

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde  
Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica

Quantificação e análise da expressão do mRNA de proglucagon, GIP, PC1/3 e DPP-IV e modulação *in vitro* destes genes por ácidos graxos monoinsaturados (*cis* ou *trans*) e glicose em jejuno proximal de obesos grau III submetidos a cirurgia bariátrica (RYGB)

FRANCIELI ROHDEN

Orientadora: Prof. Dra. Regina Maria Vieira da Costa Guaragna

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre

2009

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

*"A coisa mais bela que podemos experimentar é o mistério.*

*Essa é a fonte de toda a arte e ciências verdadeiras."*

*Albert Einstein*

## AGRADECIMENTOS

A professora Regina pela oportunidade, confiança, orientação e carinho.

Ao professor Rogério pelos ensinamentos.

A professora Fátima pelos conselhos, interesse e preocupação.

A Dr. Mottin e ao Dr. Padoin pelas amostras de tecido e por todos os esclarecimentos quanto a cirurgia.

Aos voluntários que aceitaram participar do trabalho.

A Rejane pela disponibilidade em encontrar os prontuários.

A Dona Lia por sempre estar disposta a ajudar.

A Cléia, por ser paciente e sempre esclarecer minhas dúvidas.

A Josiane pelos ensinamentos.

Aos colegas do laboratório 22 pelo empréstimo da “gorda” (pipeta automática).

Ao Alexandre, a Cris e a Fernanda pela amizade, conselhos, conversas e pela companhia nos almoços no RU.

Ao Dioguinho, Bem Hur e a Mery pela disponibilidade de me ensinarem as técnicas do chopper e do MTT.

A Andréia, ao Júlio e ao Guilherme do laboratório do professor Rogério pela disponibilidade.

As minhas ‘amigas-irmãs’ para sempre: Cíntia, Aline (Lica), Thais, Juliana (Pê), Cláudia, Silvia, Mariana, Heloisa, Darli, pelo carinho, compreensão, risadas, choros, discussões (científicas ou não), pelos fluxos de desabafo, pelos pastéis de queijo, pelos chimarrões, por segurar a minha mão... Enfim, por terem tornado minha vida em Porto Alegre, alegre.

Ao Leo, bendito fruto do Laboratório 21, pelo carinho e pela amizade.

A minha tia Edigna e ao meu primo Max, pela acolhida nos primeiros tempos e pelo apoio durante todo o mestrado.

A minha família, minha mãe Cléia, meu pai Inácio, minha irmã Marieli, meu cunhado Jackson, meu sobrinho Pedro pelo carinho compreensão, e por cuidarem do Julio na minha ausência.

Ao Robison, pelo suporte emocional e financeiro, pela paciência e tranquilidade de lidar com o meu humor quando os experimentos não davam certo, ou quando estava morrendo de saudade e não podia ir para casa, pelo amor incondicional e pelo aconchego sempre dado a mim.

Ao Julio por ser um filho maravilhoso que soube me compreender e ter paciência enquanto eu estive longe, e por todo o amor e carinho que me dava quando eu voltava para casa.

A Deus, porque Ele é a base de tudo.

MUITO OBRIGADA DE CORAÇÃO!

## **APRESENTAÇÃO**

Esta dissertação está apresentada no formato de artigos científicos e organizada da seguinte forma:

### **PARTE I**

Resumo.

Abstract.

Lista abreviaturas.

Introdução, contendo uma revisão de literatura sobre os aspectos que fundamentam este trabalho.

Objetivos gerais e específicos do trabalho.

### **PARTE II**

Capítulo 1, contendo artigo científico.

Capítulo 2, contendo manuscrito submetido.

### **PARTE III**

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

Conclusões finais.

Perspectivas originadas a partir desse trabalho.

### **REFERÊNCIAS**

Referências citadas nas partes I e III.

## SUMÁRIO

Parte I.....	7
RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
1.1 OBESIDADE.....	11
1.1.1 <b>Cirurgia bariátrica.....</b>	<b>13</b>
1.2 INCRETINAS.....	14
1.2.1 <b>Peptídeo insulínico dependente de glicose – GIP.....</b>	<b>15</b>
1.2.2 <b>Peptídeo semelhante ao glucagon-1 - GLP-1.....</b>	<b>16</b>
1.2.3 <b>Pró-hormônio convertase 1/3 – PC1/3.....</b>	<b>20</b>
1.2.4 <b>Dipeptidil peptidase IV – DPP-IV.....</b>	<b>21</b>
1.3 <b>ÁCIDOS GRAXOS MONOINSATURADOS <i>cis</i> E <i>trans</i>.....</b>	<b>23</b>
1.3.1 <b>Aspectos químicos dos ácidos graxos.....</b>	<b>23</b>
1.3.2 <b>Efeitos dos ácidos graxos monoinsaturados <i>cis</i> e <i>trans</i> sobre o metabolismo.....</b>	<b>25</b>
1.3.2.1 <b>Ácido Oléico.....</b>	<b>26</b>
1.3.2.1 <b>Ácido Elaídico.....</b>	<b>26</b>
1.3.2.3 <b>Ácido Vaccênico.....</b>	<b>28</b>
1.4 JUSTIFICATIVA.....	28
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>30</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	30
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
Parte II.....	32
Capítulo I.....	33
Capítulo II.....	57
Parte III.....	82
<b>3 DISCUSSÃO.....</b>	<b>83</b>
<b>4 CONCLUSÕES.....</b>	<b>95</b>
<b>5 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>97</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>98</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>106</b>

**PARTE I**

## RESUMO

A obesidade caracterizada pelo excesso de tecido adiposo está associada a comorbidades como *diabetes mellitus* tipo 2 (DMT2), hipertensão arterial, doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer. Para pacientes considerados obesos mórbidos (OBM) ( $IMC > 40 \text{ Kg/m}^2$ ) a melhor opção terapêutica é a cirurgia de *bypass* gástrico em Y de Roux (RYGB). Estudos clínicos mostram que após esse procedimento os indivíduos OBM com DMT2 melhoram seu estado. Uma explicação para esse fenômeno é a mudança anatômica que ocorre no trato gastrintestinal, alterando assim a produção das incretinas, GIP e GLP-1, que promovem a liberação de insulina. Essas incretinas são liberadas pela mucosa do intestino delgado na forma de pró-hormônios e necessitam da ativação feita pela enzima PC 1/3. Carboidratos e ácidos graxos estimulam sua liberação. Após exercerem sua ação são inativadas pela enzima DPP-IV. Logo o objetivo desse trabalho foi a quantificação de mRNA de pró-glucagon, GIP, PC1/3 e DPP-IV em jejuno proximal de OBM DMT2 e não *diabetes mellitus* tipo 2 (NDM2), bem como avaliar o efeito, *in vitro*, de ácidos graxos monoinsaturados *cis*, *trans* e glicose sobre esse tecido. O jejuno foi obtido de indivíduos OBM submetidos RYGB. Para a quantificação basal do mRNA dos genes de interesse, o tecido (n=25) retirado na cirurgia foi diretamente imerso em TRIzol para a extração do RNA total. O mRNA foi quantificado pela reação em cadeia da polimerase (qRT-PCR). Para avaliar o efeito dos ácidos graxos *in vitro*, o jejuno (n=5) foi fatiado (400  $\mu\text{m}$ ) e incubado em meio DMEM suplementado com 50  $\mu\text{M}$  de ácido oléico, eláidico, vaccênico ou 11 mM de glicose por 4 horas a 37°C em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ . Entre OBM DMT2 e NDM2 não houve diferença estatística na expressão do mRNA de GIP, GLP-1 e DPP-IV, apenas observamos que indivíduos NDM2 tem tendência a uma maior expressão do mRNA de PC1/3 (p=0,065). No entanto, alguns pacientes não expressaram mRNA de PC1/3. A expressão dos genes estudados foi heterogênea, permitindo a divisão dos pacientes em alta e baixa expressão de GIP, sendo este utilizado como gene calibrador. Constatamos que a expressão de mRNA dos demais genes acompanham o perfil de expressão de GIP. Os testes *in vitro* revelaram que o ácido oléico diminuiu a expressão do mRNA de DPP-IV; o ácido vaccênico, aumentou significante a expressão do mRNA de pró-glucagon; e o ácido eláidico, não modulou a expressão dos genes estudados nesse trabalho. O tratamento com alta concentração de glicose aumentou o mRNA da enzimas PC1/3 e DPP-IV. Em conclusão, OBM NDM2 e DMT2 apresentaram expressão heterogênea desses genes não permitindo verificar diferença significativa entre os grupos. Alguns pacientes não expressaram o mRNA da PC1/3, e NDM2 transcreveram maior quantidade de mRNA desta enzima. Sugerimos que no jejuno proximal, os ácidos oleico e vaccênico da dieta, agem diretamente sobre as células e modulam os níveis das incretinas, diminuindo a expressão do mRNA da DPP-IV e aumentando o pró-glucagon, respectivamente. A glicose em altas concentrações estimula a transcrição das enzimas envolvidas na síntese e degradação das incretinas, podendo interferir na homeostase do metabolismo da glicose. Nossa pesquisa revela que a região do intestino que receberá diretamente o alimento após a cirurgia, pode ser modulada por este, principalmente se apresentar lipídeos e carboidratos na sua constituição. Maior atenção deve ser dada a estes pacientes do ponto de vista nutricional.

## ABSTRACT

The obesity characterized by excess of adipose tissue is associated with comorbidities such as type 2 *diabetes mellitus* (T2DM), hypertension, cardiovascular disease and some types of cancer. For patients considered morbidly obese (OBM) ( $BMI > 40 \text{Kg/m}^2$ ) the best therapeutic option is Roux- Y gastric bypass (RYGB). Clinical studies show that after this procedure, individuals with OBM T2DM improve this state. One explanation for this phenomenon is the anatomical change that occurs in the gastrointestinal tract, thereby altering the production of incretins, GIP and GLP-1, those promote the release of insulin. These incretins are released in the prohormones form by mucosa of small intestine and require the activation by the enzyme PC 1/3. Carbohydrates and fatty acids stimulate its release. After act they are inactivated by enzyme DPP-IV. Once the objective of this study was to quantify the mRNA of proglucagon, GIP, PC1/3 and DPP-IV in the proximal jejunum of OBM without type 2 *diabetes mellitus* (NDM2) and with T2DM and to evaluate the effect *in vitro* of fatty acids *cis* and *trans* monounsaturated and high glucose on this tissue. The jejunum was obtained from individuals OBM undergo RYGB. For the quantification of basal mRNA of these genes, the tissue removed at surgery was directly immersed in TRIzol for extraction of total RNA. The mRNA expression was quantified by polymerase chain reaction (qRT-PCR). To evaluate the effect of fatty acids *in vitro*, the jejunum was sliced (400  $\mu\text{m}$ ) and incubated in DMEM supplemented with 50  $\mu\text{M}$  of oleic, elaidic, vaccenic acid or 11 mM of glucose for 4 hours at 37°C in an atmosphere of 5%  $\text{CO}_2$ . Between OBM T2DM and NDM2 no statistical difference was observed in the expression of mRNA of GIP, GLP-1 and DPP-IV, only NDM2 tend to have greater expression of mRNA of PC1/3 ( $p=0.065$ ). Furthermore, some patients did not express mRNA of PC1/3. The expression of genes studied was heterogeneous, allowing the division of patients into high and low expression of GIP, which was used as a calibrator gene. So, we found that the expression of mRNA of other genes accompany this profile. The *in vitro* tests showed that oleic acid decreased the DPP-IV mRNA expression, the vaccenic acid, significantly increased the proglucagon mRNA expression and elaidic acid not modulated the expression of genes studied in this work. Treatment with high concentration of glucose increased the mRNA of enzymes PC1/3 and DPP-IV. In conclusion, OBM NDM2 and T2DM showed heterogeneous expression of these genes consequently did not permit verifying significant differences between groups. Some patients do not express the mRNA of PC1/3 and NDM2 transcribe major amount of mRNA of this enzyme. We suggest that in the proximal jejunum, the oleic and vaccenic acid of diet, act directly on cells and modulate incretins levels, reducing the expression of DPP-IV mRNA and increasing the proglucagon, respectively. Glucose at high concentrations stimulates the transcription of enzymes involved in synthesis and degradation of incretins and may interfere with the homeostasis of glucose metabolism. Our research shows that this intestine region that directly receives the food after the surgery, can be modulated by foods that contains especially fat and carbohydrate. Greater attention should be given to these patients about nutritional view.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AG: Ácido graxo

CLA: Ácido Linoléico Conjugado

COM-PUCRS: Centro de Obesidade Mórbida da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

DMEM : Meio Basal Eagle modificado

DMT2: *diabetes mellitus* tipo II

DPP-IV: dipeptidil peptidase IV

GIP: peptídeo insulínico dependente de glicose

GLP-1: peptídeo semelhante ao glucagon

HDL: lipoproteína de alta densidade (*High Density Lipoprotein*)

IMC: índice de massa corpórea

mRNA: ácido ribonucleico mensageiro

NDM2: não *diabetes mellitus* tipo II

OBM: obeso mórbido

qRT-PCR: reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

PC 1/3: pró-hormônio convertase 1/3

PC 2: pró-hormônio convertase 2

RYGB: *bypass* gástrico em Y de Roux (*Roux- en-Y gastric bypass*)

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 OBESIDADE

A obesidade é considerada epidemia mundial. No Brasil, pesquisa realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (Pesquisa, 2004), mostra que em 30 anos a população de obesos aumentou consideravelmente. Atualmente, a porcentagem de indivíduos com excesso de peso e obesos é de 11,1% na população adulta (> de 20 anos), sendo 8,9% homens e 13,1% mulheres. Observa-se que esta porcentagem aumentou gradativamente entre 1975-2003 na população masculina. A partir de 1989 a obesidade alcança grande expressão em todas as regiões do país (Brasil, 2005).

A Organização mundial da saúde (WHO) divide a obesidade em três níveis: indivíduos com Índice de Massa Corporal (IMC) entre 30 e 35 kg/m<sup>2</sup> apresentam obesidade leve; IMC entre 35 e 40 kg/m<sup>2</sup>, obesidade moderada e IMC≥40 kg/m<sup>2</sup> obesidade mórbida ou grau III (World, 1998, 2004, 2006).

A obesidade é decorrente da combinação de consumo excessivo de calorias e sedentarismo (Pereira, *et al*, 2003; Badman, Flier, 2007). Podemos observar que no quadro evolutivo da obesidade *versus* modernização da população, há um aumento nos números de indivíduos obesos e com sobrepeso sendo que este fato está associado ao trabalho feminino fora do domicílio. Isso na maioria das vezes provoca mudanças nos hábitos alimentares da família, dando preferência às refeições industrializadas, pré-preparadas em várias modalidades nos diversos segmentos da sociedade

(Mendonça & Dos Anjos, 2004). Outros fatores têm sido estudados para explicar o desenvolvimento da obesidade: 1- genética, alguns genes estão envolvidos nesse processo; 2- nutrição intra-uterina, nutrição materna desequilibrada; 3- ocidentalização da dieta e estilo de vida dos países desenvolvidos (Kopelman, 2000).

O estado da obesidade é considerado patológico, caracterizado pelo excesso de tecido adiposo. Além do excesso de peso, a obesidade possui comorbidades associadas, as mais comuns são a *diabetes mellitus* tipo 2 (DMT2), hipertensão arterial, doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer (Bender, 2006). No Brasil é observado que o aumento do IMC da população está intimamente relacionado ao aumento do número de indivíduos que sofrem de DMT2, hipertrigliceridemia e tem baixo HDL (Cercato *et al*, 2004).

A comorbidade associada à obesidade com maior destaque hoje é a DMT2. Aproximadamente 80% dos indivíduos que apresentam essa comorbidade são também obesos (Bloomgarden, 2000). As proporções são assustadoras, no nível de se tornarem o maior problema de saúde mundial com extensão de epidemia (Wilding, 2007).

Ambas, obesidade e DMT2 têm como característica a resistência a insulina, ou seja, quando a insulina já não consegue mais estimular os tecidos periféricos a captar e utilizar a glicose circulante e inibir a produção da mesma pelo fígado (Kahn *et al*, 2006). Isso faz com que haja uma super produção e liberação da insulina com intuito de atingir a homeostase. Essa tentativa do organismo, no futuro pode causar a exaustão das células  $\beta$ -pancreáticas (Rosa, *et al*, 2007).

Em obesos mórbidos (OBM) tratamentos dietéticos e exercícios físicos não são eficazes na redução de peso e melhora das comorbidades dos indivíduos. Para esse perfil de obesidade, hoje, o tratamento mais indicado e efetivo é a cirurgia bariátrica (Miller, 2004; Wilding, 2007).

### 1.1.1 Cirurgia Bariátrica

A cirurgia da obesidade tem diferentes objetivos: redução da ingestão de alimentos e a redução da absorção dos nutrientes. Atualmente, a melhor opção para a maioria dos pacientes é o *bypass* gástrico em Y de Roux (*Roux-en-Y gastric bypass - RYGB*). Esta cirurgia combina os dois objetivos e resulta em uma excelente perda de peso e a mínima necessidade de suplementação vitamínica (Lynch *et al*, 2006; Rubino & Marescaux, 2004). Essa técnica é caracterizada pela diminuição no tamanho do estômago a 30-80 ml e anastomose do intestino delgado, geralmente na altura de 60 cm a partir do ligamento de Treitz, que pode atingir até 150 cm. (Figura 1). De acordo com Sowemimo *et al*, 2006, existe um grande benefício na qualidade de vida dos indivíduos obesos submetidos a esse tipo de intervenção cirúrgica, principalmente aqueles com idade inferior a 55 anos.



Figura 1. Bypass gástrico em Y de Roux - inclui a criação de uma pequena bolsa gástrica realizado por uma septação gástrica, enquanto o jejuno é dividido 60-100 cm distal ao ligamento de Treitz. A parte do jejuno distal é então anastomosado à pequena bolsa gástrica e uma jejunojejuno anastomose é realizada 150 centímetros distais da gastrojejuno anastomose (Figura cedida pelo COM/PUCRS).

Além da efetiva perda de peso, os indivíduos obesos mórbidos com DMT2, submetidos a essa cirurgia apresentam uma normalização dos níveis glicêmicos. Os resultados mostram que aproximadamente 80% dos indivíduos submetidos a RYGB deixam de necessitar o tratamento com drogas antidiabéticas (Whitson *et al*, 2007; Laferrère *et al*, 2008; Depaula *et al*, 2008). Isso ocorre logo após o procedimento cirúrgico, antes de ocorrer diminuição de peso dos pacientes. Autores acreditam que essa melhora está diretamente ligada a alterações na liberação das incretinas a partir das modificações anatômicas que ocorrem no trato gastrointestinal após a cirurgia. O duodeno e jejuno são os principais responsáveis pela liberação desses hormônios que estimulam a liberação da insulina (Rubino, *et al*, 2004; Depaula *et al*, 2008). As principais incretinas envolvidas nesse processo são GIP e GLP-1. A relação entre elas é responsável por 50 a 70% da liberação da insulina no organismo. Em indivíduos com DMT2 o efeito destas é significativamente diminuído. É observado que a secreção de GLP-1, pelas células do jejuno, é reduzida e que GIP apesar de apresentar níveis séricos normais ou elevados tem sua ação prejudicada pela resistência dos receptores pancreáticos (Vilsboll, *et al*, 2002).

## 1.2 INCRETINAS

Incretina é a denominação geral para os hormônios que são secretados pelo trato gastrointestinal na circulação sanguínea em resposta a ingestão de nutrientes, promovendo a liberação de insulina.

### 1.2.1 Peptídeo insulíntrópico dependente de glicose - GIP

O peptídeo insulíntrópico dependente de glicose (GIP) foi a primeira incretina descrita na literatura. Foi obtido e identificado em extrato de intestino delgado de cachorros, mostrando como função a inibição da secreção do ácido gástrico. Posteriormente, com o auxílio de técnicas mais apuradas e extratos mais purificados foi revelado que o GIP também pode estimular a secreção de insulina em animais e seres humanos (Baggio, Drucker, 2007; Edholm *et al*, 2008).

O gene GIP está localizado no braço longo do cromossomo 17, é formado por 6 éxons, sendo que a maioria das seqüências de codificação de GIP é encontrada no éxon 3. Sua expressão é descrita no estomago e células-K do duodeno e jejuno proximal (Baggio, Drucker, 2007).

