



2014



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

O Tecido Adiposo num Modelo Animal
de Diabetes tipo 2 – Impacto da
Cirurgia Bariátrica

*O Tecido Adiposo num Modelo Animal de
Diabetes tipo 2 – Impacto da Cirurgia Bariátrica*

*Filipa Fonseca
Vasconcelos*

Filipa Fonseca Vasconcelos

2014



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

O Tecido Adiposo num Modelo Animal de Diabetes tipo 2 – Impacto da Cirurgia Bariátrica

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Raquel Seiça (Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra) e da Professora Doutora Graça Vale (Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra)

Filipa Fonseca Vasconcelos

“ Quando recebemos um ensinamento devemos recebê-lo como um valioso presente e não como uma dura tarefa. Eis, a diferença que transcende.”

Albert Einstein

Índice

Agradecimentos	6
Breve Abordagem	8
Índice de Tabelas	9
Índice de Figuras	10
Lista de Abreviaturas	11
Resumo	13
Abstract	14
Introdução	15
Tecido Adiposo	16
Função metabólica.....	16
Função endócrina, autócrina e parácrina e função imunológica	17
Diabetes Mellitus	22
Diabetes Mellitus Tipo 1	22
Diabetes Mellitus tipo 2	22
Tipos específicos de diabetes	22
Diabetes Gestacional	22
Pré-diabetes	23
Insulino-resistência e alterações da célula β na Diabetes tipo 2.....	24
Cirurgia Bariátrica na obesidade e na diabetes tipo 2.....	27
Objetivos e Plano do trabalho	30
Métodos	32
Animais e tratamentos	33
Peso corporal e determinação de parâmetros sistêmicos.....	33
Colheitas de tecido adiposo e sangue	34
Insulina e índices de resistência e sensibilidade à insulina	34
Homogeneização do tecido adiposo epididimal	34
Detecção de proteínas por <i>Western Blot</i>	35
Análise estatística.....	37
Resultados	38
Ingestão de alimentos, peso corporal e níveis sanguíneos de glicose, triglicerídeos e colesterol	39
Hemoglobina Glicada (HbA1c).....	42

Índices de insulino-resistência e de sensibilidade à insulina.....	44
Parâmetros no tecido adiposo.....	46
Discussão e Conclusões.....	49
Referências	54

Agradecimentos

Ao iniciar este trabalho, pareceu-me que a sua realização desenrolar-se-ia com relativa facilidade, porém no percurso e desenvolvimento do tema apercebi-me ser complexo atingir os objetivos propostos.

A recolha conscienciosa de elementos credíveis obrigou-me a uma profunda e pormenorizada pesquisa, assim como aceitar as solicitações de todos os que nele colaboraram tornando esta monografia uma realidade.

Creio que as dificuldades foram-se ultrapassando, concluindo este pequeno projeto ciente que dei o meu melhor, no intuito de transmitir algo de válido desta área investigação tão vasta e abrangente. Uma experiência extremamente enriquecedora!

Assim, este trabalho é fruto de pequenas conquistas usufruindo do valioso apoio dos que me rodeavam, razão pelo qual aqui deixo expresso o meu sincero reconhecimento.

Agradeço à Professora Doutora Raquel Seiça, minha orientadora científica, a oportunidade de participar neste projeto de investigação. As úteis sugestões, os valiosos e construtivos comentários no desenvolvimento de todas as etapas deste trabalho. Assim como, pela sua amizade e compreensão, disponibilidade e rigor, que sempre demonstrou, ocupando um lugar de destaque entre aqueles que a tornaram possível.

À Professora Doutora Graça Vale, minha professora de Oncobiologia e Metabolismo e também orientadora do meu estágio científico de licenciatura, ajuda e incentivo e pelos seus pertinentes e generosos comentários.

À Dr.^a Teresa Louro pela sua preciosa colaboração na partilha de experiências laboratoriais bem como pela prontidão e espírito de ajuda que manifestou nos diversos trabalhos realizados.

Ao Doutor Paulo Matafome o meu profundo reconhecimento pela disponibilidade, profissionalismo e competência, bem como pelo estímulo e motivação, transmitindo-me conselhos sensatos e referências importantes, absolutamente necessários e oportunos, que muito valorizaram este trabalho.

Estou ainda muito grata ao Senhor Mário Simões “Amigo e Companheiro de jornada” possuidor de conhecimentos e noções fundamentais nestes desafios laboratoriais, não só pela experiência adquirida, mas também pelo entusiasmo, e apoio técnico em todas as fases do processo.

À Professora Doutora Cristina Sena, pelos seus úteis e práticos conselhos, solidárias e didáticas sugestões, especialmente com o objetivo de melhorar o meu desempenho laboratorial.

Este trabalho também não teria sido possível, sem o envolvimento direto do Sr. Dr. Hans, médico-cirurgião no ativo, responsável pelas cirurgias nos ratos. Agradeço ainda os seus preciosos ensinamentos, e inestimável apoio científico e na obtenção de material necessário.

Sem esquecer a amabilidade, carinho e simpatia, manifestada gratuitamente por todos os colegas de trabalho da Faculdade de Medicina, e Amigos que de alguma forma me acompanharam, aos quais manifesto o meu sincero agradecimento. Eles são uma família encantadora!

Finalmente enorme a gratidão, à minha mãe e tia, pela sua compreensão e paciência nos momentos mais difíceis e ainda, porque possuidoras de alguns conhecimentos do “idioma de Cícero” pela sua colaboração, aperfeiçoando e burilando o texto desta monografia.

Um agradecimento especial a Deus, por me emprestar diariamente o coração que pulsa, o oxigénio que respiro, o solo que caminho e milhões de itens para que eu exista.

À memória da Pessoa que está sempre a zelar por mim em todos os momentos e que nunca me abandona, com quem aprendi a “ver” com os olhos do coração. Da tua *Joíta* para ti meu Pai.

Bem-haja a todos por existirem! Seres únicos no teatro da vida...

Breve Abordagem

A evolução do conhecimento das bases moleculares da Vida e do funcionamento do corpo humano alterou profundamente o conceito de Saúde e Doença, conduzindo a um desenvolvimento constante de novas estratégias de Diagnóstico, Prevenção e Terapêutica. Esta revolução no mundo da ciência e tecnologia é o resultado da aplicação do conhecimento das Ciências Biológicas à Medicina, à indústria relacionada com a Saúde, e à investigação em Biomedicina, constituindo a interface entre Biologia, Medicina, Saúde e Indústria.

Os caminhos estão abertos, novas perspetivas e novos horizontes procuram desvendar-se neste novo milénio, tão fértil em grandes descobertas.

Dão-se novos mundos à saúde como em tempos os Portugueses deram novos mundos ao mundo. Presentemente os investigadores procuram justificações e respostas para todos os acontecimentos e problemas... Talvez a meta seja a imortalidade do ser humano! Ficção científica ou realidade futura?!

Assim, sem pretensão de ser exaustiva, o que seria irrisório pois o tema é ilimitado, o meu trabalho cinge-se apenas a uma parte muito restrita do vasto campo do estudo da **diabetes e obesidade**.

No passado, a regra básica da boa alimentação era escolher ingredientes que satisfizessem as necessidades diárias de nutrientes. No entanto, a oferta e permanente consumo de saborosos pratos extremamente calóricos, associado à tarefa “árdua” de aliar a prática desportiva à rotina da sociedade actual, está a conduzir ao aumento de doenças crónicas como doenças cardiovasculares, diabetes, hipertensão arterial, e outras alterações metabólicas graves.

Índice de Tabelas

Tabela 1: Tampões utilizados na homogeneização e na técnica de Western Blot	36
Tabela 2: Peso corporal e valores sanguíneos em jejum de glicose, colesterol e triglicerídeos dos ratos Wistar e GK (controlo), antes e após tratamento.	39
Tabela 3: Peso corporal e valores sanguíneos em jejum de glicose, colesterol e triglicerídeos dos ratos Wistar e GK sham, antes e após tratamento.....	40
Tabela 4: Peso corporal e valores sanguíneos em jejum de glicose, colesterol e triglicerídeos dos ratos sujeitos a cirurgia bariátrica, antes e após tratamento.....	40
Tabela 5: Peso corporal e valores sanguíneos em jejum de glicose, colesterol e triglicerídeos após tratamento.....	41

Índice de Figuras

Figura 1: Via de sinalização da insulina na captação de glicose.....	26
Figura 2: Hemoglobina glicada (HbA1c) antes e após o tratamento.....	42
Figura 3: Hemoglobina glicada (HbA1c) após tratamento.....	43
Figura 4: Índice de insulino-resistência HOMA, após tratamento.....	44
Figura 5: Índice de sensibilidade à insulina QUICK, após tratamento.	45
Figura 6: Quantificação por Western Blotting da cinase ativada por AMP (AMPK)....	46
Figura 7: Quantificação por Western Blotting da cinase Akt.....	47
Figura 8: Quantificação por Western Blotting do marcador anti-apoptótico, o rácio Bcl-2/Bax.....	47

Lista de Abreviaturas

a.a.	Aminoácidos
AMP	Adenosina 3',5'-monofosfato
AMPK	Cinase Ativada por AMP
ATP	Adenosina trifosfato
CVD	Doenças Cardiovasculares
dL	Decilitro
DM 2	Diabetes Mellitus tipo 2
ELISA	<i>Enzyme-linked Immuno Assay</i>
eNOS	Sintetase Endotelial do Óxido Nítrico
Epm	Erro padrão da média
ET-1	Endotelina-1
FATP	Proteína Transportadora de Ácidos Gordos
g	Gramas
GAPDH	Gliceraldeído 3-P desidrogenase
GK	<i>Goto- Kakizaki</i>
GLP-1	<i>Glucagon-like peptide 1</i>
GLUT	Transportador de Glicose
HbA1c	Hemoglobina Glicada
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
HSL	Lipase hormono- sensitiva
ICAM	Molécula de Adesão Intercelular
IMC	Índice de Massa Corporal
I κ B α	Inibidor α do NF- κ B
IKK	Cinase do Inibidor do NF- κ B
IL	Interleucina
IGF-1	<i>Insulin- like growth factor</i>
IR	Insulino-resistência
IRS	Substrato do Receptor da Insulina
JNK	Cinase do Fator de Transcrição c-Jun
Kg	Kilograma
L	Litro

LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
LPL	Lipoproteína Lipase
MAPK	<i>Mitogen- activated protein kinase</i>
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
Mmol	Milimole
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NF- κ B	Factor Nuclear κ B
ng	Nanogramas
mmol	Milimol
PARP	<i>Poli ADP ribose polymerase</i>
PCR	Proteína C Reactiva
PI ₃ K	Cinase de PI ₃
PKB	Proteína Cinase B
PKC	Proteína Cinase C
PPAR	<i>Peroxisome proliferation- activated receptor</i>
PVDF	Fluoreto de Polivinilideno
ROS	Espécies reativas de oxigénio
SOCS	Supressor da Sinalização das Citocinas
TG	Triglicerídeos
TGF- β	<i>Transforming growth fator- β</i>
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral α
U	Unidades
VCAM	Molécula de adesão das células vasculares
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
W	Wistar
μ g	Microgramas
%	Percentagem

Resumo

O recurso à cirurgia bariátrica ou metabólica constitui uma opção eficaz na redução do peso corporal e na melhoria das co-morbilidades associadas à obesidade, como a diabetes tipo 2. Estas técnicas cirúrgicas mostraram ser eficientes na melhoria da situação diabética, na sequência de possíveis alterações entero-endócrinas e diminuição da insulino-resistência periférica. De facto, a redução do peso corporal poderá ser um dos fatores, mas as alterações endócrinas induzidas por estas técnicas cirúrgicas gastrointestinais, não inteiramente conhecidas, poderão estar igualmente envolvidas, nomeadamente as hormonas gastrointestinais como a grelina, o *glucagon-like-peptide-1* e o peptídeo YY.

O tecido adiposo é alvo primário da insulino-resistência periférica. A sua disfunção, particularmente a do tecido adiposo visceral que se traduz na desregulação da produção de citocinas e de adipocitocinas e no fluxo exagerado de ácidos gordos, contribui para as complicações da obesidade e para o desenvolvimento da diabetes tipo 2.

Os efeitos da cirurgia bariátrica no tecido adiposo são desconhecidos pelo que foi nosso objetivo, avaliar o impacto destas técnicas cirúrgicas no tecido adiposo visceral (epididimal), de um modelo animal de diabetes tipo 2 não obeso, os ratos Goto-Kakizaki (GK), de forma independente da obesidade.

Os nossos resultados mostraram que os animais submetidos a cirurgia da obesidade não aumentaram de peso, melhoraram significativamente os valores de hemoglobina glicada (HbA1c) e os índices de insulino-resistência (HOMA) e insulino-sensibilidade (QUICK), quando comparados com o grupo controlo. No que diz respeito às alterações no tecido adiposo visceral epididimal, obtivemos um aumento significativo dos níveis da AMPK, da cinase *Akt* e do rácio Bcl-2/Bax, sugerindo uma melhoria da ação da insulina com diminuição da apoptose, nos grupos sujeitos à cirurgia bariátrica.

