcomes and oxidative stress status in adult rats. *Rev Assoc Med Bras* 2009; 55(4): 384-8.

Soneja, A.; Drews, M.; Malinski, T. Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing. *Pharmacological Reports*, v. 57, p. 108- 19, 2005.

Soriano, F.G.; Virág, L.; Szabó, C. Diabetic endothelial dysfunction: role of reactive oxygen and nitrogen species production and poly (ADP-ribose) polymerase activation. *J Mol Med* 2001; 79: 437-48

Southorn, P.; Powis, G. Free Radicals in Medicine. I. Chemical Nature and biological Reactions. *Mayo Clinic Proceedings*, v.63, p381-389, 1988.

Squadrito, G.L.; Pryor, W.A. The formation of peroxynitrite in vivo from nitric oxide and superoxide. *Chemical Biological Interaction*, v. 96, p.203-206, 1995.

Strader, A.D.; Vahl, T.P.; Jandacek, R.J.; Woods, S.C.; D'Alessio, D.A.; Seeley, R.J. Weight loss through ileal transposition is accompanied by increased ileal hormone secretion and synthesis in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005 Feb;288(2):E447-53.

Strader, A.D.; Clausen, T.R.; Goodin, S.Z.; Wendt, D. Ileal Interposition Improves Glucose Tolerance in Low Dose Streptozotocin-treated Diabetic and Euglycemic Rats. *Obes Surg* 2009, 19:96–104.

Sugiyama, M.; Atomi, Y. Pylorus-preserving total pancreatectomy for pancreatic cancer. *World J Surg.* 2000 Jan;24(1):66-70.

Sun, X.; Han, F.; Yi, J.; Han, L.; Wang, B. Effect of Aspirin on the Expression of Hepatocyte NF- κ B and Serum TNF- α in Streptozotocin-Induced Type 2 Diabetic Rats. *J Korean Med Sci* 2011; 26: 765-770.

Surh, Y.J. *Oxidative Stress, Inflammation and Health*. Packer L (ed.). Londres: Taylor & Francis, 2005.

Szkudelski, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the Rat pancreas. *Physiology Research*, v. 50, p. 537-46, 2001.

Takada, J; Machado, M. A; Peres, S. B.; Brito, L. C; Borges-Silva, C. N; et al. Neonatal streptozotocin-induced diabetes mellitus: a model of insulin resistance associated with loss of adipose mass. *Metabolism Clinical and Experimental* 56 (2007) 977–984.

Cummings DE. Hormonal and Metabolic Mechanisms of Diabetes Remission After Gastrointestinal Surgery. *Endocrinology* 2009;150(6): 2518-25.

Tormo, M.A.; Romero de Tejada, A.; Morales, I.; Paredes, S.; Sánchez, S.; Barriga, C.; et al. Orally administered tryptophan and experimental type 2 diabetes. *Mol Cell Biochem.* 2004;261(1-2):57-61.),

Towbin, H.; Staehelin, T.; *et al.* "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(9): 4350-4354. 1979.

Unwin, N.; Gan, D. *et al.* The IDF Diabetes Atlas : providing evidence, raising awareness and promoting action. *Diabetes Res Clin Pract*, v.87, n.1, Jan, p.2-3.

Verma, I.M. Nuclear factor (NF)-kappaB proteins: therapeutic targets. *Annals of the Rheumatic Diseases*, v. 63, p. ii57-ii61, 2004.

Verspohl, E.J. Recommended testing in diabetes research. *Planta Medica*, v.68, p. 581-590, 2002.

Vetter ML, Cardillo S, Rickels MR, Iqbal N. Narrative Review: Effect of Bariatric Surgery on Type 2 Diabetes Mellitus. *Ann Intern Med*. 2009;150:94-103.

Wietzycoski CR, Von Diemen V, Trindade MRM. In *Conduas em Cirurgia Digestiva*. Editores: Luiz Rohde e Alessandro B Osvaldt. Capitulo 99: Cirurgia Metabólica, 2nd ed. 2010

Wild, S.; Roglic, G. *et al.* Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*, v.27, n.5, May, p.1047-53. 2004.

Wohaieb, S.A.; Godin, D.V. Alterations in free radical tissue defense mechanisms in streptozocin-induced diabetes in rat. Effects of insulin treatment. *Diabetes* 1987;36:1014–1018.

World Health Organization. The World Health Report. Press release. 1998.

Wunderlich, F.T.; Luedde, T.; Singer, S.; Schmidt-Supprian, M.; Baumgartl, J.; Schirmacher, P.; Pasparakis, M.; Brüning, J.C. Hepatic NF-kappa B essential modulator deficiency prevents obesity-induced insulin resistance but synergizes with high-fat feeding in tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 1297-302.

Yamaoka, S.; Courtois, G.; Bessia, C.; Whiteside, S.T.; Weil, R.; Agou, F.; Kirk, H.E.; Kay, R.J.; Israel, A. COMPLEMENTATION cloning of NEMO, a component of the

IkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation. *Cell*, v. 93 (7), p. 1231-1240, 1998.

Yang, J.; Park, Y.; Zhang, H.; Xu, X.; Laine, G.A.; Dellsperger, K.C.; Zhang, C. Feed-forward signaling of TNF-alpha and NF-kappaB via IKK-beta pathway contributes to insulin resistance and coronary arteriolar dysfunction in type 2 diabetic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; 296: H1850-1858.

Yudkin, J. S.; Stehouwer, C. D.; Emeis, J. J., et al. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19:972-978; 1999.

Xu, H.; Barnes, G.T.; Yang, Q. *et al.* Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity related insulin resistance. *J Clin Invest* 2003,112: 1821-1830.

Zingarelli, B.; Sheehan, M.; Wong, H.R. Nuclear factor- κ B as a therapeutic target in critical care medicine. *Critical Care Medicine*, v. 31, p. S105-S111, 2003.