Essa incretina é sintetizada na forma de pró-GIP, como um peptídeo de 153 aminoácidos, é ativada pela enzima PC1/3 e secretada através do estímulo dos alimentos (Figura 2) (Gautier *et al*, 2005).

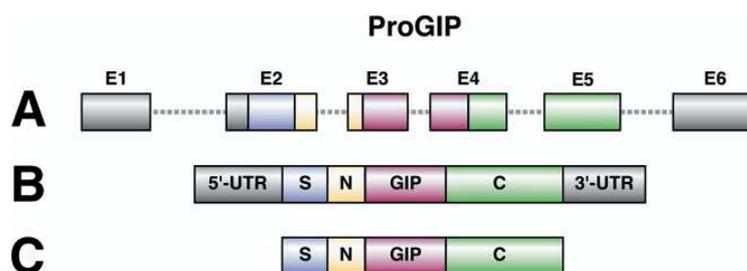


Figura 2. (A) Gene próGIP, (B) mRNA, e (C) proteína. GIP bioativo é gerado a partir do pró-GIP, através da clivagem, pós-transcrição, do único resíduo de arginina (Figura adaptada de Baggio & Drucker, 2007).

A liberação de GIP é estimulada principalmente por carboidratos e lipídeos. Pesquisa realizada com humanos saudáveis revela que a administração de glicose diretamente no duodeno, fez com que os níveis de GIP se elevassem rapidamente, chegando a um platô e assim se mantendo por

aproximadamente 30 min (Kuo *et al*, 2008). Um trabalho recente apresentado por Edholm e colegas, 2008, mostra que em ratos a infusão intraperitoneal de altas concentrações de glicose estimula a liberação de GIP, contudo o padrão de liberação de insulina demonstrou ser dependente do nível de glicose injetada e não dos níveis de GIP liberado. Em indivíduos saudáveis os níveis de GIP no jejum estão entre 0,06 e 0,1 nmol/L e aumenta até 0,2-0,5 nmol/L após a ingestão de alimentos. A atividade de GIP dura entre 7 em humanos saudáveis e 5 min em humanos DMT2 (Baggio & Drucker, 2007).

O GIP tem um importante papel na DMT2. A literatura sustenta que a secreção dessa incretina em indivíduos obesos diabéticos tende a ser elevada (Rubino *et al*, 2004), mas que sua ação é diminuída, prejudicando seu efeito insulínico (Gautier *et al*, 2005; Nauck *et al*, 1993). Isso é provocado pela resistência adquirida pelos receptores das células  $\beta$  do pâncreas. Essa resistência é adquirida da mesma forma que acontece com a resistência a insulina. Indivíduos obesos apresentam picos elevados de liberação de GIP e isso pode desencadear a resistência dos receptores para essa incretina. (DePaula *et al*, 2008b). Sendo assim, o indivíduo obeso com DMT2, pode apresentar uma secreção diminuída de insulina em resposta aos nutrientes ingeridos.

### **1.2.2 Peptídeo semelhante ao glucagon-1 - GLP-1**

Outra incretina sugerida como responsável pela melhora da diabetes após a cirurgia bariátrica é o peptídeo semelhante ao glucagon-1 (GLP-1). O gene que codifica GLP-1 (pró-glucagon) está localizado no cromossomo 2, sendo constituído por 6 éxons e 5 íntrons (White, Saunders, 1986). O gene do pró-glucagon é expresso em uma variedade de tecidos, entre eles as células  $\alpha$

do pâncreas, íleo, colon e reto (NOVAK *et al*, 1987), neurônios localizados no hipotálamo e região do tronco cerebral que recebe as sinalizações do intestino (Näslund & Hellström, 2007).

O GLP-1 é liberado no jejuno proximal, médio distal e ainda no íleo. A liberação de GLP-1 tem início aproximadamente aos 60 cm após o Ligamento de Treitz (Little *et al*, 2006). A sua liberação é estimulada pela ingestão de glicose e ácidos graxos, sofrendo um maior estímulo pelos alimentos líquidos (Brynes *et al*, 1998). A liberação desse hormônio é bi-fásica, inicia 10 a 15 min após a ingestão dos alimentos e num segundo momento, uma fase mais longa, entre 30 a 60 min (Baggio & Drucker, 2007).

A glicose exerce grande efeito sobre a liberação de GLP-1. Kuo e colaboradores (2008) demonstraram que a administração de glicose, diretamente no duodeno, produziu a liberação de GLP-1 atingindo máxima concentração em 15 min, permanecendo elevada por 30 min, voltando aos níveis basais após 45 min. Estudo realizado com ratos Goto-Kakizaki (GK) DMT2 e ratos Wistar NDM2 (não diabéticos do tipo 2), mostra que a infusão de glicose produz a liberação de GLP-1 que provoca uma rápida e intensa liberação de insulina, principalmente nos DMT2. No entanto o autor observa que a função incretínica nos ratos GK DMT2, quando induzida por altas doses de glicose, pode ser reduzida por um defeito intracelular de sensibilidade das células pancreáticas ao AMPc (Edholm, *et al*, 2008).

O mRNA do GLP-1 é transcrito em uma única forma com 180 aminoácidos nos diferentes tecidos (Figura 3). Seu processamento é realizado por enzimas denominadas pró-hormônio convertase (PC) que realizam a clivagem de um resíduo de arginina do peptídeo inicial, fazendo com que ele se transforme em um peptídeo bioativo com ação específica para cada tecido.

Muitas isoformas de PCs já foram descritas, mas apenas a PC2 e a PC1/3 tem papel importante no processamento do pró-glucagon (Ugheholdt *et al*, 2006). No pâncreas, a enzima que atua nesse processo é a PC2, que cliva o pró-hormônio gerando o glucagon. O glucagon é responsável pela contra-regulação da insulina, regula a produção de glicose hepática via glicogenólise e também gliconeogênese, mantendo a homeostase da glicose em um estado de jejum (Holst *et al*, 2008; Baggio & Drucker, 2007). Nas células-L do intestino e também no sistema nervoso central a enzima que atua é a isoforma PC1/3. Há o processamento do pró-glucagon liberando GLP-1, glicetina, oxintomodulina, peptídeo de intervenção-2 (IP-2) e GLP-2 (Drucker, 2006). Mas apenas o GLP-1 é capaz de estimular a liberação de insulina pelo pâncreas (Dhanvantari *et al*, 2001).

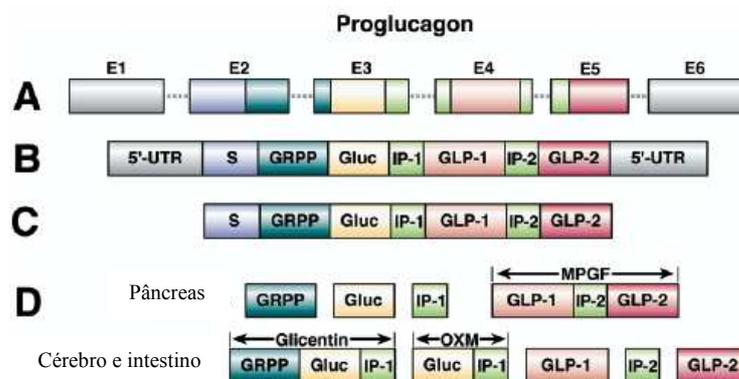


Figura 3. Estruturas do gene pró-glucagon (A), mRNA (B), e proteínas (C). Processamento tecido-específico pós-transcrição do pró-glucagon, no pâncreas leva à geração de polipeptídeo glicentina (GRPP), glucagon (gluc), peptídeo de intervenção-1 (IP-1), e grande fragmento de pró-glucagon (MPGF), enquanto glicentina, oxintomodulina (OXM), peptídeo de intervenção-2 (IP-2), GLP-1 e GPL-2 são liberados após processamento do pró-glucagon no intestino e cérebro (D) (Figura adaptada de Baggio & Drucker, 2007).

A ação do GLP-1 sobre as células pancreáticas compreende: aumento da expressão gênica e da biossíntese de insulina; efeito trófico e protetor sobre

as células  $\beta$ , aumentando a sua proliferação e reduzindo a apoptose (Drucker,2006).

O GLP-1 através do seu efeito insulínico regula os níveis de glicose sanguínea, diminuindo a secreção de glucagon e a produção de glicose hepática (Sandoval *et al*, 2008). Além disso, o GLP-1 está envolvido no esvaziamento gástrico por vias neuronais. Esse fenômeno chama-se “ileal brake”, os nutrientes presentes na parte distal do intestino delgado sinalizam uma redução da motilidade do intestino delgado proximal (Beglinger e Degen, 2006). Assim ocorre um melhor aproveitamento da glicose sanguínea pelos tecidos, indicando um sinal de saciedade que resulta em uma diminuição da ingestão de alimentos (Gautier *et al*, 2005, Hellström *et al*,2008).

Em indivíduos obesos e DMT2 ocorre uma secreção diminuída de GLP-1 comparada a indivíduos saudáveis (Gautier *et al*, 2005). No entanto, independente de seus níveis serem diminuídos o efeito insulínico desta incretina é preservado (Nauck *et al*, 1993; Vilsboll *et al*, 2002; Holst *et al*, 2008).

Os peptídeos GIP e GLP-1 têm sua liberação sincronizada ao longo do intestino, pela distribuição das células K e L, que são responsáveis, respectivamente, pela secreção dessas incretinas. Mortensen e colaboradores (2003) observaram que no início do duodeno existe alta liberação de GIP, que diminui gradativamente conforme o tubo digestivo vai se distanciando do ligamento de Treitz e ao mesmo tempo, há um aumento nos níveis de GLP-1 no jejuno proximal, médio distal e ainda no íleo.

A ação de GIP e GLP-1 é inativada rapidamente em humanos pela enzima dipeptidil peptidase IV (DPP-IV). O GLP-1 em particular tem uma meia vida no plasma de 1-2 minutos (Vilsboll *et al*, 2003; Meier *et al* 2004) e o GIP chega alcançar os 7 minutos de ação (Deacon *et al*, 2000; Meier *et al* 2004).

Após esse tempo ocorre a remoção de dipeptídeos de ambas incretinas inativando-as.

### 1.2.3 Pró-hormônio convertase 1/3 - PC1/3

Muitos peptídeos bioativos são gerados através da transformação proteolítica de seus precursores. GIP e GLP-1 são ativadas através do processamento pós-transcricional. Esse processo é realizado pela enzima pró-hormônio convertase 1/3 (PC 1/3) que faz parte da família de enzimas intracelulares serina-endoproteases, que age clivando resíduos de aminoácidos básicos dos pró-hormônios (Ugleholdt *et al*, 2004). A produção de GIP e GLP-1 ativos é completamente depende de PC1/3 (Zhu *et al*, 2002; Ugleholdt *et al*; 2004; Ugleholdt, 2006). Assim, a deficiência dessa enzima pode acarretar a falta dessas incretinas bioativas, resultando na diminuição da ação incretínica. Ugleholdt e colaboradores (2004), demonstram que camundongos PC1/3 *-/-* apresentam acúmulo de pró-glucagon em grânulos secretores nas células-L intestinais.

Jackson e colaboradores, em 1997, estudando três crianças com mutação no gene responsável pela maturação da transcrição da enzima PC1/3, constatou que esta mutação era a causa da obesidade e das alterações bioquímicas, envolvidas no metabolismo da glicose destas crianças. Em outro estudo foram avaliados 13.659 indivíduos entre obesos (IMC>30 Kg/m<sup>2</sup>) e não obesos com ancestrais europeus. Foi observada uma frequente variação do gene PCSK1, envolvido na transcrição da enzima PC1/3. Desta forma, o autor sugere que variações no gene PCSK1 contribuem para o desenvolvimento da obesidade poligênica (Benzinou *et al*, 2008).

#### 1.2.4 Dipeptidil peptidase IV - DPP-IV

Dipeptidil peptidase IV (DPP-IV), também conhecida como CD26, é uma protease ubíqua, do tipo serina protease que cliva especificamente dipeptídeos a partir do amino terminal de oligopeptídeo ou proteínas que contenham um resíduo de alanina ou prolina na posição dois, modificando sua atividade (De Meester *et al*, 1999).

O DPP-IV é essencial na inativação das incretinas GIP e GLP-1 (Figura 4), regulando a ação desses hormônios intestinais na homeostase pós-prandial da glicose, mantendo os efeitos funcionais do eixo enteroinsular (De Meester *et al*, 1999).

Ambos, GIP e GLP-1, são substratos para a DPP-IV, pois possuem na penúltima posição um resíduo de alanina. O GIP (1-42) é clivado pela DPP-IV, gerando GIP (3-42) inativo. Em humanos, GLP-1 (7-36) ou (7-37)NH<sub>2</sub> bioativos, podem ser inativados pela DPP-IV produzindo GLP-1 (9-36) e (9-37), respectivamente (Baggio & Drucker, 2007). Por esse motivo, inibidores de DPP-IV são muito estudados como tratamento para o DMT2. Bloqueando a atividade da enzima há um aumento dos níveis plasmáticos das incretinas GIP e GLP-1, aumentando o estímulo para a secreção de insulina e diminuindo a glicose sanguínea após as refeições (Holst *et al* 2009; Drucker & Nauck, 2006).

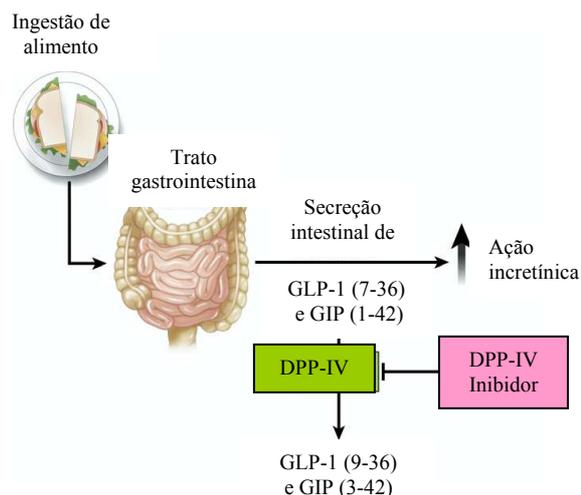


Figura 4. GLP-1 e GIP bioativos são liberados no intestino delgado após a ingestão de alimentos, estimulando a secreção de insulina. DPP-IV (DPP-4) converte rapidamente GIP e GLP-1 para os seus metabólitos inativos. A inibição da atividade de DPP-IV (DPP-4) impede a degradação de GLP-1 e de GIP, aumentando assim a ação das incretinas (Figura adaptada de Baggio & Durcker, 2007)

Essa enzima também se liga ao colágeno e adenosina deaminase, aumentando a proliferação e ativando as células T. Yamada e colaboradores (2009), mostram que CD26/DPP-IV tem um papel importante na proliferação e sobrevivência de células cancerígenas. Entretanto, Kotachová e colaboradores (2009), citam em sua revisão que inúmeros tipos de tumores apresentam alterações na atividade desta enzima que podem ter efeito pró ou anti-oncogênico.

A enzima DPP-IV é amplamente expressa e pode ser encontrada em vários tecidos e tipos celulares, incluindo rins, pulmão, glândula adrenal, fígado, intestino, testículos, pâncreas e sistema nervoso central, bem como sobre a superfície de linfócitos e macrófagos. Notavelmente, a DPP-IV também é encontrada nos vasos sanguíneos da mucosa intestinal, que estão posicionados adjacentes com os sítios de secreção de GLP-1. Conseqüentemente, mais da metade do GLP-1 é rapidamente inativado pela DPP-IV após entrar na circulação. Além da forma ligada na superfície da célula, essa enzima também é encontrada como proteína solúvel na circulação (Baggio & Drucker, 2007).

Além disso, após a ingestão de alimentos, o peptídeo YY, secretado pelas células-L na mucosa intestinal do íleo e intestino grosso, sofre processamento pela DPP-IV, sendo transformado da forma orexígena, PYY (1-36), para PYY (3-36) com função anorexígena (Papadimitriou *et al*, 2007, Ueno *et al*, 2008).

### 1.3 ÁCIDOS GRAXOS MONOINSATURADOS *cis* E *trans*

#### 1.3.1 Aspectos químicos dos ácidos graxos

Os ácidos graxos (AG) são caracterizados por apresentarem uma cadeia carbonada linear com um grupo metil numa extremidade e um grupo carboxil na outra. A maior parte dos AG em humanos apresenta entre 16 e 20 carbonos divididos em saturados e insaturados que podem apresentar configuração *cis* ou *trans*.

Ácidos graxos que apresentam configuração *cis*, são caracterizados por conter uma ou mais insaturações, sendo que os hidrogênios se encontram no mesmo plano da cadeia carbonada. Ácidos graxos *trans* são isômeros geométricos dos monoinsaturados *cis*. Mais especificamente, os átomos de hidrogênio estão em planos opostos das ligações duplas, alterando sua configuração e propriedades químicas (Lehninger *et al*, 1995).

O ácido oléico é não essencial, apresenta 18 carbonos, é monoinsaturado ( $\omega$ -9), tem configuração *cis* (18:1 9c). Nesse AG a dupla ligação com configuração *cis* provoca uma curvatura na cadeia de hidrocarboneto. Dessa forma, o agrupamento entre esses AGs não se apresenta compactado, e sim com interações fracas entre eles. Por esse motivo necessitam menor energia térmica para desfazer esses rearranjos,

apresentando ponto de fusão mais baixo que os AGs saturados com o mesmo comprimento de cadeia (fig 4) (Lehninger *et al*, 1995).

O ácido elaidico, é também chamado de ácido graxo *trans* industrial (18:1 9*t*) porque é formado pela hidrogenação parcial do ácido oléico, proveniente dos óleos vegetais. Apresenta a cadeia carbonada na forma linear, semelhante aos AGs saturados. Por isso, se agrupam de forma fortemente compactada necessitando assim maior quantidade de calor para dissociar as cadeias desses AGs (Figura 5) (Lehninger *et al*, 1995).

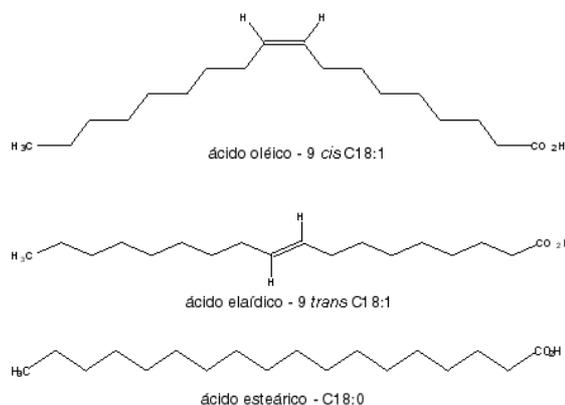


Figura 5: Representação do ácido graxo oléico, eláidico e esteárico; destaque para os isômeros *cis* e *trans*. Adaptado de Costa e colaboradores 2006.

Existe ainda o ácido graxo *trans* monoinsaturado, obtido de forma natural, denominado ácido vaccênico, ou ácido do rúmen (18:1 11*t*). Esse é resultante da biohidrogenação do ácido linoléico no rúmen de animais (Tardy *et al*, 2009). Suas propriedades químicas e sua configuração espacial são semelhantes aos AGs saturados e aos monoinsaturados de configuração *trans*, possui uma cadeia linear de hidrocarbonetos que podem apresentar forte compactação, exigindo maior força térmica para desfazer o rearranjo (Figura 6).

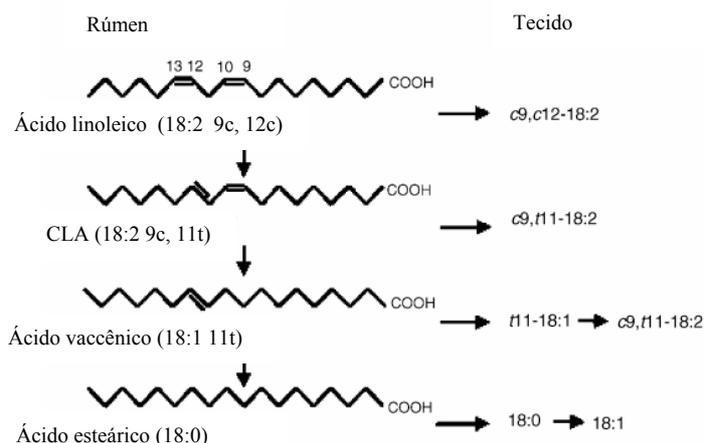


Figura 6. Formação do ácido vaccênico no rumen, e a conversão em CLA no rumen e nos tecidos. (Figura adaptada de Pfeuffer & Schrezenmeir, 2006).