Estes resultados permitem-nos concluir que a cirurgia metabólica na diabetes tipo 2 não obesa conduz a uma melhoria do controlo glicémico, com diminuição da resistência à insulina nomeadamente a nível do tecido adiposo.

Palavras-chave: ratos Goto-Kakizaki, cirurgia bariátrica, diabetes tipo 2, tecido adiposo visceral, resistência à insulina, AMPK, Akt, rácio Bcl-2/Bax.

Abstract

The use of bariatric or metabolic surgery is an effective option in reducing body weight and improving co-morbidities associated with obesity such as type 2 diabetes. Such surgical techniques shown to be effective in improving the diabetic condition, following possible entero-endocrine changes and peripheral insulin resistance decrease. In fact, body weight reduction may be a factor, but the endocrine changes induced by these gastrointestinal surgical techniques, not entirely known, may also be involved, such as gastrointestinal hormones ghrelin , glucagon-like-peptide-I and peptide YY .

Adipose tissue is the primary target of peripheral insulin resistance. Its dysfunction, particularly at visceral adipose tissue level which results in dysregulation of cytokine and adipocytokines production and high flow of fatty acids, contributes to the complications of obesity and type 2 diabetes development.

The effects of bariatric surgery on adipose tissue are unknown. So our goal was to assess the impact of these surgical techniques on the visceral (epididymal) adipose tissue of an animal model of non obese type 2 diabetes, the Goto-Kakizaki (GK) rats, independently of obesity.

Our results showed that the animals undergoing obesity surgery did not increase body weight and its glycated hemoglobin (HbA1c) and indices of insulin resistance (HOMA) and insulin sensitivity (QUICK) were improved, when compared with the control groups. In relation to visceral adipose tissue, we obtained a significant increase of AMPK, *Akt* kinase and Bcl-2/Bax ratio levels suggesting an improvement of insulin action with decreased apoptosis in the rats submitted to bariatric surgery.

In conclusion, metabolic surgery in non obese type 2 diabetes induces an improvement of glycemic control with amelioration of insulin resistance, particularly in adipose tissue.

Keywords: Goto-Kakizaki rats, bariatric surgery, type 2 diabetes mellitus, visceral adipose tissue, insulin resistance, AMPK, *Akt*, ratio Bcl-2/Bax

Introdução

Tecido Adiposo

O tecido adiposo é um tipo especial de tecido conjuntivo com diferentes células, predominantemente as células adiposas ou adipócitos, mas também pré-adipócitos, fibroblastos, células endoteliais, macrófagos e outros leucócitos. Os adipócitos podem ser encontrados isolados ou em pequenos grupos no tecido conjuntivo comum; porém, a maioria agrupa-se no tecido adiposo branco, distribuído pelo organismo a nível subcutâneo e visceral (Guilherme A. et al, 2008).

Existem dois tipos de tecido adiposo, que apresentam distribuição, estrutura e funções diferentes. O **tecido adiposo branco ou unilocular**, em que os adipócitos apresentam uma gotícula de gordura que ocupa quase todo o citoplasma; é considerado o maior reservatório de energia sob a forma de triglicerídeos, desempenhando um papel chave no controlo da homeostasia energética e no equilíbrio hormonal.

A outra variedade, caracteriza-se por adipócitos que contêm múltiplas gotículas lipídicas e mitocôndrias, o **tecido adiposo castanho ou multilocular**, que quase desaparece no final do primeiro ano de vida. Tem uma ação termogénica importante pois da oxidação local dos ácidos gordos resulta produção de calor e não de ATP (Junqueira LC, 2004; Costa J. 2005).

O tecido adiposo branco tem funções metabólicas, endócrinas e imunológicas importantes:

Função metabólica

Os lípidos armazenados nas células adiposas são principalmente triglicerídeos (TG), isto é, ésteres de ácidos gordos e glicerol. Os TG provenientes da alimentação são absorvidos a nível intestinal e conduzidos até às células adiposas como TG dos quilomícrons; os TG provenientes do fígado são transportados até ao tecido adiposo, sob a forma de TG constituintes das lipoproteínas de muito baixo peso molecular (VLDL) (Ahima RS et al, 2000; Marques S. 2006).

Nos capilares sanguíneos do tecido adiposo, a presença de lipoproteína-lipase (LPL), produzida pelas células adiposas, promove a hidrólise dos TG dos quilomícrons e das VLDL circulantes, com libertação dos seus componentes. Destes, os ácidos gordos

penetram nas células adiposas, onde se recombina com o glicerol para formar novas moléculas de TG, que são depositadas.

A insulina, a principal hormona do anabolismo, tem no adipócito um papel fulcral (Goossens Gijs H. et al, 2008; Lépori R, 2010):

- estimula a captação de glicose;
- ativa a lipoproteína-lipase de que resulta a degradação dos TG com a consequente captação dos ácidos gordos;
- aumenta a síntese de glicerol e ácidos gordos;
- aumenta a síntese de triglicédeos;
- inibe a degradação dos triglicédeos (lipólise).

Em situações de necessidade energética, como no jejum e no exercício físico, a hidrólise dos TG armazenados (por ação de lipases, particularmente a lipase hormono-sensitiva) com libertação de ácidos gordos e glicerol para a corrente sanguínea, é desencadeada por fatores nervosos, particularmente o sistema nervoso simpático, e humorais (como o cortisol e o glucagon) sendo crucial, também, a diminuição da insulinemia. Os ácidos gordos libertados são transportados no sangue ligados à albumina e utilizados como fonte de energia por outros tecidos. O glicerol é captado pelo fígado e reaproveitado, nomeadamente na gliconeogénese (Leite LD, 2009).

Função endócrina, autócrina e parácrina e função imunológica

O tecido adiposo é hoje considerado um órgão endócrino e não apenas um órgão de armazenamento de energia (Wisse BE, 2004; Ahima R, 2005). As suas células, não somente o adipócito, segregam uma larga diversidade de moléculas biológicas ativas, incluindo fatores hormonais, denominados por adipocinas, quimiocinas e citocinas com funções metabólicas e imunológicas e ação na regulação do apetite (Pandzic J, 2010). Destes produtos de secreção do tecido adiposo, destacamos os principais:

Leptina

Em grego *leptos* significa magro ou delgado. A leptina, a primeira adipocina identificada, é um produto do gene *Ob*, um peptídeo com peso molecular de 16 kDa, que apresenta uma estrutura terciária semelhante a alguns membros da família das citocinas (Juge-Aubry et al, 2005).

A leptina está envolvida em vários processos fisiológicos, nomeadamente o controlo do dispêndio de energia e a ingestão de alimentos, o metabolismo e ainda a reprodução. A sua importante ação anorexigénica (suprimir o apetite), resulta essencialmente da estimulação de neuropeptídeos que promovem a saciedade e da inibição dos que estimulam a ingestão de alimentos (neuropeptídeos orexigénicos), particularmente ao nível do núcleo arqueado ou infundibular do hipotálamo (Fernandez-Riejos P. et al, 2010).

Os seus efeitos estendem-se também a outros tecidos, nomeadamente o tecido muscular esquelético, aumentando a oxidação de ácidos gordos, através de uma via dependente de cinase ativada por AMP (AMPK).

A leptina apresenta ainda efeitos pró-angiogénicos e mitogénicos e tem ação pró-inflamatória. No pâncreas diminui a apoptose das células β mas diminui, também, a secreção de insulina (Galic S. et al, 2010; Ebtessam A. et al, 2013).

Os níveis sanguíneos da leptina estão elevados nos indivíduos obesos numa relação direta com a massa adiposa. Contudo, nestes doentes, há leptino-resistência, ou seja, a leptina não exerce adequadamente os seus efeitos (Sousa M. et al, 2009).

Resistina

A resistina é uma proteína pertencente à família de proteínas estruturalmente ricas em cisteína, produzida por adipócitos e pré-adipócitos e monócitos/macrófagos do tecido adiposo branco. Várias pesquisas sugerem que, contrariamente aos roedores, são os macrófagos do tecido adiposo os principais responsáveis pela produção primária desta adipocina nos humanos. Está envolvida na diferenciação de monócitos em macrófagos sendo a designação de resistina atribuída, pela sua capacidade de promover resistência à insulina (Galic S. et al, 2010). Foi demonstrado, que os níveis de resistina são elevados na obesidade genética ou induzida pela dieta alimentar e ligados à insulino-resistência muscular e hepática associada à obesidade (Ravelli MN et al, 2007).

A resistina diminui a diferenciação dos pré-adipócitos em adipócitos (adipogénese) limitando a expansão adequada do tecido adiposo em resposta ao aumento do consumo e armazenamento de gordura (Qi Y. et al, 2006). É também considerada uma proteína pró-inflamatória e pró-aterogénica, ao contrário da adiponetina, outra das adipocinas a seguir abordadas. A resistina aumenta a expressão de moléculas de adesão celular, como as moléculas de adesão das células vasculares (VCAM) e as moléculas de adesão intercelular (ICAM) e diminui a vasodilatação

estimulando a produção de espécies reativas de oxigénio e diminuindo a expressão da sintetase endotelial do óxido nítrico (eNOS), de que resulta a diminuição da biodisponibilidade do óxido nítrico, um agente vasodilatador potente (Matafome 2007). Contribui para a ativação das células endoteliais, via libertação de endotelina-1 (ET-1), e para a *up-regulation* da quimiocina, a proteína quimioatrativa de monócitos (MCP-1) (Carvalho C&F, 2006).

Adiponetina

A adiponetina é uma proteína de 30 kDa, constituída por 244 aminoácidos (Chandran M. *et al*, 2003). É um dos produtos maioritariamente segregados pelo tecido adiposo e a mais abundante em circulação. A sua expressão observa-se também a nível da medula óssea, osteoblastos, miócitos, cardiomiócitos, tecidos do feto e células epiteliais das glândulas salivares, sugerindo um papel complementar autócrino e parácrino em vários tecidos (Brochu-Gaudreau et al, 2009).

Ao contrário das outras adipocinas, os níveis de adiponectina estão inversamente correlacionados com o IMC (índice de massa corporal), estando reduzidos na obesidade e na diabetes tipo 2 (Bugianesi, 2005; Juge- Aubry et al, 2005; Meier & Gressner, 2004, Matafome, 2007). Em modelos animais sem o respetivo gene funcional, observa-se o desenvolvimento de insulino-resistência, intolerância à glicose, hipertensão e dislipidemia, condições que caracterizam a síndrome metabólica (Nawrocki et al, 2005; Xu et al, 2003).

A produção de adiponetina é ativada pela insulina, pelo *insulin-like-growth-factor* (IGF-1) e pelos activadores do *peroxissome proliferation-activated receptor* (PPAR γ), como as tiazolidinedionas. Pelo contrário, a sua produção é inibida pelos glicocorticóides, fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e agonistas dos recetores β 3 adrenérgicos (Galic S. et al, 2010).

A adiponetina tem múltiplos efeitos (Galic S. et al, 2010):

- Efeitos anti-inflamatórios:
 - Diminui a expressão de interleucina-6 (IL-6) e TNF- α (citocinas pró-inflamatórias)
 - Reduz a atividade fagocítica dos macrófagos
 - Aumenta a expressão de interleucina-10 (IL-10) (citocina anti-inflamatória)

- Efeitos cardioprotetores e de prevenção da aterosclerose:
 - Modula a expressão das moléculas de adesão celular, como ICAM, VCAM e seletinas
 - Inibe a proliferação e a migração das células musculares lisas da parede vascular
 - Aumenta a produção de óxido nítrico

- Efeitos metabólicos, no fígado e músculo-esquelético:
 - Diminui a gliconeogénese hepática
 - Aumenta a captação de glicose pelas células musculares e hepáticas
 - Aumenta a oxidação dos ácidos gordos

- Efeitos na célula β e na sensibilidade à insulina:
 - Estimula a secreção de insulina
 - Inibe a apoptose das células β induzida por ácidos gordos
 - Aumenta a sensibilidade à insulina nos tecidos insulino-dependentes

Proteína Quimioattractiva de Monócitos (MCP-1)

A quimiocina, MCP-1, é expressa e segregada no tecido adiposo branco e encontra-se aumentada em condições de obesidade. Atua na quimiotaxia de monócitos favorecendo a infiltração destes no tecido adiposo do indivíduo obeso e a inflamação de baixo grau subsequente, que agrava a disfunção do tecido adiposo (Guilherme A. et al, 2008). Por sua vez, os macrófagos ativados segregam factores pró-inflamatórios como o TNF- α e a IL-6 que, por sua vez, amplificam a resposta inflamatória (Antuna-Puente B. et al, 2008).

Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α)

Das citocinas pró-inflamatórias clássicas é de referir particularmente o TNF- α , um forte mediador de processos inflamatórios.

O TNF- α foi a primeira molécula a ser considerada como elo de ligação entre obesidade, diabetes e inflamação. Na realidade, a sua expressão está aumentada em indivíduos obesos e diabéticos e inversamente relacionada com os níveis de LPL e adiponectina e a sensibilidade à insulina (Galic S. et al, 2010).

