

MARCELO BIANCHINI TEIVE

**ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA QUANTITATIVA DAS
CÉLULAS DE GRELINA DUODENAIS APÓS GASTRECTOMIA
VERTICAL EM RATOS WISTAR**

Tese apresentada ao Programa De Pós-Graduação Em Ciências Médicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

Orientador:
Prof. Dr. Armando José d'Acampora.

Florianópolis
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Teive, Marcelo Bianchini

ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA QUANTITATIVA DAS CÉLULAS DE
GRELINA DUODENAIS APÓS GASTRECTOMIA VERTICAL EM RATOS
WISTAR [tese] / Marcelo Bianchini Teive ; orientador,
Armando José d'Acampora - Florianópolis, SC, 2013.
66 p. ; 21cm

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-
Graduação em Ciências Médicas.

Inclui referências

1. Ciências Médicas. 2. Grelina. 3. Gastrectomia. 4.
Cirurgia bariátrica. I. d'Acampora, Armando José . II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Ciências Médicas. III. Título.

Marcelo Bianchini Teive

**ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA QUANTITATIVA DAS
CÉLULAS DE GRELINA DUODENAIS APÓS GASTRECTOMIA
VERTICAL EM RATOS WISTAR**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de “Doutor” e
aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em
Ciências Médicas.

Florianópolis, 26 de Fevereiro de 2013

Prof^a Dr^a Tânia Regina Fröde
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Armando José d'Acampora
Orientador

Prof. Dra. Maria de Lourdes Pessoli Biondo-Simões
Membro

Prof. Dr. Murillo Ronald Capella
Membro

Prof. Dr. Edevard José de Araújo
Membro

Prof. Dr. Carlos Alberto Justo e Silva
Membro

Prof. Dr. Pierre Galvagni Silveira
Membro

Aos meus pais, Acy (*in memoriam*) e Amélia.

AGRADECIMENTOS

Aline Costa – Serviço de Anatomia Patológica do HU-UFSC

André Muller Teive - Serviço de Anatomia Patológica do HU-UFSC

Daniella Vieira – Serviço de Anatomia Patológica do HU-UFSC

Humberto Fenner Lyra Jr. – Divisão de Clínica Cirúrgica HU-UFSC

Luiz Henrique Prazeres - Laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental-UFSC

Maico Buss – Laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental-UFSC

Marcello Muller Teive – Documentação fotográfica

Paulo Freitas – Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas-UFSC

Ao Prof. Dr. Armando José d'Acampora pelos ensinamentos e orientação.

Ao Dr. Ricardo Fantazzinni Russi parceiro de estudos e cirurgias.

Aos meus familiares pelo apoio e incentivo: Betty, André, Marcello e Christiane, Patricia e Thiago.

RESUMO

Introdução: A obesidade é um problema de saúde pública de âmbito global. A obesidade é multifatorial incluindo aspectos genéticos, hábitos alimentares e ações de governo. O tratamento da obesidade, no momento, é clínico com medicamentos e dietas ou cirúrgico. A cirurgia bariátrica é a melhor opção terapêutica em pacientes selecionados. Existem várias técnicas cirúrgicas que podem ser utilizadas. A gastrectomia vertical ou *sleeve gastrectomy* (SG) vem ganhando terreno por ser de fácil execução, baixos índices de complicações e com bons resultados em relação à perda ponderal. A SG além do seu mecanismo restritivo também atua por meio de mecanismos neuro-humorais. A grelina, um hormônio que induz à fome, é produzida em larga escala no fundo gástrico, que é removido nesta cirurgia. No entanto alguns autores mostraram resultados não tão favoráveis em relação à manutenção da perda de peso em longo prazo. Uma das explicações seria a de que a diminuição da grelina circulante poderia ser parcialmente anulada pelo aumento da sua produção por outros segmentos do tubo digestivo como o duodeno que é o segundo maior produtor deste peptídeo depois do estômago. **Objetivo:** Este trabalho experimental procurou estabelecer se haveria um aumento das células produtoras de grelina duodenais depois de uma SG em ratos Wistar em 30 e 60 dias depois da operação. **Métodos:** Ratos Wistar foram usados no experimento. Dois grupos de ratos operados 30 e 60 dias depois de uma SG tiveram segmentos duodenais removidos. Nesses espécimes foram contadas por microscopia ótica todas as células produtoras de grelina identificadas por imunistoquímica e comparadas a contagens realizadas em segmentos duodenais de ratos não operados. Para diminuir vieses por diferenças no tamanho das peças foi criado um índice baseado no número de células de grelina encontradas em relação ao número de vilosidades do mesmo segmento que foi denominado índice de células de grelina (ICG). **Análise estatística:** Os ICG foram analisados por meio do teste estatístico ANOVA unicaudado e foi estabelecido um valor de $p = 0,05$. **Resultados:** Em números absolutos houve mais células de grelina imunopositivas nos grupos gastrectomizados, mas os ICG não tiveram significância estatística. **Conclusão:** Não foi evidenciado aumento das células de grelina no duodeno de ratos submetidos à SG em 30 e 60 dias depois da cirurgia quando comparados a ratos não operados.