### 1.3.2 Efeitos dos ácidos graxos monoinsaturados *cis* e *trans* sobre o metabolismo

Os ácidos graxos da alimentação têm recebido grande atenção da sociedade científica. Muitos estudos demonstram que a mudança na dieta e na qualidade dos ácidos graxos consumidos, podem ser potenciais indutores de resistência à insulina, diabetes do tipo 2, doenças cardiovasculares e ainda contribuir para o desenvolvimento da obesidade (Saravanan *et al*, 2005; Willett, 2006; Risérus, 2006). Por outro lado, os autores mostram que a qualidade dos lipídeos da dieta tem influência positiva sobre a sensibilidade à insulina e outras anormalidades ligadas à resistência a insulina. É observado que AG monoinsaturado *cis* melhora a sensibilidade à insulina, diminui a hipertensão arterial, aumenta HDL-colesterol (Vessby *et al*, 2001). Mas muitos resultados ainda são contraditórios quanto ao efeito dos AG no organismo humano.

### 1.3.2.1 Ácido Oleico

Um estudo realizado por Vessby e colaboradores (2001), utilizando diferentes dietas, não relatou benefício de uma dieta contendo AG monoinsaturado *cis*, ácido oléico, sobre a sensibilidade a insulina, quando a dieta continha grandes quantidades de gorduras. Por outro lado a mudança na proporção dos AG, diminuição de saturados e aumento de moninsaturados, induziu uma melhora significativa na sensibilidade à insulina em indivíduos que ingeriram dieta com menor teor lipídico. Assim, é sugerido observar não somente a composição de AG total da dieta, mas a proporção com que eles são consumidos. Outros autores sugerem que uma alimentação com estilo mediterrâneo (azeite de oliva, rico em AG monoinsaturado, alimentos folhosos, pouco processados e menor quantidade de carboidratos refinados) pode ser um novo meio para o manejo da síndrome metabólica (Lerman *et al*, 2008). Contradizendo esses efeitos, Kim e colegas (2009) mostraram que o tratamento de linhagens de células hepáticas (HepG2 e Chang liver) com concentrações crescentes de ácido oléico (125 a 500  $\mu\text{M}$ ), diminui a expressão dos receptores de insulina e assim diminui a cascata de sinalização deste hormônio.

### 1.3.2.2 Ácido Elaídico

O ácido eláidico, é um ácido graxo monoinsaturado com configuração *trans*, obtido através da hidrogenação industrial do ácido oléico presente nos óleos vegetais. No século 20, foi observado um aumento no consumo do ácido eláidico, pois o uso da gordura vegetal hidrogenada tornou alguns alimentos mais acessíveis à população, principalmente pela diminuição dos valores de

mercado, bem como melhorou a estabilidade e o tempo de conservação dos mesmos (Pfeuffer & Schrezenmeir, 2006).

Dados epidemiológicos sugerem que o consumo crônico de ácido graxo *trans* industriais, o elaidico, especialmente por mulheres obesas com baixa atividade física, pode aumentar o risco de desenvolver diabetes do tipo 2, no entanto os resultados mantiveram-se inconclusivos (Salmeron *et al*, 2001). Posteriormente, alguns autores defenderam que o consumo de ácido elaidico, está intimamente ligado ao aumento de doenças cardiovasculares (Willett, 2006), resistência a insulina, diabetes do tipo 2 (Risérus, 2006) e comorbidades associadas, tais como, aumento da LDL-colesterol, diminuição da HDL-colesterol e dislipidemias, além disso também foi observada associação com o câncer de mama e de cólon (Moreira *et al*, 2001).

Tardy e colaboradores (2009) mostraram que AG *trans* obtidos a partir de fontes industriais, quando ingeridos em níveis considerados nutricionalmente normais pelos autores (5,58 g/dia) não prejudicaram a sensibilidade insulínica em músculo de mulheres saudáveis com sobrepeso e obesidade abdominal. Por outro lado, foi observado em obesos e indivíduos insulino-resistentes, que uma dieta rica em ácido elaidico induz o aumento da insulinemia pós-prandial, o que sugere uma diminuição da tolerância à glicose (Christiansen *et al*, 1997). Além disso, a gordura hidrogenada tem sido claramente relacionada com doenças cardiovasculares (Chardigny *et al*, 2008; Motard-Belanger *et al*, 2008).

### 1.3.2.3 Ácido Vaccênico

O ácido vaccênico (C18:1 11t), é um ácido graxo *trans* produzido naturalmente por animais ruminantes. Ele é o resultado da biohidrogenação natural feita pela flora microbiológica do rumem (Turpeinen *et al*, 2002). Esse ácido graxo encontra-se em maior quantidade nos lipídeos dos produtos provenientes dos ruminantes (leite, iogurte, manteiga) ( Hunter, 2005). Na Europa, o vaccênico é a maior fonte de AG *trans* consumido, porque a dieta é rica em leite e derivados. Entretanto, a gordura do leite contém baixas quantidades de AG *trans*, atingindo 3 a 7%/g, comparado com o óleo vegetal hidrogenado (10-60%/g) utilizado em outros países ocidentais (Tardy *et al*, 2009). Um estudo nutricional realizado com homens jovens saudáveis mostrou que produtos lácteos, ricos em AG vaccênico, não têm efeito nos níveis de insulina e glicose de jejum (Tholstrup *et al*, 2006). Tardy e colaboradores (2009) demonstraram que ácido vaccênico ingerido a partir de derivados lácteos em quantidades ditas normais (4,86 g/dia) não prejudica a sensibilidade a insulina em músculo de mulheres com sobrepeso.

## 1.4 JUSTIFICATIVA

Nada se conhece a nível molecular sobre as incretinas GIP e GLP-1, bem como das enzimas PC1/3 e DPP-IV, no intestino de obesos mórbidos submetidos à cirurgia bariátrica. Apenas se observa, em outros trabalhos, que os níveis séricos desses peptídeos estão alterados, apontando algumas explicações para a melhora repentina da DMT2 nesses indivíduos OB grau III, após a cirurgia bariátrica. A cirurgia modifica a anatomia do trato gastrointestinal, acarretando uma digestão modificada, onde os alimentos passam por um diminuto estômago e chegam precocemente ao jejuno proximal

(60 ou 100 cm do ligamento de Treitz) estimulando diretamente as células enteroendócrinas do intestino. Dessa forma, a transcrição dos genes citados acima pode ser modulada diferentemente pós-cirurgia pelos nutrientes da alimentação. Antes da cirurgia, estes são absorvidos, principalmente a glicose, no duodeno e os ácidos graxos no jejuno proximal. Após cirurgia ambos os nutrientes são absorvidos no jejuno a 60 ou 100 cm distantes do ligamento de Treitz. Assim, procuramos conhecer a expressão basal de mRNA das incretinas GIP e GLP-1, e das enzimas relacionadas, PC1/3 e DPP-IV no jejuno de obesos mórbidos DMT2 e NDM2. Além disso, estudamos a modulação *in vitro* desses genes por ácidos graxos monoinsaturados, *cis* e *trans*, e altas doses de glicose. Desta forma, este trabalho de pesquisa pretende contribuir para o entendimento da melhora da resistência a insulina e diabetes dos indivíduos submetidos a cirurgia bariátrica.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Capítulo I – Avaliar a diferença na expressão basal de mRNA de GIP, pró-glucagon, PC1/3 e DPP-IV, no jejuno proximal entre obesos mórbidos diabéticos e não diabéticos.

Capítulo II - Avaliar o efeito dos ácidos graxos monoinsaturados (*cis* e *trans*) e glicose sobre a expressão de mRNA de GIP, pró-glucagon, PC1/3 e DPP-IV, em fatias de jejuno proximal de obesos mórbidos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Capítulo I - Quantificar a expressão basal de mRNA de GIP, pró-glucagon, PC1/3 e DPP-IV no jejuno proximal de obesos mórbidos diabéticos e não diabéticos.

- Comparar a expressão basal de mRNA de GIP, pró-glucagon, PC1/3 e DPP-IV, no jejuno proximal de obesos mórbidos diabéticos e não diabéticos.

- Comparar os níveis de glicose antes e após a cirurgia RYGB entre os dois grupos de pacientes.

Capítulo II - Quantificar a expressão de mRNA de GIP, pró-glucagon, PC1/3 e DPP-IV, em fatias de jejuno proximal de obesos mórbidos, após tratamento com ácido oléico, eláidico, vaccênico e glicose em alta concentração.

- Comparar o efeito dos tratamentos com diferentes ácidos graxos monoinsaturados e alta concentração de glicose, sobre a expressão de mRNA

de GIP, pró-glucagon, PC1/3 e DPP-IV, em fatias de jejuno proximal de obesos mórvidos.

## **PARTE II**

## CAPÍTULO I

### **Heterogeneous proglucagon, GIP, PC1/3 and DPP-IV mRNA expression in jejunum of morbidly obese NDM2 and T2DM individuals**

(Manuscrito submetido)

Obesity Surgery

Heterogeneous proglucagon, GIP, PC1/3 and DPP-IV mRNA expression in jejunum of morbidly obese NDM2 and T2DM individuals

Francieli Rohden<sup>1</sup>; Rogério Margis<sup>1,3</sup>,PhD; Cintia S Costa<sup>1</sup>; Thais O Hammes<sup>1</sup>; Josiane W Bortolotto<sup>1</sup>,MS; Alexandre V Padoin<sup>2</sup>,MS; Cláudio C Mottin<sup>2</sup>,PhD; Regina Maria Guaragna<sup>1</sup>,PhD.

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica, UFRGS. <sup>2</sup>Centro de Obesidade Mórbida, Hospital São Lucas, PUCRS. <sup>3</sup>Centro de Biotecnologia, UFRGS. Porto Alegre, RS, Brazil.

Correspondence to:

Regina Maria Guaragna

Address: Departamento de Bioquímica. ICBS. UFRGS.

Rua Ramiro Barcelos 2600 – anexo

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

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

Tel: 55 51 3308 5546 or 55 51 3308 5539

FAX number: 55 51 3308 5540

## Abbreviations

GIP = glucose-dependent insulinotropic polypeptide

GLP-1 = glucagon-like peptide-1

PC 1/3 = prohormone convertase 1/3

DPP-IV = dipeptidyl peptidase-IV

mRNA = messenger RNA

qRT-PCR = quantitative real-time polymerase chain reaction

T2DM = type 2 *diabetes mellitus*

NDM2 = non type 2 *diabetes mellitus*

OB = obese

NOB = non obese

HbA1C: Glycated hemoglobin

## *Abstract*

*Background:* Bariatric surgery is the most effective therapeutic option for obesity and its complications, especially in type 2 diabetes; this can be accounted for by the exclusion of part of the gastrointestinal tract with its associated endocrine activity. The aim of this work was to investigate the mRNA expression of proglucagon (GLP-1 precursor), GIP, PC1/3 and DPP-IV in the gastrointestinal jejunum cells of the morbidly obese (OB). *Methods:* jejunum mucosal samples were obtained at 60 or 100 cm from the Treitz ligament, from 25 OB: 17 non type 2 diabetes mellitus (NDM2) and 8 type 2 diabetes mellitus (T2DM). Total RNA was extracted using TRIzol. Proglucagon, GIP, PC1/3 and DPP-IV reverse transcripts were determined by the quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR). *Results:* NDM2 and T2DM subjects showed non-significantly different proglucagon, GIP and DPP-IV mRNA expression. PC1/3 mRNA was not detected in any patient's jejunum. Only NDM2 showed more PC1/3 mRNA expression with a statistically significant tendency ( $p=0.065$ ). PC1/3 was correlated negatively with BMI, waist and hip size. Proglucagon mRNA expression was negatively correlated with HbA1C. All patients presented heterogeneous mRNA expression and could be divided into two statistically different groups: one with high and other with low mRNA expression of all genes studied. Triglycerides, cholesterol and glucose elevated in T2DM were normalized three months after surgery. *Conclusion:* Morbidly obese NDM2 and T2DM showed no different mRNA expression of incretins and related enzymes at 60 and 100 cm of jejunum, respectively. PC1/3 and proglucagon can be related to the development of obesity and to the clinical outcome of OB. Heterogeneous mRNA expression of all genes studied in obese NDM2 and T2DM, could be modulated by epigenetic factors.

*Key words:* glucagon-like-peptide-1; glucose-dependent insulinotropic peptide; dipeptidyl peptidase IV; prohormone convertase; morbidly obese

## *Introduction*

Obesity is becoming a worldwide epidemic. It is a major risk factor for cardiovascular disease and is directly linked to the development of type 2 diabetes (1, 2). In individuals with severe obesity ( $BMI \geq 40 \text{Kg/m}^2$ ), bariatric surgery is the most effective therapeutic option for reduction of weight and its attendant complications (3). The anatomical and functional changes produced by the surgery contribute most to normalizing the parameters related to this metabolic syndrome (4-9). This can be explained by the exclusion of part of the gastro-intestinal tract (duodenum and proximal jejunum) which has important endocrine activity (10-14). Among the products of these endocrine cells are the glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP) and glucagon-like peptide-1 (GLP-1). These are key modulators of insulin secretion, glucose homeostasis, and gastric emptying.

The pro-GIP gene, expressed in K cells, is secreted in the bioactive form (GIP) into a part of the duodenum and proximal jejunum (15). It induces the release of insulin by pancreatic  $\beta$ -cells, acting as mediators of the entero-insular axis. GIP has also been shown to be active in the modulation of both proliferation and apoptosis  $\beta$ -cells (16).

GLP-1 is a product of post-translational cleavage of the peptide pro-glucagon, synthesized and released by L-cells of the ileum, colon, rectum, pancreatic  $\alpha$ -cells and nervous system. GLP-1 inhibits glucagon secretion (17) and stimulation of glucose-dependent insulin release (18) also inhibits gastric emptying (19, 20). Precursors of GIP and GLP-1 are cleaved by the enzyme prohormone convertase 1/3 (PC 1/3), which is co-located with GLP-1 in the intestinal L-cells (15). Although several prohormone convertase (PC) enzymes are responsible for the post-translational processing of proglucagon and proGIP precursor, only PC1/3 and PC2 appear to be important for prohormone processing (21). The action of incretins is completed by the cleavage of the

N-terminal peptides by a tissue and seric dipeptidyl-peptidase amino peptidase IV (DPP-IV) (22).

Little is known about the mechanisms of food-induced production, release and activation of these incretins before and after the bariatric surgery. GLP-1 release has been found to be lower in OB subjects compared with NOB (23, 24). Studies show that after bariatric surgery the serum level of GLP-1 increased considerably in obese type 2 diabetics mellitus (T2DM) and non diabetic mellitus patients (NDM2) (25) and clinical data demonstrated the improvement of glycemia in individuals (26). It is possible that after surgery the food directly stimulates the L-cells in the medium jejunum to release GLP-1 (27). However, we know nothing about the molecular changes in the gastrointestinal cells of obese T2DM and NDM2.

The aim of this work was to investigate the basal pattern of mRNA expression of proglucagon, GIP, PC1/3 and DPP-IV in gastrointestinal endocrine jejunum cells of the morbidly obese T2DM and NDM2. We evaluated the mRNA levels of these genes to determine the molecular basis of incretin secretion and understand the metabolic alterations in the morbidly obese submitted to bariatric surgery.

### *Materials and Methods*

#### *Samples*

Proximal jejunum mucosal samples were obtained from 17 morbidly obese non diabetic patients (NDM2) and 8 morbidly obese type 2 diabetics (T2DM) who underwent bariatric surgery in COM/ PUCRS, Brazil. The weight of these patients had been stable for at least a year. Obese patients NDM2 had the section of the jejunum at 60 cm from the Treitz ligament and obese T2DM had the section at 100 cm. Samples were collected during surgery and were immediately immersed in TRIzol reagent. Experiments were approved by the ethical committee of the Federal University of Rio

Grande do Sul (n° 2007949), and all subjects were informed about the aim of the study and signed the informed consent form.

#### *Analysis of human gene expression*

Approximately 2 µg of total RNA were added to each cDNA synthesis reaction using the SuperScript II-TEN preamplification system (Invitrogen). Reactions were performed at 42°C for 1h using the first T23V (5' TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTV). Quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) amplification was carried out using specific primer pairs for proglucagon (precursor of GLP-1), pro-GIP (precursor of GIP), dipeptidyl-peptidase-IV (DPP-IV), prohormone convertase (PC1/3) and the internal control β-actin. The sequences of the primers used are listed in Table 1. qRT-PCRs were carried out in an Applied Biosystem-7500 real-time cycler. Reaction settings comprised an initial denaturation step of 5 minutes at 95°C, followed by 40 cycles of 15 s at 95°C, 10s at 60°C, 15s at 72°C and 35s at 60°C; samples were held for 15s at 95°C for annealing and then heated for 1 minute to 60°C with a ramp of 0.1°C/s to acquire data to produce the denaturing curve of the amplified products. qRT-PCRs were carried out in a final volume of 20µl, composed of 10µl reverse transcript of each sample diluted 10 to 100 times, 2µl of 10 x PCR buffer, 1.2µl of 50mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1µl of 5mM dNTPs, 0.4µl of 10µM primer pairs, 4.25µl of water, 2.0µl of SYBR green (1:10.000 Molecular Probe), and 0.05µl of Platinum Taq DNA polymerase (5 U/µl) (Invitrogen).

#### *Data analysis*

We quantified gene expression using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (threshold cycle) method (28). For each sample, analyzed in quadruplicate, a ΔCT value was obtained by subtracting the β-actin CT value from the CT of the gene of interest. Obese patients NDM2 were used as the calibrator group. All genes were analyzed taking this patient group as a reference, to calculate the relative ΔΔCT for each gene.

Evaluating the results we observed that all obese patients studied could be divided into two groups: one with low mRNA expression of genes under study and the other with high mRNA expression. Thus we divided the patients related to GIP mRNA expression and used the high GIP mRNA expression as calibrator group for the second calculation.

### *Statistical analysis*

Statistical analysis of anthropometric and biochemical parameters of morbidly obese patients NDM2 and T2DM were calculated using the independent sample test- $T \pm SD$ . Glucose levels only were calculated using the non-parametric U Mann-Whitney test, with confidence interval 95%. Mean glucose levels in blood pre and post-surgery were compared using the Paired Samples T Test with a significance value of  $p \leq 0.05$ .

Exponential median values for each gene mRNA expression in the jejunum were compared between the two patient groups using the non-parametric U Mann-Whitney test, with confidence interval 95%. Correlations between expression of genes and biochemical and anthropometric data were performed using the Spearman test.

### *Results*

Individuals who were willing to participate in the study underwent bariatric surgery bypass gastric Y-Roux at the Hospital São Lucas PUCRS/Brazil, were divided into groups NDM2 and T2DM. We observed that the two groups differ in age ( $p=0.005$ ); individuals NDM2 are generally younger than patients diagnosed as T2DM. In evaluating the biochemical data we can see that there is a difference in some parameters before surgery between NDM2 and T2DM patients. T2DM subjects showed higher levels of total cholesterol compared to NDM2 (T2DM 215 mg/dL and NDM2 189 mg/dL,  $p = 0.068$ ) and blood glucose (T2DM 111 mg/dL, NDM2 92 mg/dL,  $p = 0.037$ ). Approximately three months after surgery T2DM decreased these parameters

and there was no statistical difference with NDM2 patients (table 2). Both groups NDM2 and T2DM, showed a statistically significant decrease in glucose levels after surgery (table 3).

Incretin production and secretion by jejunum cells has been related to important endocrine activity and these are key modulators of insulin secretion and glucose homeostasis. Thus, we analyzed the expression of proglucagon, GIP, DPP-IV and PC1/3 mRNA in the proximal jejunum of morbidly obese NDM2 and T2DM patients by qRT-PCR.

First, we used the control group NDM2 as a calibrator group. There was no statistical difference in mRNA expression between NDM2 and T2DM patients (table 4). There was no difference in incretin and enzyme mRNA expression between 60 cm and 100 cm jejunum cells. Only NDM2 (60 cm) showed more PC1/3 mRNA expression with a statistically significant tendency ( $p=0.065$ ). Also, we observed that PC1/3 mRNA was not detected in jejunum cells of all patients; only in 8 NDM2 and in 5 T2DM patients.