O TNF- α pode inibir o sinal da insulina, estando particularmente envolvido nas situações de insulino-resistência. As bases moleculares deste mecanismo envolvem a ligação do TNF- α ao seu receptor, activando a enzima JNK, algumas isoformas da PKC (proteína cinase C), e a IKK β (cinase do inibidor do NF- κ B), promovendo a formação de proteínas SOCS (supressor da sinalização de citocinas), determinantes na resistência à insulina. A fosforilação de resíduos de serina do substrato do receptor da insulina (IRS-1), impede a ativação do IRS-1 e da PI3K e a translocação do transportador de glicose para a membrana e conseqüentemente a captação de glicose (Guilherme A. et al, 2008).

O TNF- α é igualmente crucial na regulação da homeostase dos lípidos. Segundo Yukun Cao et. al (2013), o TNF- α tem uma ação inibitória na atividade e expressão da LPL e dos transportadores de ácidos gordos (FATP) que culmina na diminuição da captação de ácidos gordos da circulação, resultando num estado de hiperlipidemia. Foi constatado que o TNF- α também diminui a expressão de enzimas chave destes processos como a acetil-CoA carboxilase, a ácido gordo sintetase, assim como a atividade da acetil-CoA sintetase, levando à diminuição da síntese de ácidos gordos e, conseqüentemente, a uma menor acumulação destes na forma de triglicérides (Ruan H. et al, 2003).

O TNF- α tem ainda uma ação pró-aterogénica e diminui a adipogénese e aumenta a apoptose de pré-adipócitos e adipócitos favorecendo, desta forma, a hipertrofia dos adipócitos restantes (Galic S. et al, 2010).

Diabetes Mellitus

A diabetes mellitus é uma doença metabólica multifatorial que se caracteriza por hiperglicemia crônica com distúrbios no metabolismo dos hidratos de carbono, lípidos e proteínas, resultantes de deficiências na secreção ou ação da insulina, ou de ambas (Ginsberg HN, 2000).

Estão envolvidos no desenvolvimento das duas formas mais frequentes da diabetes, vários mecanismos patogénicos. Estes incluem mecanismos que destroem as células β do pâncreas com a consequente deficiência absoluta de insulina, Diabetes Mellitus tipo 1 e mecanismos que induzem alterações da produção/secreção e da ação da hormona, Diabetes Mellitus tipo 2.

Os efeitos da diabetes mellitus, a longo prazo, incluem disfunção e falência de vários órgãos, as complicações crónicas da doença nomeadamente a retinopatia com potencial cegueira, a nefropatia que pode conduzir a insuficiência renal, a neuropatia com risco de ulcerações nos pés e amputações e risco aumentado de doença cardiovascular, vascular periférica e cerebrovascular (Cali AMG et al, 2008).

A classificação da Diabetes Mellitus, com base na sua etiologia, é a seguinte (*American Diabetes Association 2014*):

Diabetes Mellitus Tipo 1

Nesta patologia, as células β do pâncreas deixam de produzir a respetiva hormona, a insulina, em consequência de uma destruição auto-imune das mesmas.

Diabetes Mellitus tipo 2

A diabetes tipo 2 (DM2), a forma mais comum da diabetes, resulta de defeitos na secreção e ação da insulina. Consiste na incapacidade do organismo produzir adequadamente insulina, relativamente à diminuição da sua ação. Está frequentemente associada a excesso de peso ou obesidade.

Tipos específicos de diabetes

Nestes casos a etiologia é identificada, surgindo a hiperglicemia secundariamente a situações como doenças do pâncreas exócrino e endocrinopatias.

Diabetes Gestacional

A diabetes gestacional define-se como qualquer grau de intolerância à glicose que é diagnosticada ou aparece, pela 1ª vez, durante a gravidez.

A ocorrência da diabetes tipo 1 e tipo 2 está a aumentar, sendo mais notável a diabetes tipo 2 como consequência do aumento da esperança de vida e da obesidade epidémica (Holt T. et al, 2010).

A combinação de fatores genéticos e ambientais contribui para a ocorrência da diabetes tipo 2. Por conseguinte, há grupos com fortes probabilidades em desenvolver a doença (Muller-Wieland et al, 2008):

- História familiar (1º grau) de diabetes
- Idade acima dos 45 anos
- Excesso de peso e obesidade: $IMC \geq 25 \text{ kg/ m}^2$;
- Evento cardiovascular
- Estilo de vida sedentário
- Linhagem caucasiana
- Identificação prévia de Anomalia da Glicemia em Jejum, Anomalia de Tolerância à Glicose e/ou Síndrome Metabólica
- Hipertensão arterial ($\geq 140/90 \text{ mmHg}$ em adultos)
- Colesterol HDL baixo (35 mg/dl ou $0,9 \text{ mmol/l}$) e/ou Triglicérides elevados (250 mg/dl ou $2,82 \text{ mmol/l}$) ou ambos
- Mulheres com história de diabetes gestacional ou filhos macrossómicos ($\geq 4 \text{ Kg}$)
- Síndrome do ovário poliquístico

Pré-diabetes

A DM2 é geralmente precedida por um período de anomalias da glicemia que podem durar vários anos e que por si só constituem um risco acrescido de doenças cardiovasculares. Estas alterações associam-se frequentemente a obesidade, dislipidémia e hipertensão arterial. Estas situações frequentemente designadas de Pré-diabetes correspondem a alterações do metabolismo dos hidratos de carbono, em que os níveis de glicose no sangue são superiores ao normal, mas não suficientemente elevados para serem classificados como diabetes (Holt T. et al, 2010).

A pré-diabetes ou categorias de risco aumentado para a DM2, inclui:

- Anomalia da glicemia em jejum (AGJ)

- Anomalia da tolerância à glicose (ATG)
- Hemoglobina A1c (HbA1c) entre 5,7 e 6,4%

O reconhecimento destes estádios intermédios de anomalias da homeostase da glicose, a sua identificação e a implementação de medidas de prevenção poderão evitar ou pelo menos retardar o desenvolvimento da DM2, contribuindo, conseqüentemente, para a redução da morbi-mortalidade por doença cardiovascular.

Das três situações de Pré-diabetes, a AGJ é a menos prevalente e que confere menor risco de progressão para a DM2 e doença cardiovascular, em oposição à ATG (Gândara F. 2012).

Insulino-resistência e alterações da célula β na Diabetes tipo 2

Duas componentes são fundamentais para o desenvolvimento da DM2, alterações morfofuncionais da célula β pancreática e insulino-resistência.

A ação biológica da insulina depende da interação com o seu recetor, que tem como principal alvo o substrato do recetor da insulina, o IRS-1. A fosforilação dos resíduos de tirosina desta proteína inicia uma cascata de eventos que passam pela ativação de proteínas como a cinase PI3 (PI₃K) e a proteína cinase B (PKB/Akt), promovendo, desde logo, a translocação do transportador da glicose (GLUT4) para a membrana plasmática com o conseqüente aumento da captação de glicose em tecidos como o músculo ou o tecido adiposo (Fig. 1). A insulina, além de promover a captação, pelo adipócito, da glicose e dos ácidos gordos provenientes da degradação dos triglicéridos circulantes (ação da LPL) estimula a lipogénese e inibe a lipólise, como já referido. No fígado, a insulina tem importantes ações metabólicas como a inibição da produção hepática de glicose (inibição da glicogenólise e da gliconeogénese) e a estimulação da glicogénese mas não interfere na translocação do transportador para a membrana, pois este órgão tem GLUT2, um transportador de glicose de elevado Km e independente de insulina (Bugianesi et al, 2005; Wellen & Hotamisligil, 2005).

Nas situações de insulino-resistência não há captação muscular de glicose, a produção hepática de glicose não é inibida e, no adipócito, diminui a lipogénese e aumenta a lipólise.

A obesidade, frequentemente associada à disfunção do tecido adiposo, particularmente relacionada com um estado de inflamação de baixo grau, como já referido, constitui uma das principais causas de insulino-resistência (Ye J. 2009).

As moléculas derivadas do tecido adiposo patogénico, como a MCP-1, recrutam células imunitárias para o interior do tecido; o TNF- α e a IL-6, duas citocinas pró-inflamatórias envolvidas não só na inflamação mas também na expansão do tecido adiposo e na insulino-resistência, refletem a relação entre os processos metabólicos e imunitários. O crescimento excessivo do tecido adiposo, se não é acompanhado de neovascularização adequada, pode conduzir a regiões hipóxicas e perda da função normal do tecido adiposo. Este deixa de conseguir captar e armazenar todos os lípidos de que resulta um fluxo exagerado de ácidos gordos e acumulação de gordura em tecidos como o fígado ou o músculo (Yukun C. et al, 2013). Observa-se, também, uma alteração da produção de citocinas e adipocinas, nomeadamente, aumento do TNF- α , de leptina e da resistina, e diminuição da adiponectina (Krebs & Roden, 2005; Meier J. J, 2009). As alterações secretoras do tecido adiposo e o fluxo exagerado de ácidos gordos podem, então, induzir insulino-resistência (Guilherme A. et al, 2008).

A secreção de insulina é um fator determinante para o equilíbrio glicídico e depende da massa de células β e da capacidade secretora destas células. Em relação à função secretora parece haver alterações várias da célula β , desde a síntese até à exocitose de insulina, mas os estudos não são ainda concludentes, no que respeita aos mecanismos subjacentes. A massa de células β pode estar diminuída nomeadamente na sequência de deposição amiloide e apoptose das células β , ou ser geneticamente determinada (Seiça R., 1998).

As alterações da função e da massa de células β pancreáticas na diabetes tipo 2, tal como a insulino-resistência, tem subjacente processos primários e adquiridos. Destes últimos destaca-se a hiperglicemia e a dislipidemia como factores de agravamento das alterações da secreção e da ação da insulina. De fato, o aumento crónico da glicose e dos lípidos pode afetar a produção de insulina, afetando a função e o número de células β , e a sensibilidade dos tecidos insulino-dependentes à hormona (Baily CJ, et al, 2008).

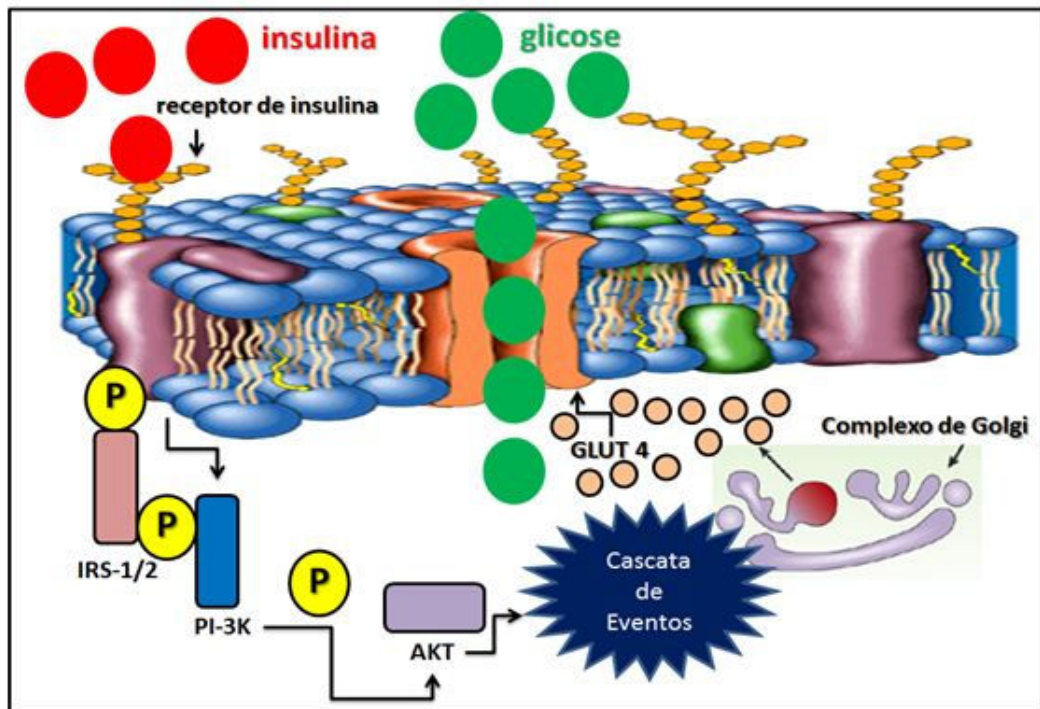


Figura 1: Via de sinalização da insulina na captação de glicose.