Descritores: Grelina . Gastrectomia . Ratos Wistar

ABSTRACT

Introduction: Obesity is a public health problem worldwide. In Brazil, paradoxically, health authorities face problems with obesity and starvation issues sometimes in the same geographic areas. Obesity is multifactorial, including genetic, feeding habits and governmental policies issues. Currently the treatment for obesity is medical with drugs, or surgical. Bariatric surgery is the best therapeutic option in selected patients. Several surgical techniques are currently used. The sleeve gastrectomy (SG) is recently gaining credit because its low complications indexes and execution easiness. This technique besides its restrictive mechanism also has a neuro-humoral effect. Ghrelin a hormone that induces hunger is produced in large scale by the gastric fundus, removed by SG. Some authors, however, published results not so satisfactory regarding the long term weight loss maintenance. A possible explanation, among others, is that the ghrelin levels would increase due to new cells in other tissues as the duodenum in a way to compensate for the massive lack of cells removed by the SG. **Aim:** This experimental study searched the possibility of a compensatory increase in the ghrelin cells in the duodenum of rats in 30 and 60 days after SG. **Methods:** Wistar rats were used in this experiment. Two groups of animals were operated 30 and 60 days after being submitted to SG and had segments of duodenum removed. In these specimens duodenal ghrelin immunopositive cells were counted and compared to counts in non gastrectomized rats. To minimize bias due to the differences of the specimens lengths an index was devised. It consisted in dividing the number of ghrelin cells by the number of villi in the segment where they were found. The index was named ghrelin cells index (GCI). **Statistical Analysis:** The GCI were studied by one-way ANOVA. The p value was established in 0,05. **Results:** The number of ghrelin cells was higher in the rats submitted to SG, but GCI showed no statistical significance. **Conclusion:** There was no increase in the number of duodenal ghrelin cells in the animals submitted to SG in 30 and 60 days after the procedure when compared to controls. **Keywords:** Ghrelin . Gastrectomy . Rats, Wistar

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Duodeno exposto Segmento de 5cm a partir do piloro.....	41
Figura 2:	Duodeno seccionado no piloro ainda com segmento de pâncreas.....	41
Figura 3:	Segmento de duodeno (5 cm). Tecido pancreático já ressecado.....	42
Figura 4:	Segmento de duodeno (5 cm) aberto no lado medial.....	42
Figura 5:	Início da SG. Estômago clampeado ao longo da grande curvatura.....	44
Figura 6:	Ressecção gástrica ao longo da grande curvatura.....	44
Figura 7:	Ressecção do estômago já completada. Grande curvatura a ser suturada.....	45
Figura 8:	Grande curvatura suturada em 2 planos. SG completada.....	45
Figura 9:	Fotomicrografia: células de grelina em vilosidades duodenais. (400X).....	51
Figura10:	Fotomicrografia: célula de grelina do tipo aberta em cripta duodenal (400X).....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Número de células de grelina, vilosidades e ICG (índice de células de grelina) em cada grupo52

Tabela 2: Comparação dos ICG (índice de células de grelina) entre os três grupos: controle, 30 dias e 60 dias53