It was observed that the gene expression of NDM2 patients (60 cm from the ligament of Treitz) and of T2DM patients at 100cm was highly heterogeneous. The patients did not show the same pattern of expression in all genes studied (data not shown). There were patients with a discrepancy in mRNA expression of the GIP gene (see median values and confidence interval in table 4). Thus, we separated all patients into two groups for subsequent analyses: one with high and other with low GIP mRNA expression (low and high  $\Delta$ Ct expression, respectively). For a second calculation, we used the individuals with high mRNA GIP expression as calibrator group. This division showed that all mRNA genes studied demonstrated the same pattern: high or low mRNA expression, significantly different. There were two population groups:

individuals with either higher or lower mRNA expression of the genes under study (table 5).

The main point of our analysis was to understand the difference between NDM2 and T2DM in terms of the pattern of mRNA expression of jejunum incretins and enzymes. But this was impossible because the population studied had heterogeneous mRNA expression of these genes. However, correlation analysis between gene transcripts, biochemical and anthropometric data was the same, when we utilized the data divided into NDM2 and T2DM (higher and low GIP expression groups). The expression of PC1/3 mRNA was negatively correlated with BMI ( $r = -0.814$ ,  $p = 0.001$ ), waist size ( $r = -0.746$ ,  $p = 0.005$ ) and hip size ( $r = -0.615$ ,  $p = 0.033$ ). We also saw that there was a correlation between PC1/3 mRNA expression with DPP-IV ( $r = 0.681$ ,  $p = 0.010$ ), proglucagon ( $r = 0.664$ ,  $p = 0.018$ ) and GIP mRNA expression ( $r = 0.720$ ,  $p = 0.006$ ). The proglucagon and GIP mRNA expression was positively correlated to one another ( $r = 0.479$ ,  $p = 0.028$ ) and both were correlated with DPP-IV ( $r = 0.622$ ,  $p = 0.003$  and  $r = 0.790$ ,  $p = 0.000$  respectively). Proglucagon showed a negative correlation with HbA1c ( $r = -0.481$ ,  $p = 0.037$ ).

### *Discussion*

Obesity is a pathological state that involves other co-morbidities in particular in type 2 diabetes (2). For individuals classified as obese morbid the most effective treatment for loss of weight is bariatric surgery. Obese diabetics, after the procedure, have shown an immediate improvement in the levels of glucose, thus allowing a reduction in the administration of anti-diabetic drugs (25). There is an anatomical change in the gastrointestinal tract of individuals who undergo surgery and this would involve the secretion of peptides associated with insulin secretion, the incretins, among them GIP and GLP-1 (29).

Circulating levels of GIP and GLP-1 are very low in the fasting state, and rapidly increase following food ingestion. Both GIP and GLP-1 are extensively and rapidly degraded by the enzyme aminopeptidase dipeptidyl-peptidase IV (DPP-IV), decreasing the plasma half-life ( $t_{1/2}$ ) of incretins *in vivo* to only 1-2 min (15). Therefore it is important to study the basal pattern of incretin mRNA expression to understand the metabolic alterations in the morbidly obese submitted to bariatric surgery. We evaluated the mRNA levels of the genes of GLP-1, GIP, PC1/3 and DPP-IV in gastrointestinal endocrine jejunum cells of the morbidly obese NDM2 and T2DM submitted to bariatric surgery.

The surgical team cuts the intestine of obese T2DM patients at 100cm or more and NDM2 patients at 60cm distant to the Treitz ligament. It is known that this improves T2DM clinical parameters (4, 7). We observed that at 60 or 100 cm distal to the ligament of Treitz, the jejunum mucosal cells of NDM2 and T2DM patients expressed relative proglucagon, GIP and DPP-IV mRNA that were not statistically different, but there was heterogeneous expression in both groups of patients. Our results show that after bariatric surgery fast glucose levels are decreased in T2DM, reaching normal values. Relative mRNA expression of incretins and enzymes at 60 and 100 cm of the jejunum can justify this surgical procedure, as there is no difference between these two groups. More studies are needed to establish the molecular basis to justify the intestinal cut point and to understand the metabolic outcome of surgery for NDM2 and T2DM obese.

PC1/3 enzyme is responsible for the post-translational processing of proglucagon and pro-GIP precursor. We report that NDM2 shows more PC1/3 mRNA expression than T2DM and that PC1/3 mRNA is not detected in some patients. This could be important in the pathophysiological basis of incretin deficiency in type 2 diabetes of the morbidly obese. T2DM patients can show little GLP-1 and GIP peptide,

because PC1/3 mRNA expression is necessary for active incretin production. Some studies show the PC1/3 gene could be linked to the development of obesity. Our study showed a negative correlation of PC1/3 with IMC, waist and hip size, and this may reinforce the hypothesis of down expression of PC1/3 being linked to obesity. A gene mutation codifying a human congenital PC1/3 deficiency has been described; the syndrome is characterized by obesity and small intestine dysfunction (30). Jackson et al (30, 31) suggested that this gene mutation caused a failure of enzyme maturation, inactive PC1/3 propeptide is produced. Benzinou et al (32) studied 13,659 participants of European ancestry and associated the nonsynonymous PCSK1 (pro-hormone convertase 1/3 gene) variants with polygenic obesity. These results show that PC1/3 has an important role in human metabolic and endocrine disease. We suggest that the diverse expression of PC1/3 mRNA in the jejunum of the morbidly obese NDM2 and T2DM could be linked to this mutation or to transcriptional control. It is necessary to investigate PC1/3 in order to identify specific therapeutic targets for common obesity and diabetes treatment.

The ubiquitous enzyme, dipeptidyl peptidase IV, cleaves N-terminally, removing a dipeptide and thereby inactivating both peptides GLP-1 and GIP, since the N-terminus is crucial for receptor binding (21, 33). In all patients DPP-IV activity could be involved in the regulation of the biological activity of incretins, since this enzyme transcript was positively correlated with proglucagon, GIP and PC1/3 mRNA expression. NDM2 and T2DM patients did not show different DPP-IV mRNA expression, since it is a ubiquitous enzyme.

GLP-1, also food-stimulated, is associated with weight loss, induces satiety and reduces food consumption in normal, obese and diabetic human subjects (34). HbA1C was negatively correlated with proglucagon mRNA expression in our patients. This agrees with GLP-1 attenuation in human type 2 diabetes (35).

We observed that heterogeneous GIP mRNA expression divided the patients into two groups: one with high and the other with low mRNA expression in all genes. That GIP mRNA expression increases in obese patients was also recorded by Fukase *et al* (36), who showed exaggerated GIP release in obese subjects during oral glucose tolerance tests. GIP has also been shown to promote energy storage via direct action on adipose tissue (17). Although GIP stimulates insulin secretion in normal human subjects, its insulintropic actions are markedly attenuated in T2DM (37). These findings suggest that type 2 diabetes may be associated with both genetic and acquired resistance to GIP action (35). Incretins are secreted in response to food ingestion, especially glucose or fat. In humans, fat is the most potent stimulator of GIP secretion and our results suggest nutritional regulation during the life of the morbidly obese. The obese, especially the insulin resistant or diabetics, have decreased response to GIP because  $\beta$ -cells are resistant to GIP action (17, 38).

Mortensen *et al* (39) studying porcine jejunum observed that the percentage of GLP-1 immunoreactive endocrine cells increased gradually from the upper jejunum to distal ileum. From this observation it is expected that at 100cm from the ligament of Treitz there would be greater proglucagon mRNA expression but it was not observed in T2DM patients studied here. In our study, the endocrine cells at 60 and 100 cm of gut revealed no difference in GIP and proglucagon mRNA expression. The enzyme PC1/3 responsible for activation of incretins showed a decreased expression in T2DM. Also, PC1/3 expression was negatively correlated with anthropometric data related to the development of obesity (30, 31).

In conclusion, heterogenic gene expression in obese NDM2 and T2DM could be modulated by epigenetic factors, which promote individually different outcomes. The metabolic alterations in morbidly obese patients could be associated with a primary pathogenic factor, the bioactivation of incretins by enzyme PC1/3.

Additional molecular studies need to be performed in obese patients submitted to bariatric surgery in order to understand the clinical outcome.

### *References*

1. Ranganath LR. The entero-insular axis: implications for human metabolism. *Clin Chem Lab Med* 2008; 46 (1): 43–56.
2. Duval K, Marceau P, Lescelleur O, et al. Health-Related Quality of Life in Morbid Obesity. *Obes Surg* 2006; 16: 574-9.
3. Kral JG, Näslund E. Surgical treatment of obesity. *Nature clinical practice endocrinology & metabolism* 2007; 3 (8): 574-83.
4. 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: 1–11.
5. Zimmet P, Alberti KGMM, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 2001; 414 (13): 782-7.
6. Schauer PR, Burguera B, Ikramuddin S, et al. Effect of laparoscopic Roux-en Y gastric bypass on type 2 diabetes mellitus. *Ann Surg* 2003; 238: 467–85.

7. Alexandrides TK, Skroubis G, Fotis K. Resolution of Diabetes Mellitus and Metabolic Syndrome following Roux-en-Y Gastric Bypass, and a Variant of Biliopancreatic Diversion in Patients with Morbid Obesity. *Obes Surg* 2007; 17: 176-84.
8. Pories WJ, Swanson MS, MacDonald KG, et al. Who would have thought it? An operation proves to be the most effective therapy for adult-onset diabetes mellitus. *Ann Surg* 1995; 222: 339–50.
9. Scopinaro N, Marinari GM, Camerini GB. Specific Effects of Biliopancreatic Diversion on the Major Components of metabolic Syndrome. *Diabetes care* 2005; 28 (10): 2406–11.
10. Hickey MS, Pories WJ, MacDonald KG, et al. A new paradigm for type 2 diabetes mellitus: could it be a disease of the foregut? *Ann Surg* 1998; 227: 637–43.
11. Cummings DE, Overduin J, Foster-Schubert KE. Gastric bypass for obesity: mechanisms of weight loss and diabetes resolution. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89 (6): 2608 – 15.
12. Mason EE. The mechanism of surgical treatment of type 2 diabetes. *Obes Surg* 2005; 15: 459–61.
13. Patrìti A, Facchiano E, Sanna A, et al. The enteroinsular axis and the recovery from type 2 diabetes after bariatric surgery. *Obes Surg* 2004; 14: 840–8.

14. Mason EE. Ileal transposition and enteroglucagon/GLP1 in obesity (and diabetic?) surgery. *Obes Surg* 1999; 9: 223–8.
15. Gautier JF, Fetita S, Sobngwi E, et al. Biological actions of the incretins GIP and GLP-1 and therapeutic perspectives in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Metab* 2005; 31: 233-42.
16. Song DH, Wolfe MM. Glucose-dependent insulintropic polypeptide and its role in obesity. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2007; 14: 46-51.
17. Baggio LL, Drucker DL. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* 2007; 132: 2131-57.
18. Ranganath LR. The entero-insular axis: implications for human metabolism. *Clin Chem Lab Med* 2008; 46(1): 43–56.
19. Hellstro PM, Slund ENA, Edholm T, et al. GLP-1 suppresses gastrointestinal motility and inhibits the migrating motor complex in healthy subjects and patients with irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil* 2008; 20: 649–59.
20. Nauck MA, Niedereichholz U, Ettl R, et al. Glucagon-like peptide 1 inhibition of gastric emptying outweighs its insulintropic effects in healthy humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 1997; 273: 981-88.

21. Ugleholdt R, Poulsen MLH, Holst PJ, et al. Prohormone Convertase 1/3 Is Essential for Processing of the Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide Precursor. *J Biol Chem* 2006; 281 (16): 11050–7.
22. Mentlein R, Gallwitz B, Schmidt WE, et al. Dipeptidyl-peptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1(7-36)amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum. *Eur J Biochem* 1993; 214: 829-35.
23. Ranganath LR, Beety JM, Morgan LM, et al. Attenuated GLP-1 secretion in obesity: cause or consequence. *Gut* 1996; 38: 916–9.
24. Ranganath L, Norris F, Morgan L, et al. Inhibition of carbohydrate-mediated glucagon-like peptide-1 (7-36)amide secretion by circulating non-esterified fatty acids. *Clin Sci* 1999; 96: 335–42.
25. Whitson BA, Leslie DB, Kellogg TA, et al. Entero-endocrine changes after gastric bypass in diabetic and nondiabetic patients: a preliminary study. *J Surg Res* 2007; 141: 31-9.
26. Mottin CC, Padoin AV, Schroer CE, et al. Behavior of Type 2 Diabetes Mellitus in Morbid Obese Patients Submitted to Gastric Bypass. *Obes Surg* 2008; 18:179–81.
27. Laferrère B. Effect of Weight Loss by Gastric Bypass Surgery Versus Hypocaloric Diet on Glucose and Incretin Levels in Patients with Type 2 Diabetes *J Clin Endocrinol Metab*, July 2008, 93(7):2479–2485

28. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* 2001; 25: 402–8.
29. Roux CW, Aylwin SJB, Batterham RL, et al. Gut hormone profiles following bariatric surgery favor an anorectic state, facilitate weight loss, and improve metabolic parameters. *Ann Surg* 2006; 243: 108–14.
30. Jackson RS, Creemers JWM, Ohagi S, et al. Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. *Nat genet* 1997; 16: 303-6.
31. Jackson RS, Creemers JWM, Farooqi IS, et al. Small-intestinal dysfunction accompanies the complex endocrinopathy of human proprotein convertase 1 deficiency. *J Clin Invest* 2003; 112: 1550–60.
32. Benzinou M, Creemers JWM, Choquet H, et al. Common nonsynonymous variants in PCSK1 confer risk of obesity. *Nat Genet* 2008; 40 (8): 943-5.
33. Mentlein R. Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)-role in the inactivation of regulatory peptides. *Regul Pept* 1999; 85: 9–24.
34. Näslund E, Hellström PM. Appetite signaling: From gut peptides and enteric nerves to brain. *Physiol Behav* 2007; 92: 256–262.

35. Drucker, D J. Therapeutic potential of dipeptidyl peptidase IV inhibitors for the treatment of type 2 diabetes. *Expert Opin Investig Drugs* 2003; 12(1): 87-100
36. Fukase N, Igarashi M, Takahashi H, et al. Hypersecretion of truncated glucagon-like peptide-1 and gastric inhibitory polypeptide in obese patients. *Diabetic Med* 1993; 10: 44–9.
37. Nauck M A, et al. Secretion of incretin hormones (GIP and GLP-1) and incretin effect after oral glucose in first-degree relatives of patients with type 2 diabetes. *Regulatory Peptides* 2004; 122: 209– 217
38. Wajchenberg B.  $\beta$ -Cell Failure in Diabetes and Preservation by Clinical Treatment. *Endocr Rev* 2007; 28(2): 187–218
39. Mortensen K, et al. GLP-1 and GIP are colocalized in a subset of endocrine cells in the small intestine. *Regulatory Peptides* 2003; 114: 189– 196.

**Table 1:** Oligonucleotides used in qRT-PCR reactions, 5' to 3'.

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

**Table 2:** Anthropometric and biochemical parameters of morbidly obese patients NDM2 and T2DM, pre and post surgery.

<b>Data</b>	<b>NDM2 Group</b> n=17	<b>T2DM Group</b> n=8	<b><i>p</i></b>
Age (years) <sup>1</sup>	33.88 ± 9.84	46.67 ± 10.23	0.005
BMI(Kg/m <sup>2</sup> ) <sup>1</sup>	50.43 ± 9.54	53.41 ± 8.37	NS
Waist (cm) <sup>1</sup>	135.64 ± 14.31	140.89 ± 15.62	NS
Hip (cm) <sup>1</sup>	145.36 ± 11.28	150.89 ± 12.97	NS
HbA1C – pre (mmol/mol) <sup>1</sup>	5.98 ± 1.20	6.9 ± 2.49	NS
HbA1C – post (mmol/mol)	Data no show	Data no show	
HDL – pre (mg/dL) <sup>1</sup>	48.25 ± 12.83	51.33 ± 15.23	NS
HDL – post(mg/dL) <sup>1</sup>	42.27 ± 11.61	58.22 ± 31.72	NS
LDL – pre(mg/dL) <sup>1</sup>	112.43 ± 28.91	124 ± 38.12	NS
LDL – post(mg/dL)	Data no show	Data no show	
TG – pre(mg/dL) <sup>1</sup>	136.5 ± 62.44	174.67 ± 43.41	NS
TG – post(mg/dL) <sup>1</sup>	131.8 ± 61.00	146.22 ± 48.86	NS
CT – pre(mg/dL) <sup>1</sup>	188.69 ± 31.33	215.44 ± 37.46	0.068
CT – post(mg/dL) <sup>1</sup>	174.31 ± 35.77	191.89 ± 53.22	NS
Glucose pre(mg/dL) <sup>2</sup>	92.5 (85.42 – 99.69)	111(83.8 – 206.4)	0.037
Glucose post(mg/dL) <sup>1</sup>	84.63 ± 14.06	92.89 ± 17.95	NS
Insulin(μU/mL) <sup>1</sup>	44.1 ± 45.88	27.6 ± 12.01	NS
Insulin(μU/mL)	Data no show	Data no show	

To compare the data anthropometric and biochemical parameters of morbidly obese patients NDM2 and T2DM, pre and post surgery, *P* values were calculated using the independent sample test-T and the non-parametric U Mann-Whitney test, with confidence interval 95%.

<sup>1</sup> Data show mean ± SD.

<sup>2</sup> Data show median (confidence interval 95%).

*P* ≤ 0.05 was statistically significant.

NS= not significant.

**Table 3:** Serum glucose of morbidly obese patients NDM2 and T2DM pre and post- surgery bariatric.

<b>Group</b>	<b>Glucose pre (MEAN ± SD)</b>	<b>Glucose post (MEAN ± SD)</b>	<b><i>p</i></b>
<b>NDM2</b> (n=17)	92.6 ± 13.39	84.6 ± 14.06	0.05
<b>T2DM</b> (n=8)	145.1 ± 79.73	92.9 ± 17.95	0.056

Difference of serum glucose levels pre and post-surgery was analyzed by Paired T Test.

$P \leq 0.05$  was statistically significant.

NS= not significant.

**Table 4:** Expression of GIP, proglucagon, DPP-IV and PC1/3 mRNA in jejunum of obese subjects.

<b>GENE</b>	<b>NDM2 median*</b>	<b>T2DM median*</b>	<b><i>p</i></b>
<b>GIP</b>	2.42 (1.15 – 21.38) n=17	4.11 (-28.76 – 95.53) n=8	NS
<b>Proglucagon</b>	1.21 (0.04 – 11.11) n=14	1.12 (-4.06 – 12.93) n=7	NS
<b>DPP</b>	4.30 (1.22 – 16.6) n=16	3.69 (-8.26 – 47.1) n=8	NS
<b>PC 1/3</b>	0.80 (-1.88 – 7.16) n=8	0.16 (-1.04 – 2.77) n=5	0.065

To compare the expression pattern of mRNA in jejunum of obese subjects NDM2 and T2DM, figures were normalized against  $\beta$ -actin ( $\Delta$ Ct) and calibrated against the mean of NDM2 mRNA patients ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ). To compare NDM2 and T2DM, *p* values were calculated using the non-parametric U Mann-Whitney test.

\*Values were expressed as median and confidence interval 95%.

$P \leq 0.05$  was statistically significant

NS= not significant.

**Table 5:** Expression of GIP, proglucagon, DPP-IV, and PC1/3 mRNA in jejunum of obese subjects

<b>GENE</b>	<b>Patients with high GIP mRNA expression median*</b>	<b>Patients with low GIP mRNA expression median*</b>	<b><i>P</i></b>
<b>GIP</b>	0.76 (-0.03 – 5.9) n=14	0.03 (0.001 – 0.12) n=11	0.000
<b>proglucagon</b>	0.77 (0.56 – 5.98) n=12	0.06 (0.03 – 0.47) n=9	0.015
<b>DPP</b>	0.86 (0.6 – 4.8) n=14	0.09 (-0.0002 – 0.49) n=10	0.003
<b>PC 1/3</b>	0.88 (-1.1 – 6.25) n=9	0.21 (0.05 – 0.38) n=4	0.011

To compare the expression pattern of mRNA in jejunum of obese subjects NDM2 and T2DM, figures were normalized against  $\beta$ -actin ( $\Delta$ Ct) and calibrated against the mean of high GIP mRNA patients (group with high GIP expression) ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ). To compare patient groups with high and low GIP mRNA expression, *p* values were calculated using the non-parametric U Mann-Whitney test. \*Values expression as median and confidence interval 95%.