A ação biológica da insulina depende da interação com o seu recetor, tendo como principal alvo o substrato do recetor da insulina (IRS-1), cuja fosforilação (P) dos resíduos de tirosina inicia uma cascata de eventos que passam pela ativação da cinase PI_3 e da cinase B (Akt), promovendo logo a translocação do transportador da glicose (GLUT4) para a membrana plasmática e a consequente captação da glicose. IRS-1 – substrato do recetor da insulina; P – ião fosfato; PI_3K – cinase do PI_3 (fosfatidilinositol-3-fosfato); Akt – proteína cinase B (marcador da sinalização de insulina); GLUT4 – transportador de glicose 4; Figura adaptada de www.medicinenet.com.br

Cirurgia Bariátrica na obesidade e na diabetes tipo 2

A obesidade pode conduzir, como já foi referido, a diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares, entre outras situações. O seu impacto na sociedade, as repercussões na qualidade de vida e a diminuição do tempo de vida justificam os actuais critérios de intervenção cirúrgica para amenizar estes problemas. Atualmente, esta cirurgia é recomendada em doentes com:

- IMC > 40 Kg/m²
- IMC > 35 Kg/m² associado a hipertensão arterial, dislipidémia, diabetes tipo 2 e apneia do sono.

De fato, a cirurgia bariátrica ou metabólica é atualmente um método estabelecido de redução de peso corporal em indivíduos com obesidade. Também a diabetes tipo 2, especificamente quando aliada à obesidade, é alvo desta intervenção (AL-Suhaimi E. et al, 2013).

As principais técnicas cirúrgicas (Meijer R. et al, 2011), podem resumir-se em:

- **Cirurgias restritivas** caracterizadas pela redução do volume do estômago. (Ex. gastrectomia vertical ou *sleeve*)
- **Cirurgias de Má-absorção** que se fundamentam no princípio da deficiente absorção intestinal de nutrientes, resultante do procedimento cirúrgico de exclusão ou *bypass* de porções específicas do intestino delgado. Alguns exemplos são o *bypass* jejuno-íleo e a diversão biliopancreática.
- **Cirurgias mistas**, em que se combinam os dois procedimentos cirúrgicos anteriormente referidos. Um exemplo é a gastroplastia com desvio intestinal (Roux-en-Y gastric *bypass*).

Vários estudos mostram que a cirurgia bariátrica em indivíduos com obesidade e diabetes tipo 2 se associa a melhorias significativas do controlo glicémico. De facto, em 80% dos pacientes diabéticos operados deixou de ser necessária a terapêutica anti-diabética (Schutz R. et al, 2012).

Para além da redução do peso corporal e consequentemente da insulino-resistência, outros mecanismos ou fatores têm sido apontados para explicar a melhoria, rápida, do perfil glicídico nestes doentes, embora permaneçam por esclarecer os mecanismos subjacentes. Apontam-se como intervenientes algumas hormonas ou peptídeos digestivos. Destas hormonas/peptídeos destaca-se o *glucagon-like peptide 1* (GLP-1), o peptídeo YY e a grelina.

O **GLP-1** é uma das incretinas, por favorecer a secreção da insulina, para além de outros efeitos na célula β e também na célula α (Thomas R. et al, 2007; Ferrannini E. et al, 2009), efeitos diminuídos em doentes com diabetes tipo 2 (J.J. Meier et al, 2009). O GLP-1 é um peptídeo constituído por 30 a.a., maioritariamente produzido pelas células L da região distal do intestino delgado (Im GE. 2006). Tem a capacidade de melhorar o metabolismo da glicose através de uma variedade de ações (J. Ma et al, 2009). Melhora a biossíntese e a secreção da insulina e inibe a secreção do glucagon pelas células α pancreáticas (Johansson H-E, 2007; J. Ma et al, 2009; Irwin N., 2009). Em cultura de células e em roedores foi também demonstrado que promove a proliferação e a regeneração da célula β e diminui a apoptose destas células (Mousumi et al, 2009). Melhora ainda a sensibilidade à insulina, estimula o gasto energético e inibe o apetite, podendo conduzir à redução do tecido adiposo corporal.

Outros efeitos lhe são atribuídos, nomeadamente cardioprotetores, e ainda no ritmo de esvaziamento gástrico (Shultz R. et al, 2012).

O **peptídeo YY** é também sintetizado e segregado pelas células L intestinais. Está envolvido no controlo do apetite, tendo um provável efeito anorexigénico. A literatura refere também que atrasa o esvaziamento gástrico, diminui a motilidade gastrintestinal e inibe a produção de ácido gástrico e de enzimas pancreáticas (Shultz R. et al, 2012).

A **grelina** é um peptídeo formado por 28 aminoácidos predominantemente produzida por células especializadas das glândulas oxínticas gástricas. Aproximadamente 60%-70% dos níveis circulantes é segregada pelo estômago; ocorre alguma expressão noutros tecidos como sistema nervoso central, pulmões, rins, pâncreas, placenta e coração (Fruhbeck G., 2003).

Esta hormona desempenha um importante papel na sinalização dos centros hipotalâmicos que regulam a ingestão alimentar e o balanço energético. A grelina constitui o único peptídeo digestivo conhecido com acção orexigénica central.

Os níveis circulantes da grelina estão aumentados no jejum prolongado e em estados de hipoglicemia e a sua concentração diminui após as refeições ou administração intravenosa de glicose (Shin A. et al, 2010). Foi demonstrado que o tipo de nutrientes contidos na refeição, e não o seu volume, são os principais responsáveis pelas alterações pós-prandiais dos níveis plasmáticos de grelina; observa-se que a concentração plasmática diminui a seguir a refeições ricas em hidratos de carbono, concomitantemente à elevação da insulina plasmática (Shin A. et al, 2010).

No que diz respeito ao impacto do *sleeve* e do *bypass* gástrico nos peptídeos gastrintestinais, a literatura refere que, em consequência do rearranjo gástrico e intestinal, ocorre uma chegada muito mais rápida dos nutrientes ao intestino delgado, constituindo um estímulo imediato e potente para a produção dos peptídeos GLP-1 e do peptídeo YY (Laferrère B, 2008; N. Irwin, P.R. Flatt, 2009).

Também o êxito destes procedimentos cirúrgicos é reforçado pela exclusão de todo o fundo gástrico e, por conseguinte, das células produtoras de grelina (Shultz R. et al, 2012), com a consequente diminuição deste peptídeo gástrico.

Estes efeitos, aliados à redução do peso corporal ou da massa adiposa, poderão reduzir a insulino-resistência e melhorar a função e a massa celular β e daí melhoria do perfil metabólico na diabetes tipo 2.

Objetivos e Plano do trabalho

A investigação em ratos obesos e diabéticos tipo 2 refere que a cirurgia bariátrica melhora o controlo glicémico. No entanto, os efeitos específicos e os mecanismos subjacentes ainda não estão totalmente esclarecidos.

Deste modo, o presente trabalho de investigação teve como objetivo principal, avaliar o impacto da cirurgia bariátrica, tentando encontrar algumas diferenças entre a gastrectomia vertical (*sleeve* gástrico) e o *bypass* gástrico no perfil metabólico, na insulino-resistência periférica e no tecido adiposo visceral epididimal, de um modelo animal de diabetes tipo 2 não obesa, os ratos Goto-Kakizaki (GK).

A escolha de um modelo animal de diabetes tipo 2 não obesa foi baseada no fato de se pretender avaliar os efeitos da cirurgia na situação diabética, de forma independente da obesidade.

Para o efeito fomos determinar:

1. o peso corporal e os níveis sanguíneos de glicose, colesterol total e triglicérides em jejum, antes e um mês após a cirurgia bariátrica;
2. os níveis de HbA1c e os índices de insulino-resistência e de insulino sensibilidade, um mês após a cirurgia;
3. os níveis de AMPK (marcador energético), Akt (marcador da sinalização de insulina) e o rácio Bcl-2/Bax (marcador de apoptose) no tecido adiposo visceral epididimal, um mês após a intervenção cirúrgica.

Métodos

Animais e tratamentos

No presente trabalho foram utilizadas duas estirpes de animais, ratos Goto-Kakizaki (GK), ratos não obesos com diabetes tipo 2 espontânea, e ratos Wistar (W) normais, provenientes da colônia de Coimbra - Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Os ratos foram mantidos num ambiente apropriadamente ventilado, com ciclos alternados de 12h de luz/12h de obscuridade e humidade (50-60%) e temperatura (22-24°C) controladas. Todos os animais tiveram livre acesso a água e ração (dieta AO4-Panlab, Charles River, França) e, durante pelo menos cinco dias após a cirurgia, a dieta líquida – suplemento oral completo (FortiCare, Nutricia, The Netherlands), administrado por sonda.

Os animais de ambos os modelos, machos com 12 a 14 semanas de vida, foram divididos em seis grupos (n = 6 - 11 animais em cada grupo):

1. Dois grupos de ratos controlo, ratos Wistar (W) e ratos GK (GK).
2. Dois grupos de ratos submetidos a incisão da parede do abdómen seguida de sutura, ratos Wistar *sham* (Wsh) e ratos GK *sham* (GKsh).
3. Dois grupos de ratos GK sujeitos a cirurgia, um a *sleeve* gástrico ou gastrectomia vertical (GKSl) e outro a *bypass* gástrico (GKBp).

Peso corporal e determinação de parâmetros sistémicos

O peso corporal (expresso em gramas) foi determinado em jejum (de 16-18h) imediatamente antes da cirurgia e um mês após a intervenção cirúrgica. Foram determinados no sangue da veia cauda, nestes mesmos períodos:

- a) Os níveis de glicose, pelo método da glicose-oxidase, fazendo uso de um glicómetro (Glucometer Elite – Bayer SA, Portugal) e tiras teste compatíveis.
- b) Os níveis de hemoglobina A1c, triglicérideos e colesterol total, usando analisadores automáticos, DCA 2000 Analyser, Siemens AG, Germany para a hemoglobina A1c e, para os triglicérideos e o colesterol, o Accutrend GCI, Roche Diagnostics, F. Hoffmann-Lar Roche Ltd, Switzerland.

Colheitas de tecido adiposo e sangue

Um mês após as cirurgias, o sangue foi colhido por punção cardíaca e o plasma foi separado e armazenado a -80°C para a determinação da insulinemia. Para tal os animais foram anestesiados com cloridrato de quetamina (75mg/Kg) e cloridrato de clorpromazina (3mg/Kg), por via intramuscular.

Após o sacrifício dos animais, foi retirada uma pequena porção de tecido adiposo visceral epididimal seguido de lavagem numa solução isotónica ($0,1\%$ NaCl). As amostras do tecido foram imediatamente congeladas em azoto líquido e posteriormente armazenadas a -80°C .

Insulina e índices de resistência e sensibilidade à insulina

A insulinemia em jejum foi determinada no plasma, por técnica de ELISA, utilizando o Rat Insulin ELISA Kit (Mercodia, Suécia).

Com base nos níveis sanguíneos em jejum de insulina (I_0) e glicose (G_0), foram calculados os índices de insulino-resistência HOMA (*homeostase model assesment*) e de sensibilidade à insulina QUICK (*quantitative insulin sensivity check index*).

O HOMA foi calculado pela fórmula $[(I_0) * (G_0)] / 22,5$. O G_0 corresponde à glicemia em jejum (mmol/L) e I_0 é a insulinemia em jejum (uU/mL).

O QUICK pela fórmula $1 / [\log(G_0) + \log(I_0)]$. G_0 corresponde à glicemia em jejum (mg/dL) e I_0 é a insulinemia em jejum (uU/mL).

Homogeneização do tecido adiposo epididimal

Seccionaram-se porções de tecido adiposo epididimal com cerca de 200mg que foram homogeneizadas em 2ml de tampão de homogeneização (Tabela I). Procedeu-se à respetiva centrifugação a 14000 xg , à temperatura de 4°C , durante 20 minutos com recolha dos sobrenadantes para outros tubos. Repetiu-se a centrifugação desses sobrenadantes durante 15 minutos. Os sobrenadantes finais foram recolhidos para novos tubos e determinou-se a concentração de proteína pelo método BCA. Este é um método espectrofotométrico para a determinação da quantidade de proteína dos tecidos homogeneizados. Utilizando a albumina sérica bovina (BSA), numa concentração

conhecida, obteve-se uma curva de calibração. Por fim, as amostras foram aliqüotadas e guardadas a -80°C para futura análise.