$P \leq 0.05$  was statistically significant.

NS= not significant.

## CAPÍTULO II

**Proglucagon, PC 1/3 and DPP-IV mRNA expression is modulated by *cis* or *trans* MUFAs and high glucose in jejunum of morbidly obese**

(Manuscrito submetido)

Obesity.

Proglucagon, PC1/3 and DPP-IV mRNA expression modulated by *cis* or *trans* MUFAs and high glucose in jejunum of morbidly obese

*Effect of MUFA and Glucose on insulinotropic mRNA*

F. Rohden<sup>\*</sup>, C. S. Costa<sup>\*</sup>, M. S. Mello<sup>\*</sup>, T. O. Hammes<sup>\*</sup>, R. Margis<sup>\*.€</sup>, A. V. Padoin<sup>£</sup>, C. C. Mottin<sup>£</sup> and R. M. Guaragna<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>Departamento de Bioquímica, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>£</sup>Centro de Obesidade Mórbida, Hospital São Lucas, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>€</sup>Centro de Biotecnologia, UFRGS. Porto Alegre, RS, Brazil.

Correspondence to:

Regina Maria Guaragna

Address: Departamento de Bioquímica. ICBS. UFRGS.

Rua Ramiro Barcelos 2600 – anexo

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

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

Tel: 55 51 3308 5546 or 55 51 3308 5539

FAX number: 55 51 3308 5540

## **Abbreviations**

GIP = glucose dependent insulinotropic peptide

GLP-1 = glucagon-like peptide-1

PC 1/3 = prohormone convertase 1/3

DPP-IV = dipeptidyl peptidase-IV

mRNA = messenger RNA

qRT-PCR = quantitative real-time polymerase chain reaction

T2DM = type 2 diabetes mellitus

OB = obese

RYGB = Roux-en-Y gastric bypass surgery

Evaluate the effect of monounsaturated *cis* or *trans* fatty acids and high glucose on GIP, proglucagon, PC1/3 and DPP-IV mRNA expression in jejunum cells in the morbidly obese submitted to Roux-en-Y gastric bypass surgery (RYGB).

Jejunum samples were sliced (at 60 cm from the Treitz ligament) and incubated in 5% CO<sub>2</sub> with DMEM containing oleic, elaidic, vaccenic acid (50µM) or high glucose (11 mM) for 4 hours at 37°C. Slices were then collected and immersed in TRIzol for total RNA extraction. Proglucagon, GIP, PC1/3 and DPP-IV reverse transcripts were determined by the quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR).

In proximal jejunum cells, oleic acid decreased DPP-IV transcription (p=0.02); vaccenic, a ruminant *trans* fatty acid, up regulated proglucagon mRNA expression (p = 0.034); elaidic acid, a *trans* fatty acid produced by industrial hydrogenation, did not modulate any of the genes studied. High glucose treatment significantly increased PC1/3 and DPP-IV mRNA (p=0.001, p=0,024, respectively).

We suggest that monounsaturated *cis* or *trans* fatty acids and glucose in the diet act directly on proximal jejunum cells after bariatric surgery modulating gene GLP-1, PC1/3 and DPP-IV. This may explain the increase of GLP-1 in serum after RYGB of obese patients observed in other studies.

*Key words:* diabetes; fatty acids; GLP-1; GIP; gastric bypass

## Introduction

Fats are common in our diet. Three are particularly important: oleic acid, a monounsaturated *cis*-chain (18:1 9*cis*) fatty acid (Omega 9), elaidic acid, a monounsaturated fatty acid with a *trans* configuration (C18: 1 9 *trans*), that is obtained from the industrial hydrogenation of oleic fatty acid, and vaccenic acid (C18:1 11*trans*), found naturally in ruminant fats produced by microbial hydrogenation activity in the rumen. The latter is the major *trans*-monounsaturated fatty acid in ruminant fat food products (milk, yoghurt, cheese, butter and meats) (1).

From the 20th century, when the artificial hydrogenation of fatty acids began, there was a considerable increase in the consumption of *trans* fatty acids, which were more accessible and cheaper (2). This consumption of *trans* fat acids is closely linked with the increased risk of coronary artery disease (3) and type 2 diabetes (4), which are also linked to obesity, all very significant pathologies in the world population.

Experimental evidence from studies in Zucker rats was recently presented showing that diets rich in monounsaturated fatty acids, such as oleic acid, improve glycemic control and result in increased serum insulin compared with a control meal with the same glucose content (5).

Fatty acids in the diet can initiate the response of incretins, eg. gastric inhibitory polypeptide (GIP) and glucagon-like peptide 1 (GLP-1), in the serum of healthy and DMT2 individuals (6, 7) GIP and GLP-1 are associated with the regulation of enteroinsulin axis. Both are responsible for 50 to 70% of the insulin release from pancreatic cells- $\beta$  after food stimulation of enteroendocrine jejunum cells (8).

GIP and GLP-1 are secreted by specialized cells, K and L respectively, in response to food stimulus, especially glucose (9) and fatty acids (5, 10) in the small intestine (11). These peptides require cleavage of an arginine residue to become bioactive, and this is carried out by the prohormone convertase 1/3 (PC1/3) (12). These

hormones have a very short  $t_{1/2}$ , 1-2 min, after which they are inactivated by the enzyme dipeptidyl-peptidase amino peptidase IV (DPP-IV), responsible for breakage at the N terminal that inhibits binding with the peptide receptor (13).

Clinical data indicates that after bariatric surgery, morbidly obese type 2 diabetics improve their blood-glucose levels and are able to discontinue treatment with antidiabetic drugs (14, 15). This phenomenon may be related to anatomical changes caused by bariatric surgery, which alter incretin production (16, 17). After surgery, the jejunum receives ingested food earlier, stimulating cells for transcription, synthesis, release and inactivation of incretins. The aim of this study was to evaluate the effect of fatty acids and high glucose on GIP, proglucagon, PC1/3 and DPP-IV mRNA expression in jejunum cells of the morbidly obese submitted to Roux-en-Y gastric bypass surgery (RYGB).

### **Research Methods and Procedures**

Proximal jejunum mucosa samples (60 cm distal from the ligament of Treitz) were obtained from 5 morbidly obese patients who underwent bariatric surgery at COM/PUCRS, Brazil. Triplicate samples were used for each treatment. Experiments were approved by the ethical committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (n° 2007949), and all subjects were informed about the aim of the study and signed the informed consent form.

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

Samples were collected during surgery and were immediately immersed in ice-cold HBSS with 0.65 mM dithiothreitol (DCT; Sigma), BSA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) 1%, penicillin/streptomycin (Sigma) 10 mL/liter,  $\text{NaHCO}_3$  (Synthi) 9.05

mm, hepes (Sigma) 20 mm (18). Slices 400µm thick were produced in a McILWAIN Tissue Chopper (19), and washed in a 12-well culture plate containing 1mL of the same solution per well.

After removing the HBSS and adding 1mL of DMEM (Gibco) supplemented with penicillin/streptomycin 10 mL/liter, hydrocortisone (Sigma) 1mg/mL, insulin (Sigma) 4 ng/mL, nerve growth factor (Sigma) 5ng/ml, BSA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) 0.1% (18) without (control) or with 50 µM of oleic acid (C18:1 9c), elaidic acid (C18:1 9t), vaccenic acid (C18:1 11t) or 11 mM glucose, slices were incubated for 4 h at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Each fatty acid and glucose treatment was analyzed in triplicate. After incubation the medium was removed and 300 µl of TRIzol added for RNA extraction.

#### *Cellular viability*

The cellular viability was determined at zero, two and four hours by the MTT method, in triplicate. In a 24-well culture plate containing the slices in the culture medium cited above, MTT was added at 1:10 dilution, 30 minutes before the end of treatment. After addition of MTT, the whole procedure was performed in the dark. The plate was incubated as usual at 37°C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. After incubation, the medium was discarded and 300 µL of DMSO added to each well. The plate was stirred until all the color of the slice was transferred to DMSO. After total transference, we collected 200µl of this reduced DMSO/MTT. Absorbance at 560 and 650 nm was measured in a 96 well plate using a spectrophotometric microtiter plate reader (Spectra Max 190, Molecular Devices).

#### *Analysis of human gene expression*

Approximately 2 µg of total RNA were added to each cDNA synthesis reaction using the SuperScript II-TEN preamplification system (Invitrogen). Reactions were performed at 42°C for 1h using the first T23V (5' TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTV). Quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) amplification was carried out using specific primer pairs for proglucagon (precursor of GLP-1), proGIP (precursor of GIP), dipeptidylpeptidase-IV (Dpp-IV), prohormone convertase (PC1/3) and internal control β-actin. The sequences of the primers used are listed in Table 2. qRT-PCRs were carried out in an Applied Biosystem-7500 real-time cycler. Reaction settings were composed of an initial denaturation step of 5 minutes at 95°C, followed by 40 cycles of 15 s at 95°C, 10s at 60°C, 15s at 72°C and 35s at 60°; samples were held for 15s at 95°C for annealing and then heated from 1 minute to 60°C with a ramp of 0.1°C/s to acquire data to produce the denaturing curve of the amplified products. qRT-PCRs were carried out in 20µl final volume composed of 10µl reverse transcription of each sample diluted 40 to 100 times, 2µl of 10x PCR buffer, 1.2µl of 50mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1µl of 5mM dNTPs, 0.4µl of 10µM primer pairs, 4.25µl of water, 2.0µl of SYBR green (1:10.000 Molecular Probe), and 0.05µl of Platinum Taq DNA polymerase (5 U/µl) (Invitrogen).

#### *Data analysis*

We quantified gene expression using the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (threshold cycle) method (20). For each sample, analyzed in quadruplicate, a  $\Delta C_T$  value was obtained by subtracting β-actin  $C_T$  value from the  $C_T$  of the gene of interest.

#### *Statistics*

Data is shown as mean±SD. Mean values for GIP, proglucagon, DPP-IV and PC1/3 expression in treated and control samples were compared by the T test to the independent sample. Differences in expression between control and treated samples

were considered statistically significant at  $p \leq 0.05$ . One way ANOVA and Turkey post-hoc test were used to compare cell viability results.

## Results

This is the first time that this method, incubating jejunum slices produced by a Chopper, has been used to investigate the expression of these genes. Hence we felt it necessary to test jejunum cell viability, using the MTT assay. There was a statistically significant difference between the three times of incubation (T0, T2 and T4 hours) ( $p=0.014$ ). The post hoc test showed no difference between T0 and T2, but viability was significantly increased between 2 and 4 hours ( $p=0.011$ ) (Fig. 1). Treatment with fatty acids (50  $\mu\text{M}$ ) and glucose (11 mM) did not modify cell viability ( $p=0.799$ ) (Fig. 2).

K-Cells located in the upper duodenum and jejunum are responsible for the synthesis and release of GIP. This incretin has insulinotropic effects, initiating the stimulation of pancreatic cells to release insulin. GIP release is food stimulated (21, 22). We observed that GIP mRNA expression was not changed when jejunum slices were incubated *in vitro* with oleic, elaidic, vaccenic acid, or high glucose (table 3).

GLP-1, an incretin synthesized and released by L-cells located in the jejunum, has an insulinotropic effect, and is released by stimulation of ingested nutrients, especially fatty acids and glucose (10, 23). Vaccenic, a ruminant *trans* fatty acid that modulates the expression of proglucagon, produced a significant increase in this mRNA expression ( $p = 0.034$ ). Oleic, elaidic acid and glucose did not produce any statistical differences in the results (table 3).

GIP and GLP-1 are synthesized as proGIP and proglucagon; these must be bioactivated by the enzyme PC1/3. PC1/3 is colocalized with proglucagon in L-cells of the jejunum and when released cleaves arginine residues, activating the incretins (24).

Glucose treatment significantly increased this enzyme mRNA ( $p=0.001$ ). The C18:1 *cis* or *trans* fatty acids studied did not modify this transcription (table 3).

The hormones GIP and GLP-1 are inactivated by enzyme DPP-IV, responsible for the N terminal breakage of peptides, inhibiting incretin binding with the receptor (13). Glucose and oleic acid treatment increased and decreased DPP-IV transcription, respectively ( $p=0.024$ ,  $p=0.02$ ). Treatment with elaidic and vaccenic acids did not modulate this mRNA transcription (table 3).

## **Discussion**

Clinical data show that after bariatric surgery, blood-glucose levels improve in morbidly obese patients with T2DM (24-26). It is believed that this improvement is linked to levels of incretins, GIP and GLP-1. Studies show that GLP-1 is reduced in obese (22) and that after RYGB it increases considerably (27). The obese may also be GIP resistant, which could be the result of over-production by enteroendocrine jejunum cells (26). Alterations in GIP and GLP-1 action can interfere in pancreatic insulin release.

The incretins are released by food stimulation, but little is known about isolated elements of the meal, such as glucose and fatty acids. Our model allows us to test the direct influence of fatty acids and glucose, by incubating the tissue isolated during surgery. This *in vitro* model is very important, since after surgery the jejunum cells have direct contact with carbohydrates and lipids during digestion, at the point where GLP-1 begins to be released (28, 29).

Before assessing the influence of fatty acids and glucose using the *in vitro* model, it was necessary to test the technique. The MTT test showed that cellular viability was not damaged, and hence the slices technique is feasible, reproducible and reliable for the study of intestinal cells.

Several studies show improvement in glycemic levels after diets rich in oleic acid. The elegant work of Rocca (5) showed that this improvement could be explained partly by the fact that such diet increases secretion of GLP-1, an incretin antidiabetic. Another interesting result was that of Thomsen (7) which showed that olive oil, rich in oleic acid, raises plasma levels of GIP and GLP-1. In our results, oleic acid down regulated mRNA expression of DPP-IV, the enzyme involved in incretin inactivation, and this is corroborated by the increased GIP and GLP-1 levels in Thomsen's research. Oleic acid can decrease incretin degradation and can stimulate the insulinotropic effect of GLP-1.

The treatment of jejunum slices with vaccenic acid produced increased expression of proglucagon. It is known that *trans* fatty acid consumption stimulates insulin release (4). In southern Brazil, there is a large consumption of beef and milk derivatives. The intestine of local inhabitants is adapted to this diet and the expression of proglucagon is under constant stimulation. Studies show that GLP-1 is reduced in the obese (22) and that after RYGB it increases considerably (27). After undergoing bariatric surgery at 60 cm of Treitz ligament, food acts directly on jejunum cells increasing GLP-1 levels (28). We suggest that vaccenic acid stimulates GLP-1 transcription, which is responsible for the insulinotropic effect. Vaccenic and oleic acid have insulinotropic effects through a different mechanism. Vaccenic acid acts to stimulate mRNA expression of GLP-1, but oleic acid down regulates the mRNA of DPP-IV involved in degradation of this incretin.

Elaidic, a *trans* fatty acid, did not improve or impair the incretin or enzyme transcription involved in the insulinotropic effect in jejunum of obese patients. Riserus (4) showed that *trans* fatty acid had no significant effect on insulin sensitivity in lean, healthy subjects. They suggest an increased insulin resistance in subjects with type 2 diabetes, when comparing the effect of *trans* and *cis* monounsaturated fatty acid intake.

However, epidemiological data from the Nurses' Health Study have reported that high intake of *trans* fatty acids increases the risk of developing type 2 diabetes (30). It could be that the diabetogenic effect of elaidic acid is not caused by incretins or enzymes of jejunum cells.

The *in vitro* effect of high glucose in jejunum proximal cells demonstrated an up regulation of PC1/3 and DPP-IV mRNA expression. DPP-IV is a ubiquitous serine protease related to inactivation of GIP and GLP-1 and also has anorexigenic action involved in production of PYY (3-36) (31-33). Insulin resistance, observed in obese patients, is associated with GLP-1 down production and this was confirmed by the results of our study model. We suggest that the consumption of high glucose decreases GLP-1 production because of increased DPP-IV expression. Inhibition of DPP-IV activity has emerged recently as a new strategy for treatment of type 2 diabetes, aiming to prevent the degradation of incretin hormones, improving glycemia. (34). However, low GLP-1 serum levels may be compensated by an increase in expression of PC1/3, which is responsible of proglucagon processing. Nevertheless, DPP-IV mRNA up regulation could be involved in hormone bioactivation with an anorexigenic effect. Havel (35) cites research that suggests that increasing levels of glucose decrease food intake in baboons and provoke sensations of satiety in humans.

It is known that after bariatric surgery, serum glucose levels of morbidly obese type 2 diabetics improve. Anatomical changes alter GIP and GLP-1 production. After surgery, the ingested food directly stimulates the jejunum cells at 60 cm from the Treitz ligament. The control of diabetes after GYBP might result directly from the rerouting of nutrients through the bowel.

In conclusion, our research reveals that fatty acids can modulate incretin transcription. Oleic acid down regulated mRNA of DPP-IV, involved in incretin degradation, consequently can stimulate the insulinotropic effect of GLP-1, which is

released by the jejunum proximal cells. Vaccenic acid stimulated transcription of GLP-1, the incretin responsible for insulinotropic effects. Elaidic acid, closely linked to comorbidities of the obese, showed no effect on mRNA transcription of the genes studied. High glucose in jejunum proximal cells increases expression of DPP-IV and PC1/3 mRNA. Homeostasis of GLP-1 production may be the result of the balance of DPP-IV and PC1/3 enzymes. We suggest that oleic and vaccenic acids in the diet acting directly on jejunum cells may explain the increase of GLP-1 after RYGB, although more studies are necessary.