Deteção de proteínas por *Western Blot*

A identificação e quantificação dos níveis de AMPK (marcador/sensor energético celular) e Akt (marcador de sinalização intracelular de insulina), Bcl-2 (marcador anti-apoptótico) e Bax (marcador apoptótico) no tecido adiposo foram efectuadas por *Western Blot*. O sistema de polimerização de géis foi montado e os tampões *Resolving* e *Stacking* foram adicionados (Tabela I). Durante o tempo de polimerização dos géis, prepararam-se as amostras com volumes correspondentes a 40 ug de proteína e volumes iguais de tampão *Sample 2x* (Tabela I). De seguida, as amostras foram fervidas durante 2 minutos e posteriormente colocadas em gelo. Os géis polimerizados foram colocados no sistema de corrida com tampão *Running* (Tabela I) e procedeu-se à disposição das amostras e padrão (*Precision PlusStandards, Dual Color, Bio-Rad, EUA*) segundo a ordem desejada. Terminada a corrida (voltagem constante de 160 V), os géis foram colocados em contacto directo com membranas de PVDF (Membrana de fluoreto de polivinilideno, Bio-Rad, EUA) previamente ativadas. O sistema de transferência foi montado de acordo com as instruções e a reacção ocorreu a intensidade constante de 200 mA, em tampão CAPS (Tabela I). Concluída a transferência, as membranas foram imediatamente bloqueadas com solução de TBST - BSA 5% (Tabela I) à temperatura ambiente. Duas horas depois, efectuou-se uma lavagem rápida seguida de 3 lavagens de 10 minutos com solução de TBST. Em seguida, incubaram-se as membranas, durante a noite, a 4 °C sob agitação constante, com os anticorpos primários para a AMPK (*Cell Signaling, E.U.A*), a Akt (*Cell Signaling, E.U.A*), a Bcl-2 (*Santa Cruz Biotechnology, E.U.A*) e a Bax (*Santa Cruz Biotechnology, E.U.A*). No dia seguinte, efectuaram-se lavagens, tal como descrito anteriormente, e incubaram-se as membranas com o anticorpo secundário, anticorpo Anti-mouse (Amersham, EUA), sob agitação constante e à temperatura ambiente, durante cerca de 2 horas. Depois deste período de tempo, as lavagens foram repetidas, como acima referido. As membranas foram, depois, incubadas com substrato enzimático (*Rabbit ECF Western Blotting Reagent Pack, Amersham Biosciences, Reino*

Unido) durante aproximadamente 2 minutos e reveladas por leitor de fluorescência (Typhoon FLA 9000, Suécia).

Tabela 1: Tampões utilizados na homogeneização e na técnica de Western Blot

Tampão de Homogeneização	25mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 10 mM PMSF, 40µg/g tecidos de <i>cocktail</i> inibidor de proteases (Sigma, EUA), pH= 7,7
Tampão <i>Resolving</i>	0,75M Tris-HCl; 0,2% SDS; pH 8,8
Tampão <i>Stacking</i>	0,25M Tris- HCl; 0,2% SDS; pH 6,8
Tampão <i>Sample</i> (2x)	62,5mM Tris-HCL; pH 6,8; 20% SDS 10%; 25% glycerol; 2% Bromefenol blue 0,5%; pH 6,8
Tampão <i>Running</i>	125mM Tris-Base; 480mM Glicina; 9mM SDS; pH 8,8
Tampão CAPS	50mM CAPS; 2%NaOH; pH 11; 10% methanol
Tampão TBS	250mM Tris; 1,5 mM NaCl; pH 7,6
Tampão TBST	Solução de TBS + 1 % Tween-20

Análise estatística

Os resultados são apresentados como média \pm e.p.m. Foi utilizado o teste *One Way ANOVA* na comparação dos diferentes grupos de estudo.

Na comparação entre os dois períodos, antes e após tratamento, foi aplicado o teste *t Student* para amostras emparelhadas. Foi considerado um valor de $P < 0,05$ como diferença estatisticamente significativa.

Resultados

Ingestão de alimentos, peso corporal e níveis sanguíneos de glicose, triglicerídeos e colesterol

Em relação à ingestão de alimentos, não observámos diferenças significativas entre os diferentes grupos durante o período de estudo (resultados não apresentados).

No que diz respeito à variação de peso, observámos um aumento do peso nos ratos W e GK controlo (com valores de $P < 0,05$) (tabela 2) e nos ratos Wsh e GKsh (com valores de $P < 0,001$ e $P < 0,05$, respectivamente) (tabela 3) o que não é observado nos animais submetidos a cirurgia bariátrica, *sleeve* gástrico e *bypass* gástrico (tabela 4).

Não foram observadas alterações da glicemia em jejum entre o pré e o pós-operatório, nos diferentes grupos estudados, com exceção do grupo Wsh ($P < 0,05$) (tabelas 2, 3, 4).

Em relação ao perfil lipídico, a comparação dos resultados antes e após intervenção cirúrgica, mostra que o grupo sujeito ao *bypass* gástrico (GKBp) apresenta valores significativamente inferiores de colesterol total ($P < 0,01$) e triglicerídeos ($P < 0,05$) um mês após a cirurgia (Tabela 4). Para os outros grupos em estudo não se verificaram alterações relevantes nestes parâmetros (Tabelas 2, 3, 4).

Tabela 2: Peso corporal e valores sanguíneos em jejum de glicose, colesterol e triglicerídeos dos ratos Wistar e GK (controlo), antes e após tratamento.

Parâmetro	W antes	W após	GK Antes	GK Após
Peso corporal (g)	328±12	379±13 £	256±9	313±10 \$
Glicemia (mg/dL)	78±2	75±2	96±7	102±5
Colesterol (mg/dL)	161±2,05	163±1,23	159±1,59	164±1,39
Triglicerídeos (mg/dL)	123±5,45	115±4,99	128±11,20	117±6,08

W – ratos Wistar; GK – ratos Goto-kakizaki.

Resultados apresentados como média ± e.p.m.; n = 6 – 11 animais em cada grupo;

£ $P < 0,05$ vs W antes; \$ $P < 0,05$ vs GK antes; (teste *t Student* para amostras emparelhadas).

Tabela 3: Peso corporal e valores sanguíneos em jejum de glicose, colesterol e triglicerídeos dos ratos Wistar e GK sham, antes e após tratamento.

Parâmetro	Wsh antes	Wsh após	GKsh Antes	GKsh Após
Peso corporal (g)	349±8	411±6 μμμ	270±13	320±7 A
Glicemia (mg/dL)	81±4	71±3 μ	110±11	108±5
Colesterol (mg/dL)	164±1,36	164±1,24	164±1,20	162±1,52
Triglicerídeos (mg/dL)	119±7,59	124±11,26	142±18,27	116±11,95

Wsh – ratos Wistar *sham*; GKsh – ratos Goto-kakizaki *sham*.

Resultados apresentados como média ± e.p.m.; n = 6 – 11 animais em cada grupo;

μ P < 0,05; μμμ P < 0,001 vs Wsh antes; α P < 0,05 vs GKsh antes; (teste *t Student* para amostras emparelhadas).

Tabela 4: Peso corporal e valores sanguíneos em jejum de glicose, colesterol e triglicerídeos dos ratos sujeitos a cirurgia bariátrica, antes e após tratamento

Parâmetro	GKSI antes	GKSI após	GKBp antes	GKBp após
Peso corporal (g)	277±7	312±10	284±9	306±12
Glicemia (mg/dL)	98±8	111±2	117±14	129±9
Colesterol (mg/dL)	161±1,36	159±1,50	163±1,88	156±1,07 ¥¥
Triglicerídeos (mg/dL)	134±6,86	106±7,11	123±4,17	99±8,20 ¥

GKSI – ratos Goto-kakizaki submetidos a *sleeve* gástrico; GKBp – ratos Goto-kakizaki submetidos a *bypass* gástrico. Resultados apresentados como média ± e.p.m.; n = 6 – 11 animais em cada grupo; ¥ P < 0,05; ¥¥ P < 0,01 vs GKBp antes; (teste *t Student* para amostras emparelhadas)

Após o período de tratamento, os ratos GK diabéticos (grupo GK) apresentaram valores de peso corporal inferiores aos ratos Wistar (grupo W) e glicemia em jejum mais elevada, tal como os ratos GKsh em relação aos ratos Wsh. O grupo de ratos GK submetido a *bypass* gástrico (GKBp) apresentou, após o tratamento, níveis mais altos de glicemia em jejum, quando comparado com o grupo GK controlo (tabela 5).

Não foram observadas diferenças significativas do colesterol total e dos triglicéridos entre os diferentes grupos (tabela 5).

Tabela 5: Peso corporal e valores sanguíneos em jejum de glicose, colesterol e triglicéridos após tratamento.

Parâmetro	W	GK	Wsh	GKsh	GKSI	GKBp
Peso corporal (g)	379±13	313±10 ***	411±6	320±7	312±10	306±12
Glicemia (mg/dL)	75±2	102±5 *	71±3	108±5 δ	111±6	129±9 #
Colesterol (mg/dL)	163±1,23	164±1,39	164±1,24	162±1,52	159±1,50	156±1,07
Triglicéridos (mg/dL)	115±4,99	117±6,08	124±11,26	116±11,95	106±7,11	99±8,20

W – ratos Wistar; Wsh – ratos Wistar *sham*; GK – ratos Goto-kakizaki; GKsh – ratos Goto-kakizaki *sham*; GKSI – ratos Goto-kakizaki submetidos a *sleeve* gástrico; GKBp – ratos Goto-kakizaki submetidos a *bypass* gástrico.

Resultados apresentados como média ± e.p.m.; n = 6 – 11 animais em cada grupo;

* P < 0,05; *** P < 0,001 vs W; δ P < 0,05 vs Wsh; # P < 0,05 vs GK; (teste *One Way* ANOVA).

Hemoglobina Glicada (HbA1c)

Comparando os valores antes e pós tratamento cirúrgico, verificámos que os valores da hemoglobina glicada diminuíram significativamente ($P < 0,05$) nos ratos GK submetidos a cirurgia bariátrica, *sleeve* gástrico (GKSl) e *bypass* gástrico (GKBp), o que não se verificou nos ratos GK e GKsh (Fig. 2). No grupo W registou-se, curiosamente, uma diminuição significativa dos valores de HbA1c do pré para o pós-operatório ($P < 0,05$) (Fig. 2).

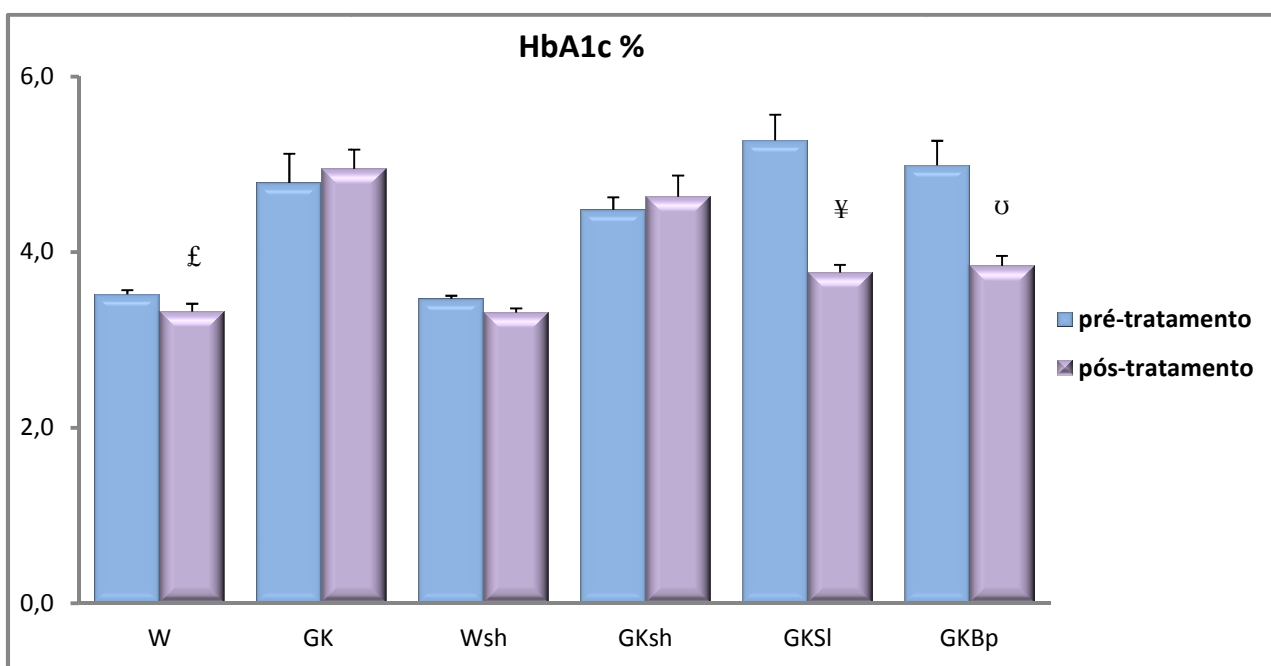


Figura 2: Hemoglobina glicada (HbA1c) antes e após o tratamento

W - ratos Wistar, Wsh – ratos Wistar *sham*, GK – ratos Goto-kakizaki, GKsh – ratos Goto-kakizaki *sham*, GKSl – ratos Goto-kakizaki submetidos a *sleeve* gástrico; GKBp – ratos Goto-kakizaki submetidos a *bypass* gástrico.

Resultados apresentados como média \pm e.p.m.; $n = 6 - 11$ animais em cada grupo; £ $P < 0,05$ vs W antes; ¥ $P < 0,05$ vs GKSl antes; 0 $P < 0,05$ vs GKBp antes; (teste *t Student* para amostras emparelhadas).

Um mês após a intervenção cirúrgica observámos nos ratos GK e GKsh valores significativamente superiores de HbA1c quando comparados com os grupos W e Wsh, respetivamente. Nos grupos submetidos a cirurgia bariátrica, os valores de hemoglobina glicada foram inferiores aos seus grupos controlo, GK ($P < 0,001$) e GKsh ($P < 0,01$), e similares aos ratos Wistar (W e Wsh) (Fig. 3).

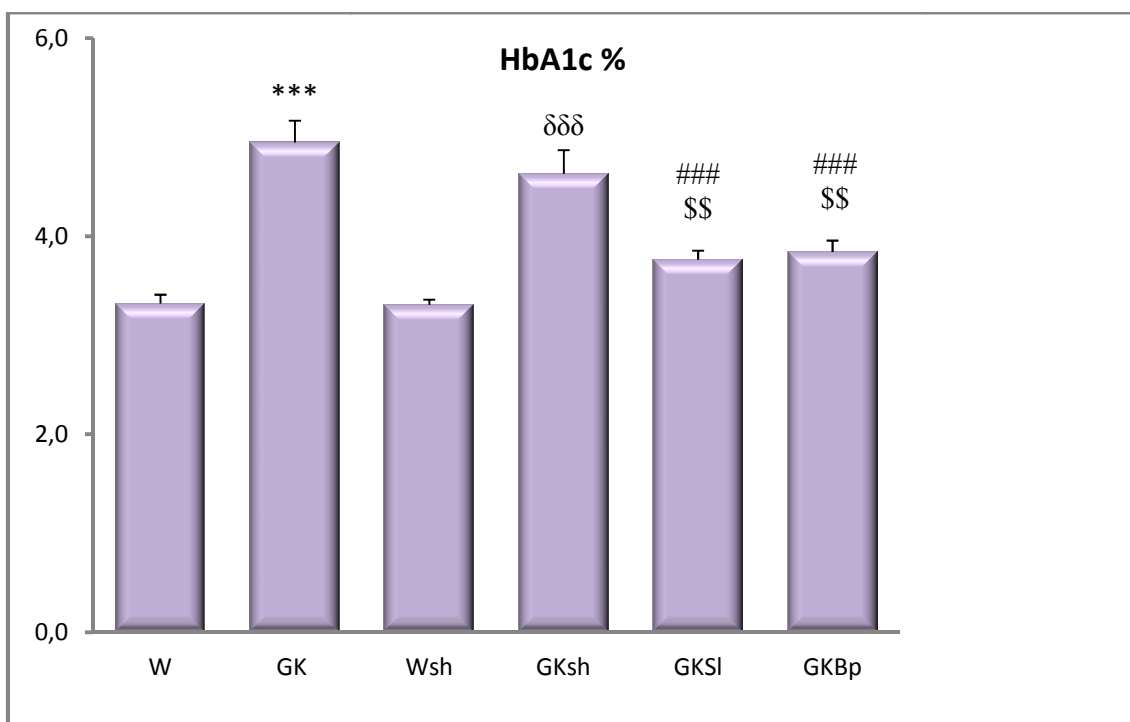


Figura 3: Hemoglobina glicada (HbA1c) após tratamento

W – ratos Wistar; Wsh – ratos Wistar *sham*; GK – ratos Goto-kakizaki; GKsh – ratos Goto-kakizaki *sham*; GKSl – ratos Goto-kakizaki submetidos a *sleeve* gástrico, GKBp – ratos Goto-kakizaki submetidos a *Bypass* gástrico.

Resultados apresentados como média ± e.p.m.; n = 6 – 11 em cada grupo;

*** $P < 0,001$ vs W; δδδ $P < 0,001$ vs Wsh; \$\$ $P < 0,01$ vs GKsh; \$\$\$ $P < 0,001$ vs GK; (teste *One Way* ANOVA).

Índices de insulino-resistência e de sensibilidade à insulina

Os ratos GK mostraram valores do índice de insulino-resistência (HOMA) significativamente superiores aos dos ratos W ($P < 0,05$) e inferiores aos dos ratos GKsh (Fig. 4). O índice de sensibilidade à insulina (QUICK) foi inferior no grupo GK relativamente ao dos ratos W e superior ao dos ratos GKsh (Fig. 5).

Os grupos submetidos a cirurgia bariátrica, GKSI e GKBp, apresentaram uma redução significativa do índice de insulino-resistência ($P < 0,05$) (Fig. 4) e um aumento do índice de sensibilidade à insulina ($P < 0,05$) relativamente ao grupo GKsh (Fig. 5).

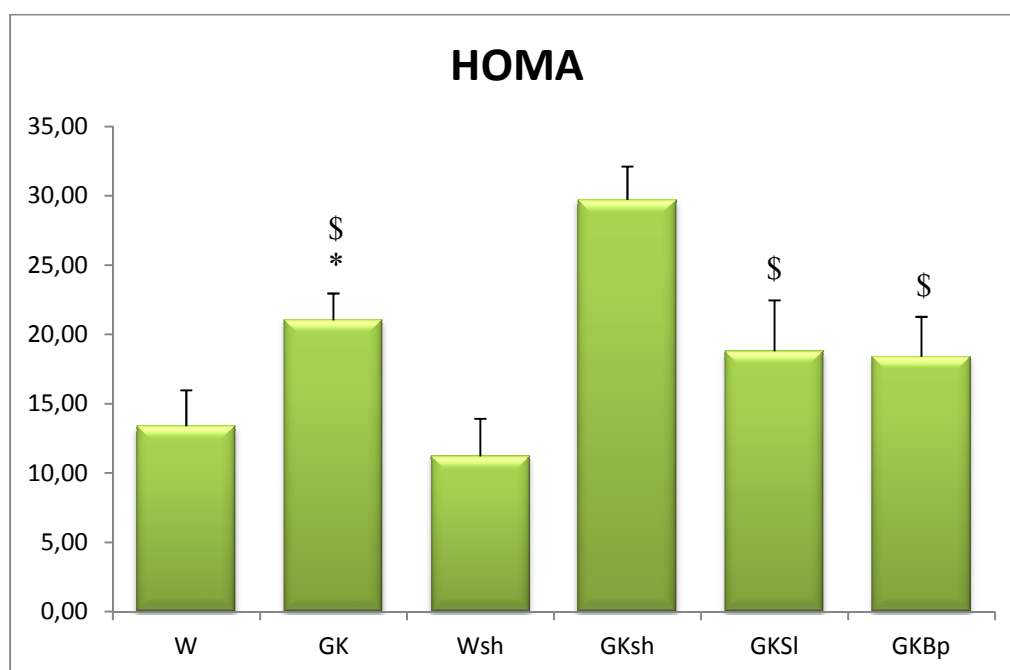


Figura 4: Índice de insulino-resistência HOMA, após tratamento.

W – ratos Wistar; Wsh – ratos Wistar *sham*; GK – ratos Goto-kakizaki; GKsh – ratos Goto-kakizaki *sham*; GKSI – ratos Goto-kakizaki submetidos a *sleeve* gástrico; GKBp – ratos Goto-kakizaki submetidos a *Bypass* gástrico.

O HOMA foi calculado pela fórmula $[(I_0) * (G_0)] / 22,5$. G_0 corresponde à glicemia em jejum (mmol/L) e I_0 é a insulinemia em jejum (uU/mL).

Resultados apresentados como média ± e.p.m. n = 6 – 8 animais em cada grupo;

* $P < 0,05$ vs Wistar; \$ $P < 0,05$ vs GKsh; (teste *One Way* ANOVA).

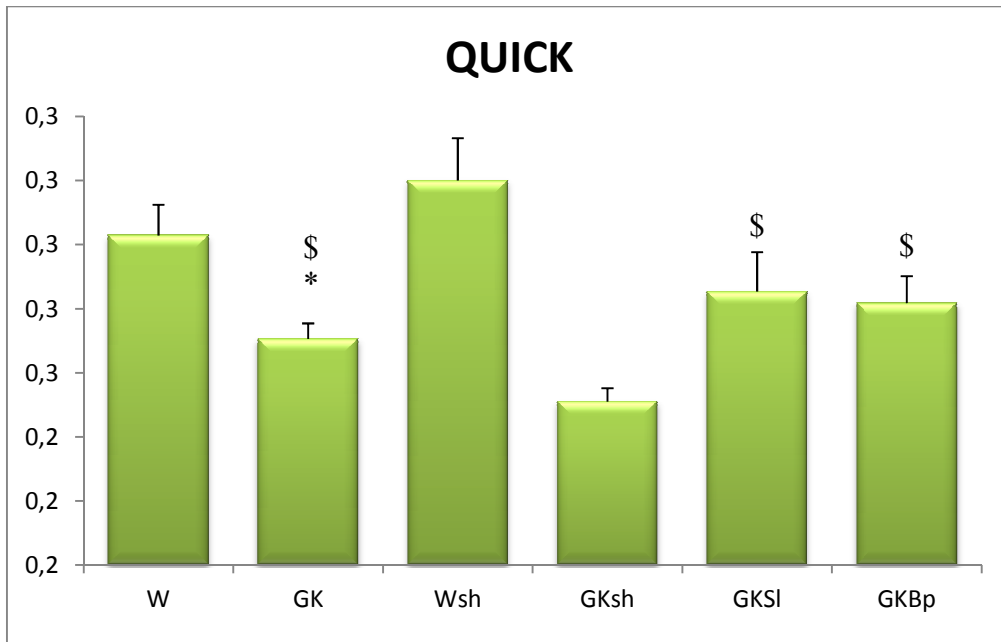


Figura 5: Índice de sensibilidade à insulina QUICK, após tratamento.

W – ratos Wistar; Wsh – ratos Wistar *sham*; GK – ratos Goto-kakizaki; GKsh – ratos Goto-kakizaki *sham*; GKSI – ratos Goto-kakizaki submetidos a *sleeve* gástrico; GKBp – ratos Goto-kakizaki submetidos a *Bypass* gástrico.

O QUICK foi calculado pela fórmula $1 / [\log(G_0) + \log(I_0)]$. G_0 corresponde à glicemia em jejum (mg/ dL) e I_0 é a insulinemia em jejum (uU/mL).

Resultados apresentados como média ± e.p.m.; n = 6 – 8 animais em cada grupo;

* $P < 0,05$ vs W; \$ $P < 0,05$ vs GKsh; (teste *One Way* ANOVA).

Parâmetros no tecido adiposo

Avaliámos, em seguida, alguns parâmetros no tecido adiposo epididimal (visceral) dos diferentes grupos estudados.

No que diz respeito à quantificação da cinase sensível ao aumento intracelular de AMP (AMPK), que funciona como marcador energético, observámos um aumento significativo da sua expressão nos grupos submetidos a ambas as técnicas de cirurgia bariátrica, *sleeve* gástrico ($P < 0,05$) e *bypass* gástrico ($P < 0,05$) relativamente ao grupo GK e ao grupo GKsh e uma redução no grupo GK *sham* relativamente ao grupo de ratos W (Fig. 6).

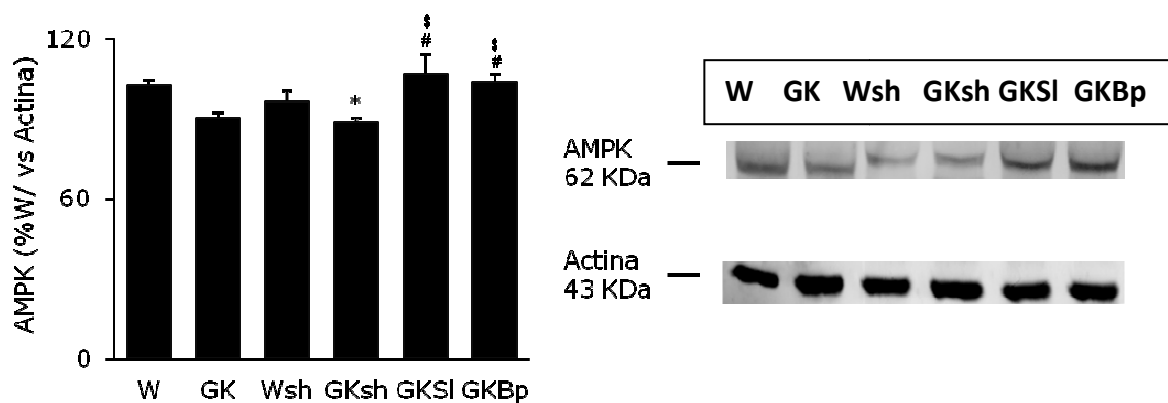


Figura 6: Quantificação por Western Blotting da cinase ativada por AMP (AMPK).

W – ratos Wistar; Wsh – ratos Wistar *sham*; GK – ratos Goto-kakizaki; GKsh – ratos Goto-kakizaki *sham*, GKSI – ratos Goto-kakizaki submetidos a *sleeve* gástrico, GKBp – ratos Goto-kakizaki submetidos a *bypass* gástrico.

Resultados apresentados como média \pm e.p.m.; $n = 6 - 11$ animais em cada grupo;

* $P < 0,05$ vs W; \$ $P < 0,05$ vs GKsh; # $P < 0,05$ vs GK; (teste *One Way* ANOVA).