## References

1. Hunter JE. Dietary levels of trans-fatty acids: basis for health concerns and industry efforts to limit use. *Nutrition Research* 2005; 25: 499–513
2. Pfeuffer M, Schrezenmeir J. Impact of trans fatty acids of ruminant origin compared with those from partially hydrogenated vegetable oils on CHD risk. *International dairy journal* 2006; 16: 1383-1388
3. Willett WC. Trans fatty acids and cardiovascular disease-epidemiological data. *Atheroscler Suppl* 2006; 7: 5-8
4. Riserus U. Trans fatty acids and insulin resistance. *Atheroscler Suppl* 2006; 7: 37-9
5. Rocca AS, LaGreca J, Kalitsky J, Brubaker PL. Monounsaturated fatty acid diets improve glycemic tolerance through increased secretion of glucagon-like peptide-1. *Endocrinology* 2001; 142: 1148-55
6. Thomsen C, Storm H, Holst JJ, Hermansen K. Differential effects of saturated and monounsaturated fats on postprandial lipemia and glucagon-like peptide 1 responses in patients with type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr* 2003; 77: 605-11
7. Thomsen C, O Rasmussen, T Lousen, et al. Differential effects of saturated and monounsaturated fatty acids on postprandial lipemia and incretin responses in healthy subjects. *Am J Clin Nutr* 1999; 69: 1135-43

8. Vilsboll T, Krarup T, Madsbad S, Holst JJ. Defective amplification of the late phase insulin response to glucose by GIP in obese Type II diabetic patients. *Diabetologia* 2002; 45: 1111-9
9. Kuo P, Chaikomin R, Pilichiewicz A, et al. Transient, early release of glucagon-like peptide-1 during low rates of intraduodenal glucose delivery. *Regul Pept* 2008; 146: 1-3
10. Brynes AE, Frost GS, Edwards CM, Ghatgei MA, Bloom SR. Plasma glucagon-like peptide-1 (7-36) amide (GLP-1) response to liquid phase, solid phase, and meals of differing lipid composition. *Nutrition* 1998; 14: 433-6
11. Theodorakis MJ, O Carlson, S Michopoulos, et al. Human duodenal enteroendocrine cells: source of both incretin peptides, GLP-1 and GIP. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 290: E550-9
12. Ugleholdt R, ML Poulsen, PJ Holst, et al. Prohormone convertase 1/3 is essential for processing of the glucose-dependent insulinotropic polypeptide precursor. *J Biol Chem* 2006; 281: 11050-7
13. Mentlein R, Gallwitz B, Schmidt WE. Dipeptidyl-peptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1(7-36)amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum. *Eur J Biochem* 1993; 214: 829-35

14. Rubino F, Forgione A, Cummings DE, et al. The mechanism of diabetes control after gastrointestinal bypass surgery reveals a role of the proximal small intestine in the pathophysiology of type 2 diabetes. *Ann Surg* 2006; 244: 741-9
15. Mottin CC, Padoin AV, Schroer CE, et al. Behavior of type 2 diabetes mellitus in morbid obese patients submitted to gastric bypass. *Obes Surg* 2008; 18: 179-81
16. Rubino F, Gagner M, Gentileschi P, et al. The early effect of the Roux-en-Y gastric bypass on hormones involved in body weight regulation and glucose metabolism. *Ann Surg* 2004; 240: 236-42
17. Hickey MS, Pories WJ, MacDonald Jr KG, et al. A new paradigm for type 2 diabetes mellitus: could it be a disease of the foregut? *Ann Surg* 1998; 227: 637-43; discussion 643-4
18. Damholt AB, Buchan AM, Kofod H. Glucagon-like-peptide-1 secretion from canine L-cells is increased by glucose-dependent-insulinotropic peptide but unaffected by glucose. *Endocrinology* 1998; 139: 2085-91
19. Gahwiler BH, Capogna M, Debanne D, McKinney RA, Thompson SM, Organotypic slice cultures: a technique has come of age. *Trends Neurosci* 1997; 20: 471-7

20. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods* 2001; 25: 402-8
21. Song DH, Wolfe MM. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide and its role in obesity. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2007; 14: 46-51
22. Gautier JF, Fetita S, Sobngwi E, Salaun-Martin C. Biological actions of the incretins GIP and GLP-1 and therapeutic perspectives in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Metab* 2005; 31: 233-42
23. Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* 2007; 132: 2131-57
24. Whitson BA, Leslie DB, Kellogg TA, et al. Entero-endocrine changes after gastric bypass in diabetic and nondiabetic patients: a preliminary study. *J Surg Res* 2007; 141: 31-9
25. Laferrere B, Teixeira J, McGinty J, et al. Effect of weight loss by gastric bypass surgery versus hypocaloric diet on glucose and incretin levels in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 2479-85
26. de Paula AL, Macedo AL, Prudente AS, et al. Laparoscopic sleeve gastrectomy with ileal interposition ("neuroendocrine brake")--pilot study of a new operation. *Surg Obes Relat Dis* 2006; 2: 464-7

27. le Roux CW, Aylwin SJ, Batterham RL, et al. Gut hormone profiles following bariatric surgery favor an anorectic state, facilitate weight loss, and improve metabolic parameters. *Ann Surg* 2006; 243: 108-14
28. Laferrere B, Heshka S, Wang K, et al. Incretin levels and effect are markedly enhanced 1 month after Roux-en-Y gastric bypass surgery in obese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2007; 30: 1709-16
29. Little TJ, Doran S, Meyer JH, et al. The release of GLP-1 and ghrelin, but not GIP and CCK, by glucose is dependent upon the length of small intestine exposed. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 291: E647-55
30. Salmeron J, Hu FB, Manson JE, et al. Dietary fat intake and risk of type 2 diabetes in women. *Am J Clin Nutr* 2001; 73: 1019-26
31. Neary NM, Small CJ, Druce MR, et al. Peptide YY3-36 and glucagon-like peptide-17-36 inhibit food intake additively. *Endocrinology* 2005; 146: 5120-7
32. Papadimitriou MA, Krzemien AA, Hahn PM, Van Vugt DA. Peptide YY(3-36)-induced inhibition of food intake in female monkeys. *Brain Res* 2007; 1175: 60-5
33. Ueno H, Yamaguchi H, Mizuta M, Nakazato M. The role of PYY in feeding regulation. *Regul Pept* 2008; 145: 12-6

34. Duffy NA, Green BD, Irwin N, et al. Effects of antidiabetic drugs on dipeptidyl peptidase IV activity: nateglinide is an inhibitor of DPP IV and augments the antidiabetic activity of glucagon-like peptide-1. *Eur J Pharmacol* 2007; 568: 278-86
  
35. Havel PJ. Peripheral signals conveying metabolic information to the brain: short-term and long-term regulation of food intake and energy homeostasis. *Exp Biol Med* (Maywood) 2001; 226: 963-77

## **Titles of tables**

**Table 1.** Oligonucleotides used in qRT-PCR reactions, 5' to 3'.

**Table 2.** Anthropometric and biochemical parameters of morbidly obese individuals.

**Table 3.** Effect of oleic, elaidic and vaccenic acid (50 $\mu$ M) and glucose (11 mM) on expression of GIP, proglucagon, PC1/3 and DPP-IV mRNA in proximal jejunum cells of obese subjects.

## **Legend for table 3**

The proximal jejunum tissue of five patients were incubated with oleic, elaidic, vaccenic acids (50  $\mu$ M) or glucose (11 mM) and each treatment was analyzed in triplicate. The incubation system control was tissue slices without fatty acids or glucose.

To compare the expression pattern of mRNA in jejunum of obese subjects, figures were normalized against  $\beta$ -actin ( $\Delta$ Ct) and calibrated against the mean of control mRNA ( $2^{-\Delta\Delta$ Ct}). To compare treatment with control, *p* values were calculated using the T test for independent samples.

<sup>a</sup> significantly different.  $P \leq 0.05$  was statistically significant.

## **Title of figures**

*Figure 1:* Test of cell viability, by the MTT test, comparing incubation at time zero, 2 and 4 hours.

*Figure 2:* Effect of fatty acids and high glucose on cell viability, as assessed by the MTT test.

## **Legend figure 1**

The statistical calculation was a one way ANOVA with post hoc Turkey test.

$p \leq 0.05$  was statistically significant.

<sup>a</sup> and <sup>b</sup> are statistically different

## **Legend figure 2**

The statistical calculation was a one way ANOVA with post hoc Turkey test.

Letters indicate statistically different.

$p \leq 0.05$  was statistically significant.

**Table 1**

<b>Gene</b>	<b>Forward primer</b>	<b>Reverse primer</b>
<b>β-actin</b>	5'CCACGAAACTACCTTCAACTCC 3'	5'TCATACTCCTGCTGCTGCTTGCTGATCC 3'
<b>PC 1/3</b>	5'GACCTCTTCTCAGCCAGAGC3'	5'GACACCAGGGTGTTCCTT 3'
<b>GIP</b>	5'AACCCAGC GATGAAGATTT3'	5'TGAGGCAGGTGCTAAGTGAA3'
<b>Proglucagon</b>	5'GCCAGGGAC TTTATAAAC TGG T3'	5'AAGCAATGTGGCCTCAGAAT3'
<b>DPP- IV</b>	5'TCCTTATTCATGGAACAGCAGA3'	5'TGAAGTGGCTCATGTGGGTA3'

**Table 2**

---

<b>Data</b>	<b>mean ± SD</b>
Age (years)	40.20 ± 10.23
BMI(Kg/m <sup>2</sup> )	50.96 ± 9.29
Waist (cm)	137.40 ± 11.59
Hip (cm)	143.60 ± 9.45
HDL (mg/dL)	46.20 ± 14.91
LDL (mg/dL)	112.60 ± 45.91
TG (mg/dL)	141.40 ± 24.05
CT (mg/dL)	197 ± 29.05
Glucose (mg/dL)	99.40 ± 18.31
Insulin (μU/mL)	44.50 ± 10.97

---

**Table 3**

<b>GENE</b>	<b>Control</b> (mean±SD)	<b>Oleic acid</b> (mean±SD)	<b>Elaidic acid</b> (mean±SD)	<b>Vaccenic acid</b> (mean±SD)	<b>Glucose</b> (mean±SD)
<b>GIP</b>	1.18±0.71	0.98±0.82	1.38±1.46	2.45±2.55	0.83±0.54
<b>Proglucagon</b>	1.09±0.52	0.76±0.33	0.80±0.47	2.35±2.13 <sup>a</sup>	0.69±0.83
<b>PC1/3</b>	1.12±0.55	0.73±0.67	0.99±1.03	2.05±3.17	7.33±6.64 <sup>a</sup>
<b>DPP-IV</b>	1.20±0.81	0.60±0.47 <sup>a</sup>	0.65±1.02	2.34±3.06	4.00±4.43 <sup>a</sup>

Figure 1

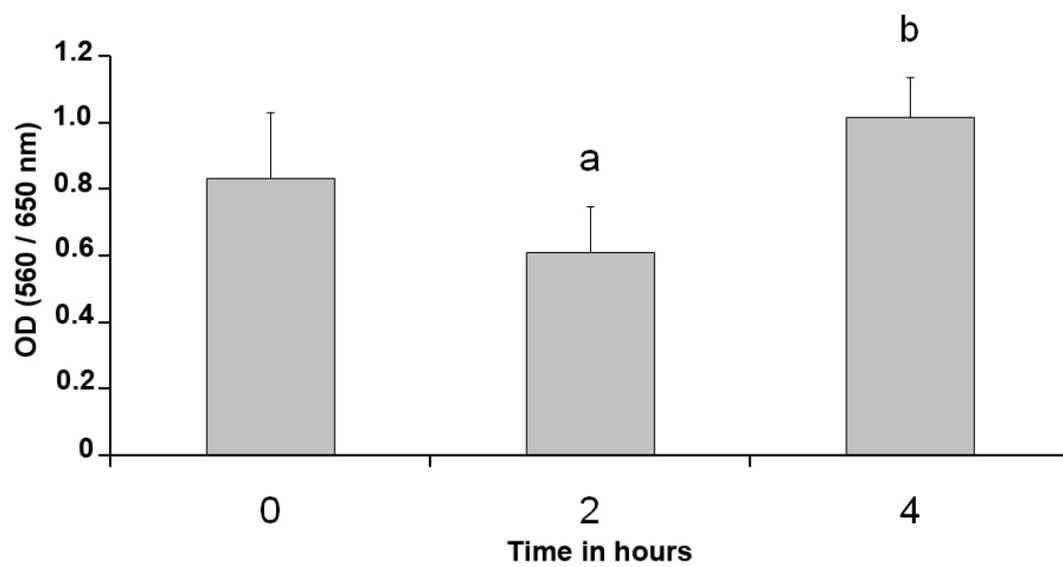
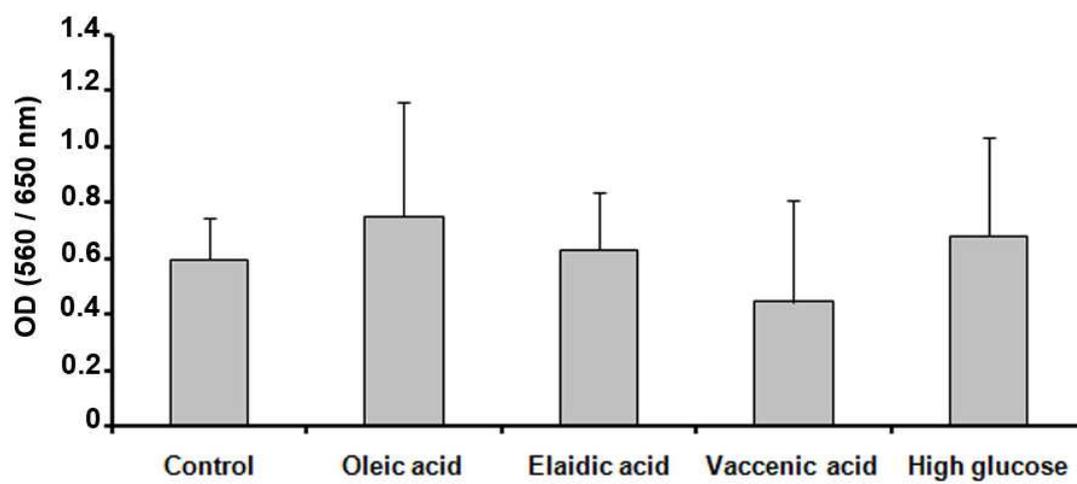


Figure 2



**PARTE III**

### 3 DISCUSSÃO

A obesidade é caracterizada pelo excesso de tecido adiposo. Essa condição altera muitos parâmetros bioquímicos e antropométrico, trazendo consigo uma diversidade de comorbidades. Entre elas dislipidemias, diabetes, apnéia do sono, traumas psicológicos, depressão, entre outros (Drichoutis *et al*, 2008). Desse modo, a obesidade tem se tornado um problema de saúde pública, pois seus números estão aumentando de forma alarmante em todo o mundo (Ogden, *et al*, 2007; Pinheiro *et al*, 2004; Kopelman, 2000).

Existe uma forte conexão entre obesidade e a diabetes, pois se sabe que 80% dos DMT2 são também obesos (Bloomgarden, 2000). Rubino e colaboradores (2006), estudando animais com obesidade e DMT2 induzida, observou a normalização dos níveis de glicose bem como de insulina após a cirurgia bariátrica. Atualmente, tem sido relatado que pacientes OBM com DMT2, submetidos à cirurgia bariátrica, apresentam rápida involução do quadro diabético, antes mesmo da perda de peso, que poderia ser a responsável pelo fenômeno (Rubino *et al*, 2004, Mottin *et al*, 2008).

A hipótese para explicar esse acontecido é a anastomose de parte do intestino delgado durante a cirurgia, pois o duodeno, o jejuno proximal e distal e o íleo têm grande importância endócrina (Hickey *et al*, 1998; Cummings *et al*, 2004; Mason, 2005; Patriiti *et al*, 2004; Rubino & Marescaux, 2004). Nesta região estão localizadas as células endócrinas responsáveis pela liberação de incretinas envolvidas no metabolismo da glicose.

A septação intestinal é realizada geralmente aos 60 cm após o ligamento de Treitz, mas essa medida pode variar, pois cada equipe cirúrgica

define seu padrão, podendo alcançar 150 cm (Rubino & Marescaux, 2004). Em indivíduos obesos NDM2, a equipe cirúrgica colaboradora desse trabalho opta por realizar a anastomose aos 60 cm após o ligamento de Treitz, porém em indivíduos DMT2 a anastomose é feita aos 100 cm. Os cirurgiões constataram uma melhora clínica e também bioquímica, comprovada pelos níveis glicêmicos dos DMT2 pós-cirurgia. Acredita-se que haja uma maior liberação de incretinas nesta região do jejuno. As incretinas liberadas pelas células da mucosa do intestino são GIP e GLP-1 (Theodoraki *et al*, 2006). Após a cirurgia, o alimento que entra em contato direto com as células do jejuno, distantes a 60 ou 100 cm do ligamento de Treitz, o que pode justificar a melhora da diabetes (Rubino *et al*, 2006).

Esse trabalho teve como primeiro objetivo determinar em indivíduos OBM NDM2 e DMT2, os níveis basais de mRNA de GIP e GLP-1, e das enzimas envolvidas na sua ativação e inativação, PC1/3 e DPP-IV respectivamente, visto que não se tem justificativa a nível molecular para altura diferenciada da septação intestinal em NDM2 e DMT2. Além disso, o conhecimento das bases moleculares pode justificar o uso desta cirurgia para DMT2 com IMC  $\leq 35$  Kg/m<sup>2</sup>.

Nossos resultados mostram que indivíduos OBM NDM2 e DMT2 não apresentam diferença estatística na expressão basal do mRNA das incretinas e DPP-IV no jejuno proximal. Contudo, precisamos levar em consideração que a secção do intestino ocorre em pontos diferentes: NDM2 aos 60 cm e DMT2 aos 100 cm. Observamos que aos 100 cm os indivíduos DMT2 mostram o mesmo valor de expressão de GIP, GLP-1 e DPP-IV que aqueles NDM2 aos 60 cm do ligamento de Treitz.

Segundo a literatura, indivíduos OBM possuem níveis plasmáticos diminuídos de GLP-1 (Ranganath *et al*, 1996), e após a cirurgia esses níveis aumentam consideravelmente, o que justifica estudos para se explicar a melhora da DMT2 nesses pacientes (Laferrère *et al*, 2008). Com a secção do jejuno aos 60 ou aos 100 cm distantes do ligamento de Treitz, as células desses indivíduos são estimuladas diretamente pelos alimentos, o que explica o aumento dos níveis plasmáticos de GLP-1 (Laferrère *et al*, 2007). Após a cirurgia RYGB os pacientes recebem uma dieta líquida a pastosa, que estimulam com mais eficácia a liberação dessa incretina, comparando com os alimentos consistentes e sólidos (Brynes *et al*, 1998).

O GLP-1, além de estimular a liberação de insulina, diminuir a liberação do glucagon e conseqüentemente inibir a gliconeogênese pelo fígado (Ranganath, 2008), diminui a velocidade do esvaziamento gástrico, fazendo com que as células intestinais captem melhor a glicose que está sendo disponibilizada pelo alimento (Nauck *et al*, 1997; Hellström *et al*, 2008).

O GIP, ao contrário de GLP-1, apresenta níveis plasmáticos elevados em OBM, mas esses indivíduos podem apresentar uma resistência a GIP, ou seja, os receptores se tornam insensíveis. Assim, a liberação de insulina dependente de GIP fica prejudicada nesses indivíduos. Alguns estudos relatam que após o procedimento RYGB há uma diminuição nos níveis séricos de GIP, esta redução tem sido observada em indivíduos OBM DMT2, o mesmo não tem sido constatado em NDM2 (Rubino *et al*, 2004).

Damholt e colaboradores (1999), observaram em cães que existe uma distribuição homogênea de células endócrinas do intestino. Eles mostram que na primeira porção do intestino, o duodeno (frações 1-6), há predomínio das células K (barras listradas), responsáveis pela síntese e liberação do GIP

(Figura 7). Conforme se distancia do *pylorus*, o número de células L (barras pretas) vai aumentando, havendo um equilíbrio entre os dois tipos celulares na região do jejuno (frações 7-18) (Figura 7). O objetivo da cirurgia bariátrica aos 100 cm, nos indivíduos DMT2, é expor maior número de células L em contato direto com o alimento, para que ocorra maior liberação de GLP-1, favorecendo assim, um desfecho positivo da cirurgia quanto à normalização dos níveis glicêmicos. Nossos resultados mostram que não há diferença estatística na expressão do mRNA de GIP e GLP-1 aos 60 e 100 cm do jejuno, em OBM NDM2 e DMT2, respectivamente, mas observamos que houve diminuição dos níveis glicêmicos em ambos os grupos. Dessa forma, sugerimos que indivíduos OBM DMT2 podem ter uma alteração na distribuição e modulação das células L, refletindo na liberação do GLP-1. Ou seja, as células do jejuno dos DMT2 a 100 cm se equivalem aos 60 cm dos obesos NDM2 em relação aos níveis de mRNA estudados. Isto pode justificar o aumento de 60 para 100 cm a distância do corte cirúrgico a partir do ligamento de Treitz em OBM DMT2. Além disso, pode explicar o aumento nos níveis séricos de GLP-1 e a diminuição de GIP após a cirurgia.

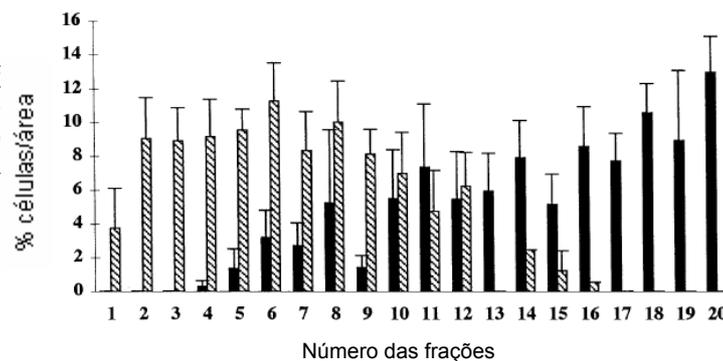


Figura 7. Células K (número de frações 1-6 duodeno - barras listradas) e células L (número de frações 7-18 jejuno - barras pretas). Regiões 5-15 incluem 68% das células K e 50% das células L, de todas as células imunorreactivas. Barras representam a porcentagem de células por área (distribuição relativa, %, Média  $\pm$  SEM, n=5) (Figura adaptada de Damholt, Kofod e Buchan, 1999).

A enzima DPP-IV, responsável pela inativação das incretinas GIP e GLP-1, através da remoção de dipeptídeos cruciais para a ligação delas aos seus receptores, não apresentou diferença na expressão do mRNA entre os grupos de OBM DMT2 e NDM2. Essa é uma enzima que tem diversas funções, tem atividade mais ampla, entre elas: está envolvida na produção de peptídeos anorexígenos (PYY 3-36) (Neary *et al*, 2005); aumenta a proliferação e ativa as células T; apresenta atividade pró ou anti-cancerígena (Yamada, 2009, Kotachová *et al*, 2009). Por isso, acreditamos que os níveis de mRNA não expliquem o controle das incretinas nesses pacientes.

Apesar de não encontrarmos diferença significativa entre OB NDM2 e DMT2 na expressão de mRNA das incretinas e DPP-IV, observamos que os indivíduos NDM2 mostram uma tendência em possuir maior expressão de PC1/3 (tabela , capítulo I), a enzima responsável em bioativar as incretinas (Gautier *et al*, 2005; Ugleholdt *et al*, 2006). Isso poderia justificar a elevação dos níveis de GLP-1 após cirurgia, dados já relatados por outros autores (Le Roux *et al*, 2006; Laferrère *et al*, 2008) normalizando a glicose sanguínea nesses indivíduos.

Ainda, avaliando os resultados da enzima PC1/3, observamos que não foram todos os pacientes estudados que apresentaram expressão da mesma. Anteriormente, em alguns casos clínicos, PC1/3 já foi relacionada como sendo a chave para o desenvolvimento da obesidade. Um estudo realizado por Jackson e colaboradores (1997), mostrou que três crianças que apresentavam quadro de obesidade e alterações bioquímicas desde sua infância apresentavam um defeito na síntese dessa enzima. Eles observaram que havia uma mutação no gene responsável pela enzima PC1/3, fazendo com que fosse transcrita uma sequência deletéria de 26 resíduos de aminoácidos, assim

fazendo um prematuro códon STOP. Desse modo, a enzima não é transcrita normalmente e o indivíduo fica deficiente dos hormônios processados por ela. Em nossos resultados, que alguns pacientes não transcreveram o mRNA desta enzima, apesar do primer ter sido selecionado ao partir do GENBANK (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e ter funcionado para um grupo de pacientes, indicando que o primer é capaz de anelar-se e amplificar o cDNA gerado. A não detecção de sinal em alguns pacientes pode resultar da presença de mutações pontuais na região de anelamento dos primers ou de um processo de processamento alternativo dos mRNAs do gene da PC1/3 nestes pacientes. Para responder a esta questão será necessário o sequenciamento desta região do gene ou o desenho de outros primers que anelem em outras regiões do gene

Por outro lado, observamos que há uma grande heterogeneidade na expressão desses genes dentro da população total estudada. Talvez por isso não tenhamos encontrado diferença significativa entre diabéticos e não diabéticos. Inicialmente, observamos que os pacientes podiam ser divididos em dois grandes grupos, um com maior e outro com menor expressão de GIP. Ao dividirmos os pacientes nesses dois novos grupos constatamos que os demais genes acompanhavam este perfil. Os dois grupos de pacientes apresentaram diferença significativa na expressão dos mRNAs de todos os genes estudados (Tabela 05 do Capítulo I). Em função desta heterogeneidade, podemos sugerir que os diferentes desfechos clínicos dos pacientes podem depender da expressão e controle destes genes.

Como conclusão do capítulo I, podemos sugerir que os níveis basais de GIP e GLP-1 em indivíduos OBM NDM2 e DMT2 pode ser dependente da expressão de PC1/3. Além disso, a grande heterogeneidade na expressão dos

genes das incretinas e enzimas em indivíduos OBM, tanto NDM2 e DMT2, pode estar envolvida nos diferentes desfechos metabólicos e comorbidades desenvolvidas por estes pacientes (Tabela 2 do Capítulo I). Essas diferenças podem ter sido provocadas ao longo da vida por fatores epigenéticos, como dieta e estilo de vida.

A cirurgia bariátrica redireciona o intestino, fazendo com que o alimento ingerido chegue diretamente ao jejuno proximal. Com isso glicose e diferentes ácidos graxos da dieta agem diretamente estimulando as células enteroendócrinas, encontradas nessa região do jejuno, estimulando a liberação das incretinas. Mas nada se conhece sobre o efeito desses nutrientes sobre os parâmetros moleculares desses genes em foco. Dessa forma, a fim de entender o que se observa clinicamente após a cirurgia - pacientes OBM aumentam os níveis de GLP-1 e normalizam os níveis de glicose sanguínea - foi conduzido o ensaio *in vitro*, incubando-se fatias de jejuno proximal de OBM, com ácidos graxos monoinsaturados com configuração *cis* (ácido oléico) e *trans* (ácidos elaidico e vaccênico) bem como glicose em alta concentração.

Nossos resultados mostram que ácido oléico (C18:1 9c) modulou negativamente o mRNA de DPP-IV, enzima inativadora das incretinas, sugerindo que a diminuição na expressão desse gene poderia manter GIP e GLP-1 ativos por mais tempo, garantindo o efeito insulínico. Dichoutis e colaboradores (2008), discutem que a dieta mediterrânea rica em azeite de oliva pode trazer benefícios à saúde humana quando adotada e utilizada por um longo período. Por exemplo, Lerman e colaboradores (2008) mostraram que a alimentação no estilo mediterrâneo pode diminuir os riscos para o desenvolvimento de DMT2. Além disso, Fürstova e colegas (2008), estudando uma linhagem de células  $\beta$ -pancreáticas humanas (NES2Y) observaram que

ácido oléico (*cis*), quando comparado ao elaidico, ácido graxo *trans* monoinsaturado aumenta a proliferação dessas células. Os benefícios descritos por muitos autores podem estar ligados à modulação de alguns genes, entretanto até o momento nenhum estudo a nível molecular foi realizado para se esclarecer a modulação das células enteroendócrinas do jejuno. Na nossa pesquisa constatamos que o ácido oleico diminui o mRNA de DPP-IV consequentemente permite que as incretinas permaneçam ativas por mais tempo. Inibidores da enzima DPP-IV tem sido estudados para o tratamento da DMT2, com o objetivo de manter por tempo maior a atividade das incretinas, prolongando o efeito insulínico de GIP e GLP-1. Trabalhos mostram que essa opção terapêutica fornece resultados satisfatórios, indicando uma nova classe de drogas de uso oral para o manejo da DMT2 (Green *et al*, 2006; Duffy *et al*, 2007; Idris & Donnelly, 2007; Liu *et al*, 2009).

O ácido elaidico (C18:1 9t), obtido pela dieta, tem sido foco de muitas discussões, pois está relacionado ao aumento de risco de doenças cardiovasculares, resistência à insulina, diabetes, vários tipos de câncer, obesidade, porém existem muitos resultados conflitantes. Um estudo com mulheres saudáveis demonstrou que o ácido graxo *trans* provoca disfunção endotelial, através do aumento das concentrações plasmáticas de biomarcadores pró-inflamatórios (Lopez-Garcia *et al*, 2005). Louheranta e colaboradores (1999) observaram em mulheres jovens e saudáveis que dieta enriquecida com ácido graxo *trans* não altera a sensibilidade a insulina quando comparado com dieta contendo grande quantidade de monoinsaturados *cis*. Entretanto, observaram que os níveis séricos de VLDL tendem a aumentar, e além disso, a razão colesterol total/HDL colesterol foi significativamente mais alta após o consumo de ácido graxo *trans*. Em 2005, Saravanam e colegas,

atribuíram a insensibilidade à insulina em adipócitos de ratos wistar, ao consumo de ácido graxo *trans*, principalmente pela diminuição da fluidez da membrana plasmática. Contudo, em indivíduos DMT2 foi observado que grande consumo de ácido graxo *trans* versus monoinsaturados provoca elevação níveis de insulina (Risérus, 2006). Recentemente, Tardy e colaboradores (2009), observaram que ácidos graxos *trans* monoinsaturados não agem sobre a sensibilidade a insulina em músculo de mulheres obesas. Nosso estudo revela que o ácido elaidico não alterou a expressão dos genes pró-glucagon, GIP, PC1/3 e DPP-IV em fatias de jejuno (60 cm do ligamento de Treitz). Assim, o desenvolvimento da resistência a insulina e da DMT2, descrita por alguns pesquisadores como sendo provocada pelo ácido elaidico, pode ocorrer por outros mecanismos que não a alteração da expressão de mRNA das incretinas e enzimas associadas.

Além das gorduras *trans* derivadas da hidrogenação industrial, existe aquelas derivadas da hidrogenação natural que ocorre no rúmen dos bovinos, tendo como principal ácido vaccênico (C18:1 11t). Assim, a dieta contém este ácido graxo proveniente da carne bovina, leite e seus derivados. A região Sul do Brasil é caracterizada por um grande consumo de carne bovina, pela tradição gaúcha, do churrasco. Por isso possuímos em nossa dieta uma grande quantidade de ácido vaccênico. Na Europa o ácido vaccênico é considerado a maior fonte de consumo de ácido graxo *trans*. O ácido vaccênico em nossa pesquisa provocou uma modulação positiva do gene pró-glucagon, proporcionando um melhor efeito incretínico. Nós sugerimos que o ácido vaccênico pode induzir um aumento na transcrição do peptídeo que produz GLP-1 e isso pode refletir no aumento da liberação de insulina. Tendo em vista as ações de GLP-1 podemos citar ainda que possui efeito trófico e protetor

sobre as células  $\beta$ -pancreáticas, *in vitro* e *in vivo*, aumentando a sua proliferação, e reduzindo a apoptose, induzida por citocinas, lipídeos e altos níveis de glicose (Drucker, 2006).

Nossa pesquisa mostra que o mRNA de GIP e PC1/3 não foram modulados por nenhum dos ácido graxo estudados. De acordo com estes resultados podemos sugerir que o fator epigenético discutido no capítulo I que poderia interferir na expressão de PC1/3 no jejuno dos pacientes, não seja devido ao tipo de ácido graxo monoinsaturado *cis* ou *trans* presente na dieta. Acreditamos que alta concentração de glicose possa ter este efeito ao longo dos anos, como discutiremos a seguir.

A glicose aumenta a expressão do mRNA PC1/3 e DPP-IV nas células do jejuno proximal, local onde o alimento chega diretamente após a cirurgia. Dessa forma, glicose em altas concentrações poderia modular os níveis das incretinas pelo balanço da síntese, via PC1/3, degradação, via DPP-IV. Acredita-se que esta ação oposta, gerando GLP-1 e promovendo sua degradação, seja em função das altas concentrações de glicose, levando o organismo a atingir a homeostase quanto a liberação de insulina. Alta concentração de glicose pode ser o fator epigenético modulador da resistência a insulina e diabetes em obesos. É importante lembrar que DPP-IV é uma enzima ubíqua, ela está envolvida em outros processos, por exemplo, no aumento de proliferação e na ativação das células T; seus níveis podem estar ligados ao desenvolvimento de alguns tipos de câncer, apresentando função pró-oncogênica no entanto em outros ela tem papel anti-oncogênica (Yamada, 2009, Kotachová *et al*, 2009). Também já foi descrito que a enzima pode agir no processamento de peptídeos anorexígenos (PYY 3-36) (Neary *et al*, 2005). Le Roux e colaboradores (2006) mostraram que após a cirurgia bariátrica os

níveis séricos de PYY aumentam consideravelmente favorecendo sensação de saciedade em OBM, contudo, o autor não apresenta dados sobre a enzima DPP-IV. Dessa forma, nós sugerimos que o aumento na transcrição de DPP-IV pode estar envolvido também com o produção de peptídeos anorexígenos.

Existe um gradiente de células enteroendócrinas K e L ao longo do intestino, que são responsáveis pela síntese e liberação de GIP e GLP-1, respectivamente (Theodoraski *et al*, 2006). Na primeira porção existe maior número de células K que vão se mesclando com células L atingindo um equilíbrio entre os dois tipos celulares aproximadamente aos 60 cm do ligamento de Treitz em indivíduos saudáveis. É nessa região que ocorre a secção do intestino na RYGB, redirecionando a chegada do alimento no intestino, fazendo com que este atinja imediatamente o jejuno proximal. *In vitro* observamos que o ácido oleico provoca a diminuição da transcrição do mRNA da enzima DPP-IV e que o ácido vaccênico aumenta os níveis de mRNA do pró-glucagon. Dessa forma, podemos sugerir que esses dois ácidos graxos podem contribuir para o aumento dos níveis de GLP-1 após a cirurgia bariátrica, mas por mecanismos diferentes. O oleico através da manutenção de GLP-1 ativo por mais tempo, e vaccênico pelo aumento na expressão do mRNA do pró-glucagon. O ácido elaídico não modulou nenhum dos genes estudados. A partir disso podemos sugerir que a resistência à insulina e a DMT2, associadas ao consumo desse ácido graxo, são desencadeadas por outros mecanismos que não a modulação dos genes das incretinas e enzimas relacionadas. O tratamento com glicose em alta concentração modulou positivamente as enzimas PC1/3 e DPP-IV. Essa alta dose de glicose sinalizaria as células enteroendócrinas sobre a necessidade de produzir maior quantidade de GIP e GLP-1 ativos para metabolizá-la. Por outro lado, o

aumento de DPP-IV seria importante para manter o equilíbrio dessas duas incretinas. A expressão do mRNA de GIP e GLP-1 não foram modulados por esse tratamento, podemos pensar que aos 60 cm do ligamento de Treitz, as células K, que sofrem modulação por glicose, estão em menor proporção. É descrito que as células L que se encontram em maior proporção nesta região do jejuno sofram maior modulação por lipídeo (Laferrère et al, 2008).

Com o presente trabalho, concluímos que no jejuno proximal de OBM DMT2 e NDM2 existe uma heterogeneidade na expressão mRNA de pró-glucagon, GIP, PC1/3 e DPP-IV. Também constatamos que esses genes podem ser modulados por ácido graxos moinsaturados *cis* ou *trans* e alta concentração de glicose, podendo alterar o desfecho metabólico desses pacientes após a cirurgia.

#### 4 CONCLUSÕES

- A expressão basal do mRNA de pró-glucagon, GIP e DPP-IV, não difere estatisticamente entre o grupo de OBM NDM2 e DMT2. sugerindo que 60 ou 100 cm do ligamento de Treitz a expressão dos mRNAs de pró-glucagon, GIP e DPP-IV se equivalem, fato que justifica o aumento da distância da secção na cirurgia dos indivíduos DMT2.

- O grupo OBM NDM2 possui uma tendência a maior expressão de mRNA de PC1/3 que pode estar relacionado com os níveis normais de glicose sanguínea.

- Nem todos os indivíduos estudados apresentaram expressão de mRNA de PC1/3 o que pode estar relacionado ao desenvolvimento da obesidade.

- Todos os indivíduos estudados foram divididos em dois grandes grupos: alta e baixa expressão de mRNA de proglucagon GIP, PC1/3 e DPP-IV. Sugerimos que essa heterogeneidade pode explicar os diferentes desfechos metabólicos da cirurgia.

- O ácido graxo oleico (monoinsaturado *cis*) modulou negativamente a expressão do mRNA da enzima DPP-IV em fatias de jejuno proximal de indivíduos OBM,.

- O ácido elaídico (moinsaturado *trans*) não modulou nenhum dos genes estudados, dessa forma, resistência a insulina e DMT2 que é relacionado ao consumo desse ácido graxo devem estar relacionadas com outro mecanismo que não a modulação dos genes das incretinas.

- O ácido vaccênico (moinsaturado *trans*) aumentou a expressão do mRNA do pró-glucagon o que pode proporcionar maior quantidade de GLP-1 disponível.

- Glicose em altas concentrações aumentou a expressão do mRNA de PC1/3 e DPP-IV. O desenvolvimento da resistência a insulina e da DMT2 pode estar relacionado ao balanço da expressão do mRNA dessas duas enzimas.

## 5 PERSPECTIVAS

É necessário esclarecer os mecanismos moleculares para se compreender a normalização dos níveis glicêmicos logo após a cirurgia RYGB, pois as evidências até o momento são clínicas. Desta forma sugerimos os seguintes tópicos:

- Estudar a histologia do tecido coletado aos 60 e aos 100 cm de OBM DMT2 e NDM2 submetidos à cirurgia bariátrica. Utilizando anticorpos anti-GIP e GLP-1 para observar a distribuição destes peptídeos nas células do jejuno a 60 e 100 cm do ligamento de Treitz.

- Determinar os níveis séricos de GIP e GLP-1 nestes pacientes.
- Determinar o conteúdo protéico destas incretinas.
- Relacionar os resultados moleculares com os níveis séricos obtidos.
- Estudar possíveis alterações no gene de PC1/3.
- Testar outros componentes da dieta como moduladores.

## REFERÊNCIAS

- Badman M K; Flier J S. The Adipocyte as an Active Participant in Energy Balance and Metabolism. **Gastroenterology**, 132:2103–2115; 2007.
- Baggio L L; Drucker D L. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. **Gastroenterology** 2007; 132: 2131-57.
- Bender, R; Zeeb H; Schwars M; *et al.* Causes of death in obesity: Relevant increase in cardiovascular but not in all-cancer mortality. **Journal of Clinical Epidemiology**; 59: 1064–1071; 2006.
- Benzinou M; Creemers J W M; Choquet H; *et al.* Common nonsynonymous variants in PCSK1 confer risk of obesity. **Nature Genetics**; 40 (8); 2008.
- Bloomgarden, Z T. American Diabetes Association Annual Meeting, 1999. **Diabetes Care**, 23 (1); 2000.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação-Geral da Política de Alimentação e Nutrição. Guia alimentar para a população brasileira / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Coordenação-Geral da Política de Alimentação e Nutrição. **Brasília: Ministério da Saúde**, 2005.
- Brynes A E; Frost G S; Mark C; *et al.* Plasma Glucagon-Like Peptide-1 (7-36) Amide (GLP-1) Response to Liquid Phase, Solid Phase, and Meals of Differing Lipid Composition. **Nutrition**; 14 (5):433– 436; 1998.
- Cercato, C; Mancini M C; Arguello A M C; Passos V Q; Villares S M F and Halpern A. Systemic hypertension, diabetes mellitus, and dyslipidemia in relation to body mass index: evaluation of a brazilian population. **Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. S. Paulo** 59(3):113-118, 2004
- Chardigny J M; Destailats F; Malpuech-Brugere C; *et al.* Do *trans* fatty acids from industrially produced sources and from natural sources have the same effect on cardiovascular disease risk factors in healthy subjects? Results of the trans Fatty Acids Collaboration (TRANSFACT) study. **Am J Clin Nutr**; 87:558–66; 2008.
- Christiansen E; Schnider S; Palmvig B; Tauber-Lassen E; Pedersen O. Intake of a diet high in trans monounsaturated fatty acids or saturated fatty acids. Effects on postprandial insulinemia and glycemia in obese patients with NIDDM. **Diabetes Care**; 20:881–7; 1997.
- Costa A G V; Bressan J; Sabarense C M. Ácidos graxos trans: alimentos e efeitos na saúde. **Alan**; 56: 12-21; 2006.

Cummings D E; Overduin J; Foster-Schubert KE. Gastric bypass for obesity: mechanisms of weight loss and diabetes resolution. **J Clin Endocrinol Metab**; 89 (6): 2608 – 15; 2004.

Damholt A B; Kofod H; Buchan A M J. Immunocytochemical evidence for a paracrine interaction between GIP and GLP-1-producing cells in canine small intestine. **Cell Tissue Res**; 298:287-293; 1999.

De Meester I; Korom S; Damme J V; Scharpè S. CD26, let it cut or cut it down. **Immunology Today**; 20 (8) 367- 374; 1999.

[Deacon C F](#); [Nauck M A](#); [Meier J](#); [Hücking K](#); [Holst J J](#). Degradation of endogenous and exogenous gastric inhibitory polypeptide in healthy and in type 2 diabetic subjects as revealed using a new assay for the intact peptide. **J Clin Endocrinol Metab**; 85(10):3575-81; 2000.

DePaula A L;Macedo A LV; Mota B R; Schraibman V. Laparoscopic ileal interposition associated to a diverted sleeve gastrectomy is an effective operation for the treatment of type 2 diabetes mellitus patients with BMI 21–29. **Surg Endosc** DOI 10.1007/s00464-008-0156-x; 2008a

DePaula, A L; Macedo A L V; Schraibman V; Mota B R; Vencio S. Hormonal evaluation following laparoscopic treatment of type2 diabetes mellitus patients with BMI 20–34. **Surg Endosc**; DOI10.1007/s00464-008-0168-6. 2008b.

Dhanvantari S; Izzo A; Jansen E; Brubaker P. Coregulation of Glucagon-Like Peptide-1 Synthesis with Proglucagon and Prohormone Convertase 1 Gene Expression in Enteroendocrine GLUTag **Cells. Endocrinology** 142: 37-42; 2001.

Drichoutis A C; Lazaridis P; Nayga Jr R M. Can Mediterranean diet really influence obesity? Evidence from propensity score matching. **Eur J Health Econ**; 5 Dec; 2008.