A cinase envolvida na sinalização da insulina, Akt, apresentou menor expressão no grupo GKsh ($P < 0,05$) em comparação com o grupo W. Contrariamente, observou-se um aumento significativo da sua expressão, após *bypass* gástrico ($P < 0,05$) em relação ao grupo GKsh (Fig. 7).

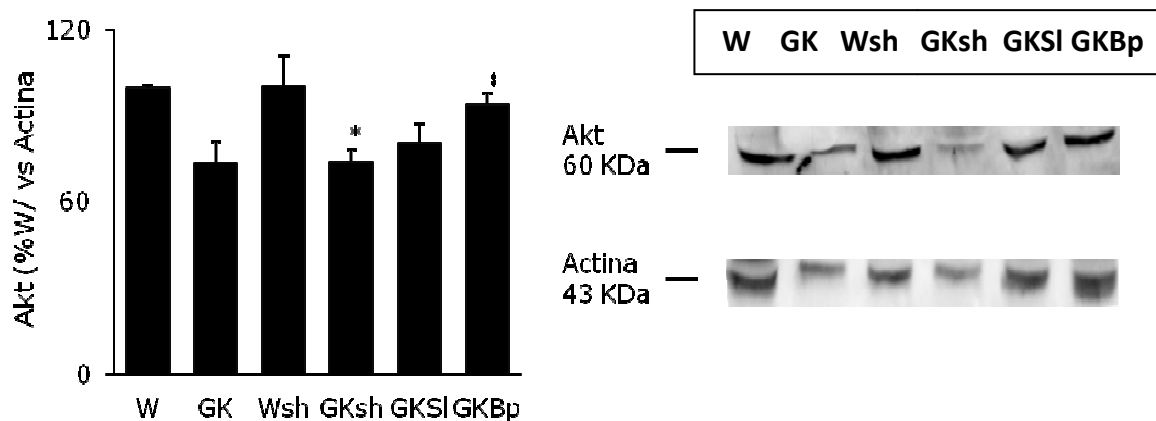


Figura 7: Quantificação por Western Blotting da cinase Akt.

W – ratos Wistar; Wsh – ratos Wistar *sham*; GK – ratos Goto-kakizaki; GKsh – ratos Goto-kakizaki *sham*, GKS1 – ratos Goto-kakizaki submetidos a *sleeve* gástrico, GKBp – ratos Goto-kakizaki submetidos a *bypass* gástrico.

Resultados apresentados como média \pm e.p.m.; n = 6 – 11 animais em cada grupo;

* P < 0,05 vs W; $\$$ P < 0,05 vs GKsh; (teste *One Way* ANOVA).

O rácio Bcl-2/Bax é um marcador anti-apoptótico, uma vez que a proteína Bcl-2 está envolvida na inibição da cascata apoptótica, enquanto a Bax a ativa. O grupo GK e o grupo GKsh apresentaram valores significativamente inferiores do rácio, respectivamente P < 0,01 e P < 0,05, em comparação com o grupo W (Fig. 8).

Nos grupos submetidos às cirurgias metabólicas foi observado um perfil oposto: o grupo GKS1 e o grupo GKBp apresentaram um aumento significativo relativamente ao grupo GK (P < 0,01) e ao grupo GKsh (P < 0,05) (Fig. 8).

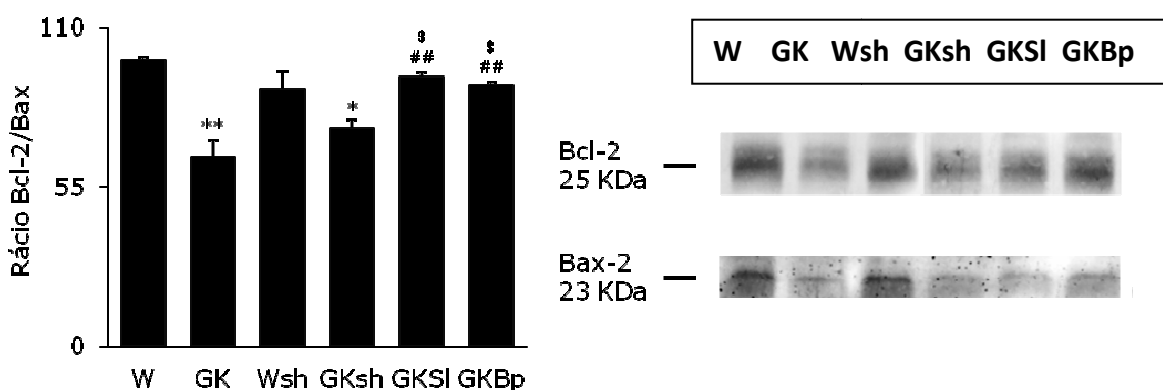


Figura 8: Quantificação por Western Blotting do marcador anti-apoptótico, o rácio Bcl-2/Bax.

W – ratos Wistar; Wsh – ratos Wistar *sham*; GK – ratos Goto-kakizaki; GKsh – ratos Goto-kakizaki *sham*; GKS1 – ratos Goto-kakizaki submetido a *sleeve* gástrico, GKBp – ratos Goto-kakizaki submetido a *bypass* gástrico.

Resultados apresentados como média \pm e.p.m.; n = 6 – 11 animais em cada grupo;

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ vs W; \$ $P < 0,05$ vs GKsh; ## $P < 0,01$ vs GK; (teste *One Way* ANOVA).

Discussão e Conclusões

Os ratos GK são um modelo de diabetes tipo 2 espontânea, não obesa, fenotipicamente selecionado a partir de ratos Wistar, tendo como critério a glicemia 2 horas após a administração de glicose. Os ratos GK da nossa colônia são caracterizados por insulino-resistência periférica e hepática e alterações da secreção de insulina e da massa de células β , um fenótipo característico da diabetes tipo 2 (Seiça et al, 2003; Seiça et al, 2004; Matafome 2012). Têm uma intrínseca intolerância a glicose desde a primeira semana de vida e hiperglicemia moderada em jejum após as 4 semanas de vida, desenvolvendo numa fase mais tardia de evolução da doença, alterações dos parâmetros lipídicos, que se traduzem por maiores níveis sanguíneos de ácidos gordos livres, colesterol e triglicéridos (Seiça et al, 2003; Matafome 2012). Em relação à quantificação da hemoglobina glicada, a HbA1c, que reflecte a ocorrência de fenómenos de hiperglicemia durante os três meses anteriores (e indiretamente a glicação), os ratos GK têm também níveis superiores de HbA1c.

Os nossos resultados confirmam que os ratos diabéticos apresentam peso corporal inferior aos ratos Wistar e valores superiores da glicemia em jejum e da hemoglobina glicada (HbA1c) a que se associam alterações dos índices de insulino-resistência e insulino-sensibilidade.

A alteração dos hábitos alimentares e o estilo de vida sedentário podem conduzir a desequilíbrios do balanço energético e a alterações metabólicas graves. O número de indivíduos com excesso de peso e obesidade tem aumentado de forma dramática, particularmente nos países desenvolvidos; o aumento do peso corporal associa-se a inflamação, insulino-resistência e alterações da produção de citocinas e adipocitocinas e constitui um fator de risco para o desenvolvimento de diabetes tipo 2. A cirurgia bariátrica é hoje uma medida terapêutica na obesidade, mas também na diabetes tipo 2 com IMC ≥ 35 . Doentes diabéticos tipo 2 submetidos a cirurgia metabólica melhoram rapidamente o seu perfil glicémico e estudos vários sugerem não ser apenas uma consequência da redução de peso.

De facto, outros mecanismos, já apresentados na introdução deste trabalho, poderão explicar a melhoria do perfil metabólico dos doentes e a diminuição da insulino-resistência, nomeadamente o aumento da secreção de algumas hormonas ou peptídeos intestinais, e o próprio rearranjo intestinal (Jin M. et al, 2009). Recentemente, Shutz R. et al. (2012) defendeu que uma das consequências do rearranjo intestinal nestas cirurgias é o aumento dos níveis da incretina GLP-1, responsável pela melhoria da função da célula β ou seja da produção de insulina. Também o contacto mais

rápido/precoce dos alimentos com a mucosa intestinal poderá estimular os referidos sinais hormonais que interferem com o metabolismo da glicose, nomeadamente através da produção e da ação da insulina (Jin M. et al, 2009). De facto, vários estudos sugerem que o aparelho digestivo por si só, nomeadamente o estômago e o intestino delgado, é fundamental para os efeitos benéficos apresentados. Desempenha um papel central na homeostase energética, uma vez que age como um verdadeiro órgão endócrino produtor dos peptídeos já mencionados, como o GLP-1, o peptídeo YY e a grelina. Mais ainda, controla e regula o esvaziamento e a motilidade gástrica que influenciam indiretamente a produção de insulina, pois o tempo e a velocidade de chegada dos nutrientes ao duodeno determinam o nível de glicose e a consequente secreção da insulina (J.J. Meier et al, 2009).

Comparando as variações de peso ao longo do tempo de estudo, observámos um aumento do peso nos ratos Wistar e GK, controlo e *sham* que não observámos nos grupos submetidos a cirurgia metabólica, *sleeve* e *bypass* gástrico, embora a ingestão de alimentos tivesse sido similar. A glicemia em jejum não sofreu alterações com as cirurgias, mas a HbA1c melhorou com o tratamento cirúrgico tal como os índices de insulino-resistência (HOMA) e insulino-sensibilidade (QUICK). Não observámos alterações dos níveis sanguíneos de colesterol total e triglicéridos nos ratos GK, comparativamente aos ratos Wistar mas, após o *bypass* gástrico, foram significativamente inferiores os níveis destes parâmetros.

Os nossos resultados confirmam, assim, os efeitos benéficos destas cirurgias na diabetes tipo 2, especificamente na resistência à insulina e consequentemente no controlo metabólico. Por este facto, pretendemos depois saber as implicações no tecido adiposo visceral, um dos tecidos particularmente envolvidos na resistência à insulina.

Para avaliar o efeito da cirurgia bariátrica no tecido adiposo visceral, quantificámos a Akt, a AMPK, a Bcl-2 e a Bax, que desempenham um papel central em múltiplos processos celulares como metabolismo da glicose, apoptose e proliferação celular (J.J. Meier et al, 2009). Observámos um aumento dos níveis do marcador energético AMPK e do rácio Bcl-2/Bax nos grupos submetidos aos dois tipos de técnicas cirúrgicas e, somente no grupo submetido a *bypass* gástrico, um aumento da Akt.

A Akt está envolvida na sinalização da insulina e na sobrevivência celular e tem sido associada à estimulação da síntese proteica e à inibição da apoptose. A ativação desta enzima reflete a sensibilidade à insulina (Emanuelli et al, 2001; Ueki et al, 2005;

Galic *et al*, 2010; Hauner, 2010). O aumento significativo da sua expressão no tecido adiposo dos ratos submetidos ao *bypass* gástrico poderá traduzir uma maior sensibilidade à ação da insulina após este tipo de intervenção, estando de acordo com os trabalhos de Shu-Qiang Li (2011) que demonstrou um aumento da expressão de IRS-1 no músculo-esquelético e no tecido adiposo de ratos GK submetidos a *Roux-en-Y gastric bypass*.

A AMPK é uma proteína quinase que age como um sensor do estado energético celular. Quando as concentrações intracelulares de ATP diminuem, a AMPK é ativada, estimulando a geração de ATP e inibindo o consumo deste. Ao nível das células β pancreáticas pensa-se que desempenha uma função importante na regulação da secreção de insulina e na proteção contra a apoptose mediada por citocinas (Viollet B. *et al*, 2009). No adipócito, sabe-se que promove a captação e a oxidação da glicose e dos lípidos (Yamauchi *et al*, 2003; Lorincz and Sukumar, 2006; Pais *et al*, 2009; Matafome 2012). A sua ativação estimula o transporte de glicose por um mecanismo independente de insulina; requer a ativação da Akt e a translocação do GLUT4 para a membrana celular (Yamauchi *et al*, 2003; Bugianesi *et al* 2005; Matafome, 2012). Mais ainda, a introdução de uma forma não funcional da AMPK inibe o bloqueio das enzimas gliconeogénicas, o que mostra o papel fundamental da AMPK em suprimir a gliconeogénese (Matafome 2007). O seu aumento no tecido adiposo dos animais cirurgicamente intervencionados (*sleeve e bypass*), poderá relacionar-se também com a melhoria da ação da insulina neste tecido e, conseqüentemente, com a melhoria do controlo glicémico e da insulino-resistência.

Os efeitos benéficos da cirurgia da obesidade são reforçados no marcador anti-apoptótico, o rácio Bcl-2/Bax. É visível o seu aumento no tecido adiposo dos ratos GK submetidos a ambas as cirurgias, relativamente aos grupos GK e GK *sham*, sugerindo diminuição dos processos apoptóticos locais, nos animais intervencionados.

Numa perspetiva global do nosso trabalho, sugerimos que a cirurgia metabólica poderá restabelecer os efeitos da insulina no tecido adiposo ou seja, diminuir a insulino-resistência, através da estimulação da via de sinalização da PI-3K/Akt e da AMPK, para além dos efeitos anti-apoptóticos, com repercussões metabólicas sistémicas, nomeadamente melhoria do controlo glicémico.