Drucker D J. The biology of incretin hormones. **Cell Metabolism**; 3:153-165; 2006.

[Drucker D J](#); [Nauck M A](#). The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. **Lancet**; 11;368(9548):1696-705; 2006

Duffy N A; Green B D; Irwin N et al. Effects of antidiabetic drugs on dipeptidylpeptidase IV activity: Nateglinide is an inhibitor os DPP-IV and augments the antidiabetic activity of glucagons-like peptide-1. **European Journal of Pharmacology**; 568: 278-286; 2007.

Edholm T; Cejvan K; Abdel-Halim S M; Efendic S, Schmidt P T.Hellstrom P M. The incretin hormones GIP and GLP-1 in diabetic rats: effects on insulin secretion and small bowel motility. **Neurogastroenterol Motil** doi:10.1111/j.1365-2982.2008.01229.x; 2008.

Fürstova V; Kopska T; James R FL; Kovar J. Comparison of the effect of individual saturated and unsaturated fatty acids on cell growth and death induction in the human pancreatic  $\beta$ -cell line NES2Y. **Life Sciences**; 82: 684–691; 2008.

Gautier J F; Fetita S; Sobngwi E; [Salaün-Martin C](#). Biological actions of the incretins GIP and GLP-1 and therapeutic perspectives in patients with type 2 diabetes. **Diabetes Metab**; 31: 233-42; 2005.

Green B; Flatt P R; Bailey C J. Dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) inhibitors: a newly emerging drug class for the treatment of type 2 diabetes. **Diabetes Vasc Dis Res**; 3:159-65; 2006.

[Hellström P M](#); [Näslund E](#); [Edholm T](#) et al. GLP-1 suppresses gastrointestinal motility and inhibits the migrating motor complex in healthy subjects and patients with irritable bowel syndrome. **Neurogastroenterol Motil**; 20: 649–59; 2008.

Hickey M S; Pories W J; MacDonald K G; et al. A new paradigm for type 2 diabetes mellitus: could it be a disease of the foregut? **Ann Surg**; 227: 637–43; 1998.

Holst J J; Deacon C F; Vilsboll T ; Krarup T; Madsbad S. Glucagon-like peptide-1, glucose homeostasis and diabetes. **Trends in Molecular Medicine**; 14(4); 2008.

Holst J J; Vilsboll T; Deacon C F. The incretin system and its role in type 2 diabetes mellitus. **Mol Cell Endocrinol**; 15;297(1-2):127-36; 2009.

Hunter J E. Dietary levels of *trans*-fatty acids: basis for health concerns and industry efforts to limit use. **Nutrition research**; 25(5): 499-513; 2005.

Idris I; Donnelly R. Dipeptidyl peptidase-IV inhibitors: a major new class of oral antidiabetic drug. **Diabetes, Obesity and Metabolism**; 9: 153–165; 2007.

[Jackson R S](#); [Creemers J W](#); [Ohagi S](#); et al. Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. **Nature genetics**; 16; 1997.

Kahn S E; Hull R L; Zutzschneider K M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, 444; 2006.

Kim K J; Kim H Y; Son E J; Heo J; Cheong J H. Oleic acid inhibits hepatic insulin signaling through deregulation of STAT3 activation and C/EBP expression. **Cellular Signalling**; 21: 1269-1276; 2009.

Kopelman, P. G. Obesity as a medical problem. **Nature**; 404; 2000.

Kotacková L; Baláziová E; Sedo A. Expression pattern of dipeptidyl peptidase IV activity and/or structure homologues in cancer. [Folia Biol \(Praha\)](#);55(3):77-84; 2009.

Kuo P; Chaikomin R; Pilichiewicz A; *et al.* Transient, early release of glucagon-like peptide – during low rates of intraduodenal glucose delivery. **Regulatory Peptides**, 146(13); 2008.

Laferrère B B; Teixeira J; Ginty J M; *et al.* Effect of Weight Loss by Gastric Bypass Surgery Versus Hypocaloric Diet on Glucose and Incretin Levels in Patients with Type 2 Diabetes. **J Clin Endocrinol Metab**, 93(7):2479–2485; 2008.

Laferrère B; Heshka S; Wang K; *et al.* Incretin levels and effect are markedly enhance 1 month after roux-en-Y gastric bypass surgery in obese patients with type 2 diabetes. **Diabetes Care**; 30 (7): 1709-16; 2007.

Le Roux C W; Aylwin S J B; Batterham R L; *et al.* Gut hormone profiles following bariatric surgery favor an anorectic state, facilitate weight loss and improve metabolic parameters. **Ann surg**; 243(1): 108-114; 2006.

Lehninger A L; Nelson D L.; COX M M. **Principios de bioquímica**. 2. ed. 839 p. 1995.

Lerman R H; Minich D M; Darland G; *et al.* Enhancement of a modified Mediterranean-style, low glycemic load diet with specific phytochemicals improves cardiometabolic risk factors in subjects with metabolic syndrome and hypercholesterolemia in a randomized trial. **Nutrition & Metabolism**; 5:29; 2008

Little T J; Doran S; Meyer J H; *et al.* The release of GLP-1 and ghrelin, but not GIP and CCK, by glucose is dependent upon the length of small intestine exposed. **Am J Physiol Endocrinol Metab**; 291: E647–E655, 2006.

Liu X; Harada N; Yamane S *et al.* Effects of long-term dipeptidyl peptidase-IV inhibition on body composition and Glucose tolerance in high fat diet-fed mice. **Life Sciences**; 84: 876-881; 2009.

Lopez-Garcia L; Schulze M B; Meigs J B. Consumption of Trans Fatty Acids Is Related to Plasma Biomarkers of Inflammation and Endothelial Dysfunction. **J. Nutr**; 135:562–566; 2005.

Louheranta A M; Turpeinen A K; Vidgren H M; Schwab U S; Uusitupa M I J. A High-Trans Fatty Acid Diet and Insulin Sensitivity in Young Healthy Women. **Metabolism**; 48 (7): 870-875; 1999.

Lynch, R J; Eisenberg D; Bell R L. Metabolic consequences of bariatric surgery. **J Clin Gastroenterol**, 40 (8): 659-668; 2006.

Mason E E. The mechanism of surgical treatment of type 2 diabetes. **Obes Surg**; 15: 459–61; 2005.

[Meier J J](#); [Nauck M A](#); [Kranz D](#); *et al.* Secretion, degradation, and elimination of glucagon-like peptide 1 and gastric inhibitory polypeptide in patients with

chronic renal insufficiency and healthy control subjects. **Diabetes**; 53(3):654-62; 2004.

Mendonça C P; Dos Anjos L A. Aspectos das práticas alimentares e da atividade física como determinantes do crescimento do sobrepeso/obesidade no Brasil. **Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro**, 20(3):698-709, 2004.

Miller K. Obesity: surgical options. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 18 (6): 1147–1165; 2004.

Moreira N X; Curi R; Padovese R; Mancini-Filho J. Incorporation of dietary trans mono-unsaturated fatty acids into tissues of Walker 256 tumor-bearing rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**; 34: 501-508; 2001.

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

Motard-Belanger A; Charest A; Grenier G; *et al.* Study of the effect of trans fatty acids from ruminants on blood lipids and other risk factors for cardiovascular disease. **Am J Clin Nutr**; 87:593–9; 2008.

Mottin C C; Padoin A V; Schroer C E; *et al.* Behavior of Type 2 Diabetes Mellitus in Morbid Obese Patients Submitted to Gastric Bypass. **Obes Surg**; 18:179–181; 2008.

Näslund E ; Hellström P M. Appetite signaling: From gut peptides and enteric nerves to brain. **Physiology & Behavior**; 92: 256-262; 2007.

Nauck M A; Heimesaat M M; Orskov C; Holst J J; Ebert R; Creutzfeldt W. Preserved incretin activity of glucagon-like peptide 1 [7-36 amide] but not of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with type-2 diabetes mellitus. **J Clin Invest**; 91(1): 301–307; 1993.

[Nauck M A](#); [Niedereichholz U](#); [Ettler R](#); *et al.* Glucagon-like peptide 1 inhibition of gastric emptying outweighs its insulinotropic effects in healthy humans. **Am J Physiol Endocrinol Metab**; 273: 981-88; 1997.

Neary NM, CJ Small, MR Druce, *et al*, Peptide YY3-36 and glucagon-like peptide-17-36 inhibit food intake additively. *Endocrinology* 2005; **146**: 5120-7

NOVAK U; WILKS A; BUELL G; McEWEN S. Identical mRNA for proglucagon in pancreas and gut. **Eur. J. Biochem**; 164: 553-558; 1987.

Ogden C L; Yanovski S Z; Carroll, M D; Flegal K M. The Epidemiology of besity. **Gastroenterology**;132:2087–2102; 2007.

Papadimitriou M A; Krzemien A A; Hahn PM; Van Vugt D A. Peptide YY(3-36)-induced inhibition of food intake in female monkeys. **Brain Res** 2007; 1175: 60-5.

Patriti A; Facchiano E; Sanna A et al. The enteroinsular axis and the recovery from type 2 diabetes after bariatric surgery. **Obes Surg**; 14: 840–8; 2004.

Pereira, L. O.; De Francischi, R. P.; Lancha Jr, A. H. Obesidade: Hábitos Nutricionais, Sedentarismo e Resistência à Insulina. **Arq Bras Endocrinol Metab** 2003; 47 (20).

Pesquisa de Orçamentos Familiares - POF 2002-2003, Excesso de peso atinge 38,8 milhões de brasileiros adultos. Comunicação Social 16 de dezembro de 2004. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia\\_impressao.php?id\\_noticia=278](http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_impressao.php?id_noticia=278). Acessado em: 01 março de 2009.

Pfeuffer M; Schrezenmeir J. Impact of *trans* fatty acids of ruminant origin compared with those from partially hydrogenated vegetable oils on CHD risk. **International Dairy Journal**; 16:1383-1388; 2006.

Pinheiro, A R De O; Freitas S F T De; Corso A C T. Uma abordagem epidemiológica da obesidade. **Rev. Nutrição. Campinas**; 17(4):523-533; 2004.

Ranganath L R. The entero-insular axis: implications for human metabolism. **Clin Chem Lab Med**; 46(1): 43–56; 2008.

Ranganath L R; Beety J M; Morgan L M; Wright J W; Howland R; Marks V. Attenuated GLP-1 secretion in obesity: cause or consequence? **Gut**; 38: 916-919; 1996.

Risérus U. *Trans* fatty acids and insulin resistance. **Atherosclerosis Supplements**.7:37–39; 2006.

Rosa G; Mingrone G; Manco M; *et al*. Molecular mechanisms of diabetes reversibility after bariatric surgery. **International Journal of Obesity**, 31:1429–1436; 2007.

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. **Annals of Surgery**, 239 (1); 2004.

Rubino F; Forgione A; Cummings D E et al. The Mechanism of Diabetes Control After Gastrointestinal Bypass Surgery Reveals a Role of the Proximal Small Intestine in the Pathophysiology of Type 2 Diabetes. **Ann Surg**; 244: 741–749; 2006.

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

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**;239: 1–11; 2004.

Salmeron J, Hu FB, Manson JE, et al. Dietary fat intake and risk of type 2 diabetes in women. **Am J Clin Nutr**; 73:1019–26; 2001.

Sandoval D A; Bagnol D; Woods S C; D'Alessio D A; Seeley R J. Arcute glucagons-like peptide 1 receptors regulate glucose homeostasis but not food intake. **Diabetes**; 57: 2046-2054; 2008.

Saravanan N; Haseeb A; Ehtesham N Z; Ghafoorunissa. Differential effects of dietary saturated and trans-fatty acids On expression of genes associated with insulin sensitivity in Rat adipose tissue. **European Journal of Endocrinology**; 153: 159–165; 2005.

Saravanan N; Haseeb A; Ehtesham N Z ; Ghafoorunissa. Differential effects of dietary saturated and trans-fatty acids on expression of genes associated with insulin sensitivity in Rat adipose tissue. **European Journal of Endocrinology**; 153:159–165; 2005.

Sowemimo O A; Yood S M; Courtney J; *et al.* Natural history of morbid obesity without surgical intervention. **Surgery for Obesity and Related Diseases**, 2006.

Tardy A L; Lambert-Porcheron S; Malpuech-Brugere C; *et al.* Dairy and industrial sources of trans fat do not impair peripheral insulin sensitivity in overweight women. **Am J Clin Nutr**; 90: 88-94, 2009

Theodorakis M J; Carlson O; Michopoulos S et al. Human duodenal enteroendocrine cells: source of both incretin peptides, GLP-1 and GIP. **Am J Physiol Endocrinol Metab**; 290: E550–E559; 2006.

Tholstrup T, Raff M, Basu S, Nonboe P, Sejrsen K, Straarup EM. Effects of butter high in ruminant trans and monounsaturated fatty acids on lipoproteins, incorporation of fatty acids into lipid classes, plasma C-reactive protein, oxidative stress, hemostatic variables, and insulin in healthy young men. **Am J Clin Nutr**; 83:237–43; 2006.

Turpeinen A M; Mutanen M; Aro A et al. Bioconversion of vaccenic acid to conjugated linoleic acid in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**; 76(3): 504-510; 2002.

Ueno H; Yamaguchi H; Mizuta M; Nakazato M. The role of PYY in feeding regulation. **Regulatory peptides**; 145: 12-16; 2008.

Ugleholdt R; Poulsen M L H; Holst P J et al. Prohormone Convertase 1/3 Is Essential for Processing of the Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide Precursor. **J Biol Chem**; 281 (16): 11050–7; 2006.

[Ugleholdt R](#); [Zhu X](#); [Deacon C F](#); [Orskov C](#); [Steiner D F](#); [Holst J J](#). Impaired intestinal proglucagon processing in mice lacking prohormone convertase 1. **Endocrinology**; 145(3):1349-55; 2004.

Vessby A; Uusitupa M; Hermansen K *et al.* Substituting dietary saturated for monounsaturated fat impairs insulin sensitivity in healthy men and women: The KANWU study. **Diabetologia**; 44:312-319; 2001.

[Viltsboll T](#); [Agerse H](#); [Krarup T](#); [Holst J J](#). Similar elimination rates of glucagon-like peptide-1 in obese type 2 diabetic patients and healthy subjects. **J Clin Endocrinol Metab**; 88(1):220-4; 2003.

Viltsboll T; Krarup T; Madsbad S; Holst J J. Defective amplification of the late phase insulin response to glucose by GIP in obese Type II diabetic patients. **Diabetologia** 45:1111–1119; 2002.

White J W; Grady F S. Structure of the human glucagon gene. **Nucleic Acids Research**; 14 (12); 1986.

Whitson B A; Leslie D B; Kellogg, T A; *et al.* Entero-Endocrine Changes After Gastric Bypass in Diabetic and Nondiabetic Patients: A Preliminary Study. **Journal of Surgical Research**, 141: 31–39; 2007.

Wilding, JPH. Treatment strategies for obesity. **Obesity reviews** 8 (1): 137-144, 2007.

Willett W C. Trans fatty acids and cardiovascular disease — epidemiological data. **Atherosclerosis Supplements**; 7: 5–8; 2006.

World Health Organization, Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic, Geneva,1998. Disponível em: [HTTP://WWW.WHO.INT/EN/](http://www.who.int/en/). Acessado em: janeiro de 2009.

\_\_\_\_\_BMI classification, 2004. Disponível em: [HTTP://WWW.WHO.INT/EN/](http://www.who.int/en/). Acessado em: janeiro de 2009.

\_\_\_\_\_Obesity and overweight, WHAT ARE overweight and obesity? 2006. Disponível em: [HTTP://WWW.WHO.INT/EN/](http://www.who.int/en/). Acessado em: janeiro de 2009.

Yamada K; Hayashi M; Du W; *et al.* Localization of CD26/DPPIV in nucleus and its nuclear translocation enhanced by anti-CD26 monoclonal antibody with anti-tumor effect. **Cancer Cell International**; 9:17; 2009.

[Zhu X](#); [Zhou A](#); [Dey A](#); *et al.* Disruption of PC1/3 expression in mice causes dwarfism and multiple endocrine peptide processing defects. **Proc Natl Acad Sci U S A**; 6;99(16):10293-8; 2002.

## ANEXO I – Lista de Figuras

### INTRODUÇÃO

Figura 1 - Ilustra a cirurgia bariátrica realizada pelo COM/PUCRS.....	13
Figura 2 - Representação do gene próGIP, seu mRNA e a proteína.....	15
Figura 3 - Representação do gene pró-glucagon, seu mRNA e as proteínas tecido-específicas.....	18
Figura 4 - Representa a atividade da enzima DPP-IV na inativação de GIP e GLP-1.....	22
Figura 5 - Representação da configuração espacial dos ácidos graxos oleico, eláidico e esteárico.....	24
Figura 6 - Formação do ácido vaccênico no rúmen.....	25

### CAPÍTULO II

Figura 1 - Viabilidade celular determinada pelo teste do MTT.....	80
Figura 2 - Efeito dos ácidos graxos e alta concentração de glicose sobre a viabilidade celular.....	81

### DISCUSSÃO

Figura 7 - Representa a distribuição de células K e L no intestino delgado...	86
---	----

## ANEXO II – Lista de tabelas

### CAPÍTULO I

Tabela 1 – Oligonucleotídeos usados na reação qRT-PCR, 5' - 3'.....	52
Tabela 2 – Dados bioquímicos e antropométrico dos pacientes OBM DMT2 e NDM2, antes e após a cirurgia.....	53
Tabela 3 – Glicose sanguínea dos pacientes OBM DMT2 e NDM2 antes e após a cirurgia.....	54
Tabela 4 – Expressão do mRNA de pró-glucagon, GIP, PC1/3 e DPP-IV em células de jejuno de OBM DMT2 e NDM2.....	55
Tabela 5 – Expressão do mRNA de pró-glucagon, GIP, PC1/3 e DPP-IV em células de jejuno de OBM.....	56

### CAPÍTULO II

Tabela 1 – Oligonucleotídeos usados na reação qRT-PCR, 5' - 3'.....	77
Tabela 2 – Dados bioquímicos e antropométrico dos pacientes OBM .....	78
Tabela 3 – Efeito dos ácidos graxos, oleico, eláidico e vaccênico e alta concentração de glicose sobre a expressão do mRNA de pró-glucagon, GIP, PC1/3 e DPP-IV em células de jejuno de OBM.	79

### ANEXO III - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

O projeto de pesquisa intitulado: “Análise e quantificação da expressão de mRNA de PPARs, PYY, GIP, GLP-1, PC 1/3 e DPP-IV nas células-L gastrointestinais” será realizado pela UFRGS, com pacientes obesos grau III do Centro de Obesidade Mórbida do Hospital São Lucas da PUC. O pesquisador responsável é: Regina Maria Vieira da Costa Guaragna.

Esta pesquisa tem por objetivo: Analisar e quantificar a expressão de mRNA de PPARs, PYY, GLP-1, GIP, PC1/3 e DPP-IV nas células endócrinas gastrointestinais do jejuno proximal e médio de indivíduos obesos grau III. Além disso, determinar a modulação da expressão destes mRNAs com diferentes ácidos graxos comumente encontrados na dieta.

Justificativa: tem sido demonstrado que após a cirurgia da obesidade os pacientes que apresentam diabetes do tipo 2 apresentam uma melhora dessa patologia. Para melhor compreender este fenômeno é necessário elucidar o mecanismo molecular, isto é, o quanto e como as células do jejuno estão produzindo hormônios que auxiliam na liberação de insulina, melhorando a diabetes. Sabe-se também que a liberação destes hormônios é influenciada por alguns alimentos, por isso vamos estudar como as gorduras e o açúcar, podem estimular ou inibir a produção desses hormônios.

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

As amostras serão coletadas no momento da cirurgia, onde será retirado 0,5 cm<sup>2</sup> para análise do mRNA basal e 5g para as incubações. A retirada das amostras não trará prejuízos à saúde do voluntário, pois esse tecido seria desprezado no momento do corte cirúrgico.

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

informações, preservando a identidade dos participantes. Haverá divulgação dos resultados da pesquisa.

**Desde já, agradecemos sua contribuição para o desenvolvimento desta atividade de pesquisa e colocamo-nos à disposição para esclarecimentos adicionais, através dos telefones 3013 7235 e 3308 5546.**

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

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2008.

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

Assinatura do Voluntário: \_\_\_\_\_

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)