Os dados obtidos põem em evidência os efeitos da cirurgia bariátrica na diabetes tipo 2 não obesa: melhoria da resistência à insulina, nomeadamente a nível do tecido adiposo visceral, e do controlo glicémico. Apesar do efeito das técnicas cirúrgicas no

peso corporal, justificando, pelo menos em parte, a diminuição da insulino-resistência, o nosso trabalho sugere o estudo detalhado de outros mecanismos, nomeadamente os que envolvem os peptídeos digestivos e a sua relação com o tecido adiposo.

Referências

1. Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab* 2000; 11: 327-332.
2. Ahima R. (2005) Central actions of adipocyte hormones. *Trends in Endoc. And Metab.* 16 (7): 307-313.
3. Antuna-Puente B, Feve B, Fellahi S. Adipokines: The missing link between insulin resistance and obesity. *Diabetes Metab* 2008; 34(1): 2-11.
4. Baily CJ, Day C. Glycaemic memory. *Br J Diabetes Vascular Disease* 2008; 8: 242-7.
5. Brochu-Gaudreau. Adiponectin promotes insulin sensitivity and fatty acid oxidation, and inhibits fatty acid synthesis in the liver. *J Biol Chem* 2010.
6. Bugianesi E., Gastaldelli A. Gambino R., Cassader M., Baldi S., Ponti V., Pagano G., Ferrannini E. & M. Rizzeto (2005) Insulin resistance in non- diabetic patients with non- alcoholic fatty liver disease: sites and mechanisms. *Diabetologia.* 48: 634-642.
7. Bugianesi E., McMullough A. & G. Marchesini (2005) Insulin Resistance. *Hepatology.* 42: 987- 1000.4
8. Cali AMG, Caprio S. Prediabetes and type 2 diabetes in youth: an emerging epidemic disease? *Curr Opin Endocrinol, Diabetes Obesity* 2008; 15: 123-7.
9. Carvalho C&F. et al. (2006). Citocinas, Disfunção Endotelial e Resistência à Insulina. *Arq Brás Endocrinol Metab* vol. 50 n° 2 Abril 2006.
10. Chandran M, Phillips SA, Ciaraldi T, Henry RR. Adiponectin: more than just another fat cell hormone? *Diabetes Care* 2003; 26:2442-2450
11. Costa J. (2005). Tecido adiposo e adipocinas. *Acta Med Port* 2006; 19: 251- 256.
12. Ebtesam A AL-Suhaimi and Adeeb Shehzad: Leptin, resistin and visfatin: the missing link between endocrine metabolic disorder and immunity. *European Journal of Medical Research* 2013, 18:12.
13. Emanuelli B., Peraldi P., Filloux C., Chavey C., Freidinger K., Hilton D., Hotamisligil G. & E. Van Obbergen (2001) SOCS-3 inhibits signaling and is up-regulated in response to tumor necrosis factor- α in the adipose tissue of obese mice. *J. Biol. Chem.* 276: 47944-47949.
14. Ele Ferrannini and Geltrude Mingrone. Impact of different bariatric surgical procedures on insulin action and β -cell function in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, vol. 32, n. 3, 2009.

15. Fernández-Riejos P, Najib S, Santos-Alvarez J. et al. Role of Leptin in the Activation of Immune Cells. *Mediators of Inflammation* (2010); Article ID 568343, 8 p.:10.1155/2010/568343
16. Fruhbeck G, Diez Caballero A, Gil MJ 2004: Fundus functionality and ghrelin concentrations after bariatric surgery. *N Engl J Med* 350: 308-309.
17. Gândara F. (2012) A Pré – diabetes. *Revista Factores de Risco*, nº 24 Jan-Mar 2012, 42-45.
18. Galic S, Oakhill J, Steinberg G (2010). Adipose tissue as an endocrine organ. *Molecular and Cellular Endocrinology* 316: 129-139.
19. Gijs H. Goossens. The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. *Physiology & Behavior* 94 (2008) 206-218.
20. Ginsberg HN. Insulino resistance and cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 106: 453-8.
21. Guilherme A. & Czech M. P. – Adipocyte dysfuntions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Molecular Cell Biology*. (2008) p. 367-377.
22. Guilherme A, Virbasius J, Puri V, et al. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. Vol.9, May 2008.
23. Hauner H (2010). Adipose tissue inflammation: are small or large fat cells to blame? *Diabetologia* 53: 223-225.
24. Hotamisligil G (2003). Inflammatory pathways and insulin resistance. *Int J Obes* 27: S52-S55.
25. Holt T, Sudhesh K. *ABC Diabetes*. Wiley – Blackwell, 6 ed, 2010.
26. Im GE, Brubaker PL: Glucagon-like peptide 1 secretion by the L-cell. *Diabetes*. 2006; 55 (suppl 2): S70-S77.
27. Jin Ma, Christopher K. Rayner, Karen L. Jones, et al. Insulin secretion in healthy subjects and patients with Type 2 diabetes – role of the gastrointestinal tract. *Best Practise & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 23 (2009) 1-12.
28. Juge-Aubry C. (2005) Henrichot, E.; Meier, C.: Adipose tissue: a regulator of inflammation. *J. Clin. Endoc. and Metab.* 19: 547-566.
29. Juris J. Meier. The contribution of incretin hormones to the pathogenesis of type 2 diabetes. *Best Practise & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 23 (2009) 21-29.

30. Johansson H-E, M. Ohrvall, A. Haenni, et al, Gastric bypass alters the dynamics and metabolic effects of insulin and proinsulin secretion. 2007 Diabetes UK. Diabetic Medicine, 24, 1213-1220.
31. Junqueira LC, Carneiro J. Tecido Adiposo. In: Histologia Básica, Junqueira LC d Carneiro J, Guanabara Koogan, RJ, 10ª Edição, 2004, pág. 125-9.
32. Krebs M. & M. Roden (2005) Molecular mechanisms of lipid-induced insulin resistance in muscle, liver and vasculature. Diabetes Obes. Metab. 7 (6): 621-632.
33. Laferrère 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. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 2008; 93: 2479-2485.
34. Leite LD. (2009). Obesity: na inflammatory disease. Revista Ciência e Saúde, Porto Alegre, v. 2, n. 2, p. 85-95, jul./dez. 2009.
35. Lépori R. (2010). Dyslipidemia. Miniatlas. Licitelco S.L.
36. Lorincz M, Sukumar S (2006). Molecular links between obesity and breast cancer. *Endocrine-Related Cancer* 13: 279–292.
37. Marques S. 25 Perguntas em Dislipidemias Parte 1. 2006 Permanyer Portugal.
38. Matafome P (2007). A terapêutica insulina e atorvastatina na função hepática: estudo num modelo animal de diabetes tipo 2 e hiperlipidemia.
39. Matafome P (2012). Um novo mecanismo para a desregulação da resposta celular à hipoxia. Implicações para a disfunção celular na diabetes tipo 2.
40. Meijer R, Wagensveld B, Sierget C. et al (2011). Bariatric Surgery as a Novel Treatment for type 2 Diabetes Mellitus. ARCH SURG/VOL 146 (NO.6)
41. Meier U. & A. Gressner (2004) Endocrine regulation of energy metabolism: Review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptine, ghrelin, adiponectin and resistin. Clinical Chemistry. 50: 1511-1525.
42. Mousumi Bose, Blanca Oliván, Julio Teixeira, et al. Do Incretins Play a Role in the Remission of Type 2 Diabetes after Gastric Bypass Surgery: What are the Evidence? OBES SURG Review (2008).
43. Muller-Wieland D, Goldstein B. Diabetes tipo 2: Principles and Practise (3). Second Ed. 2008 Euromedice.
44. Nawrocki A., Rajala M., Tomas E. et al, (2005) Mice lacking adiponectin show decreased hepatic insulin sensitivity and reduced responsiveness to PPAR γ agonists. J. Biol. Chem. 281: 2654-2660.

45. Nigel Irwin, Peter R. Flatt: Therapeutic potential for GIP receptor agonists and antagonists. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 23(2009): 87-100.
46. Pais R, Silaghi H, Silaghi A, Rusu ML, Dumitrascu DL (2009). Metabolic syndrome and risk of subsequent colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 15(41): 5141-5148.
47. Pandzic Jaksic V: Adipocytokines as mediators of metabolic role of adipose tissue. *Acta Med Croatica* 2010, 64: 253-262.
48. Qi Y, Nie Z, Lee YS, Singhal NS: Loss of resistin improves glucose homeostasis in leptin deficiency. *Diabetes* 2006, 55:3083-3090.
49. Ravelli MN et al. (2007). Obesidade Conceito, Diagnóstico e Classificação. *RBPS* 2007; 20 (4): 259-266.
50. Reaven G. The metabolic syndrome or the insulin resistance syndrome? Different names, different concepts, and different goals. *Endocrinol Metab Clin Nam* 2004; 32:283-303.
51. Ruan H, Lodish HF. Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor- α : *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003; 14: 447-455.
52. Schutz R, Longo L, Fratta LX, Sckenkel GC, Ritter BC, Brodbeck DC, Silva GI, Lara GM - Reversal of type 2 diabetes mellitus by bariatric surgery. *Revision Article: RBAC.* 2012; 44 (1): 5-9.
53. Seça R. Bases Fisiológicas da Diabetes Mellitus tipo 2 num Modelo Animal. Aspectos clínicos e estudos morfológicos e de secreção de insulina de ilhéus de Langerhans (Coimbra 1998).
54. Seça R, Martins MJ, Pessa PB, Santos RM, Rosário LM, Suzuki KI, Martins MI (2003). Morphological changes of islet of Langerhans in an animal model of type 2 diabetes. *Acta Med Port* 16: 381-388.
55. Seça R, Suzuki KI, Santos RM, Do Rosário LM (2004). Impaired insulin secretion in isolated islets of Goto-Kakizaki rats, an animal model of non obese type 2 diabetes, is a primary event. *Acta Med Port* 17: 42-48.
56. Seça R, Martins MJ, Pessa PB, Santos RM, Rosário LM, Suzuki KI, Martins MI (2003). Morphological changes of islet of Langerhans in an animal model of type 2 diabetes. *Acta Med Port* 16: 381-388.
57. Seça R, Suzuki KI, Santos RM, Do Rosário LM (2004). Impaired insulin secretion in isolated islets of Goto-Kakizaki rats, an animal model of non obese type 2 diabetes, is a primary event. *Acta Med Port* 17: 42-48.

58. Shin A., Huiyuan Zheng, R. Leigh Townsend, et al. Meal-Induced Hormone Responses in a Rat Model of Roux-en-Y Gastric Bypass Surgery. *Endocrinology*, April 2010, 151(4): 1588-1597.
59. Shu-Qiang Li, Zhou Y, Wang Y, Yuan L. et al (2011). Upregulation of IRS-1 Expression in Goto-Kakizaki Rats Following Roux-en-Y Gastric Bypass Surgery: Resolution of Type 2 Diabetes?
60. Sousa M, Bras-Silva C, Leite-Moreira A: The role of leptine in the regulation of energy balance. *Acta Med Port* 2009, 22:291-298.
61. Thomas R, Christian L Roth, Schernthaner G. et al. Peptide YY and GLP-1 in Morbidly Obese Patients Before and After Surgically Induced Weight Loss. *OBES SURG* (2007) 17: 1571-1577.
62. Ueki K. & Kadowaki T. & R. Kahn (2005) Role of suppressor of cytokine signaling SOCS-1 and SOCS-3 in hepatic steatosis and the metabolic syndrome. *Hepatology research*. 33: 185-192.
63. Viollet B, Lantier L, Devin-Leclerc J, et al. Targeting the AMPK pathway for the treatment of type 2 diabetes. *Front Biosci*. 2009; 14: 3380-3400.
64. Wisse BE. The inflammatory syndrome: the role of adipose tissue cytokines metabolic disorders linked to obesity. *J Am Soc Nephrol*. 2004; 15:279 2-800.
65. Wellen, Hotamisligil G (2005). Inflammation, stress and diabetes. *J Clin Invest* 115: 1111-1119.
66. Xu A., Wang Y, Kashaw H., Xu L. (2003) The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic liver diseases in mice. *J. Clin. Invest*. 112: 91-100.
67. Yamauchi T., Kamon J., Ito Y., Tsuchida A., Yokomizo T., Kita S. Sugiyama T., Miyagishi M., Hara K., Tsunoda M., et al (2003) Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature*. 423: 762-769.
68. Ye J (2009). Emerging role of adipose tissue hypoxia in obesity and insulin resistance. *Int J Obes (Lond)* 33 (1): 54-66
69. Yukun Cao,¹ Ting Yang,² Shiqiang Yu,¹ Guocheng Sun,¹ Chunhu Gu,¹ and Dinghua Yi¹. Relationships of Adiponectin with Markers of Systemic Inflammation and Insulin Resistance in Infants Undergoing Open Cardiac Surgery. *Mediators Inflamm*. 2013; 2013:187940