Tabela 3: Peso dos animais nos grupos de 30 e 60 dias analisados pelo teste de t de Student53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgRP	Proteína Relacionada ao Agouti
ANOVA	Análise de Variância
CEUA	Comissão de Ética para o Uso de Animais
DAB	Diaminobenzidina
DMT2	Diabetes Melito tipo 2
GH	Hormônio do Crescimento
GHRH	Hormônio Liberador do Hormônio do Crescimento
GHS-R	Receptor do Secretagogo do Hormônio do Crescimento
GLP1	Peptídeo Semelhante ao Glucagon 1
GOAT	Ghrelin O-acyl transferase
HP	Helicobacter pylori
ICG	Índice de células de grelina
IL-1beta	Isoleucina 1-beta
IL-6	Isoleucina 6
IMC	Índice de Massa Corporal
LSAB	Biotina-estreptavidina rotulada
MCR4R	Receptor da Propiomelanocortina 4
NIH	National Institutes of Health
NPY	Neuropeptídeo Y
OMS	Organização Mundial de Saúde
OXM	Oximodulina
POMC	Propiomelanocortina
PYY	Peptídeo YY
SBB	Síndrome de Bardet-Biedl
SG	Sleeve Gastrectomy
SNAC	Sódio N-[8-(2-hydroxibenzoyl)]
SNC	Sistema Nervoso Central
SPW	Síndrome de Prader-Willi
T1R	Receptor do paladar 1
TNF-alfa	Fator de Necrose Tumoral alfa
TOCE	Técnica Operatória e Cirurgia Experimental

SUMÁRIO

I REFERENCIAL TEÓRICO.....	21
1 INTRODUÇÃO.....	21
1.1 Epidemiologia da Obesidade.....	21
1.2 Genética.....	22
1.3 Tratamento Medicamentoso.....	23
1.4 Tratamento Cirúrgico.....	25
1.5 Grelina.....	27
2 JUSTIFICATIVA.....	35
3 HIPÓTESES.....	36
II OBJETIVOS.....	37
2.1 OBJETIVO GERAL.....	37
2.1 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	37
III MÉTODOS.....	39
3.1 Delineamento do Estudo.....	39
3.2 Amostra.....	39
3.3 Aspectos Éticos.....	39
3.4 Procedimentos Anestésicos Cirúrgicos.....	40
3.5 Intervenções.....	40
3.6 Procedimentos Histopatológicos.....	47
3.7 Medidas.....	48
3.8 Análise Estatística.....	48
IV RESULTADOS.....	51
V DISCUSSÃO.....	55
VI CONCLUSÃO.....	61
REFERÊNCIAS.....	63

I REFERENCIAL TEÓRICO

1. INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA DA OBESIDADE

A Organização Mundial da Saúde (OMS), em relatório publicado em 2011, concluiu que a obesidade tomou proporções epidêmicas e já é um problema de saúde pública dos mais importantes em todo mundo (1).

A Organização lista no seu boletim nº 311 que, desde 1980, a obesidade mais que dobrou; que, em 2008, um e meio bilhão de adultos acima de 20 anos estavam na faixa do sobrepeso e mais de 300 milhões de homens e 200 milhões de mulheres eram obesos, e que 65% por cento da população mundial mora em países onde a obesidade causa mais óbitos que a desnutrição (1).

Em 2010, estimava-se que cerca de 43 milhões de crianças com menos de 5 anos estariam acima do peso. A OMS enfatiza neste documento que a obesidade é passível de prevenção. Nos EUA, nos últimos 30 anos a obesidade triplicou e o sobrepeso é maior em meninas do que em meninos. Calcula-se que 70% dos adolescentes adultos com sobrepeso serão adultos obesos (1-3).

Sobrepeso e obesidade são definidos como um acúmulo excessivo ou anormal de gordura passível de comprometer a saúde (1-3).

Para mensurar obesidade e sobrepeso, foi criado um índice chamado de Índice de Massa Corporal (IMC), levando em consideração o peso e a altura individualmente. Quando o IMC é maior ou igual a 25, caracteriza-se como sobrepeso e acima de 30, obesidade (1-3).

O IMC é a ferramenta de avaliação em nível populacional das condições de sobrepeso ou obesidade e vale para qualquer idade ou sexo, em adultos. Deve ser encarada como uma medida de rastreamento; pois, em certos casos, o índice pode não corresponder ao mesmo grau de gordura em diferentes indivíduos. A principal causa da obesidade e do sobrepeso é um desequilíbrio entre as calorias consumidas e as calorias gastas. De maneira geral, isso é causado por um aumento no consumo de alimentos de alta densidade energética, ricos em gorduras, sal e açúcares, mas com baixo teor de vitaminas, sais minerais e micronutrientes. Também podem ser imputadas ao aumento da obesidade, mudanças nos padrões dietéticos e atividade física (1-3).

Um IMC elevado é fator de risco para doenças cardiovasculares (doença cardíaca e acidentes vasculares cerebrais), que foram a principal

causa de morte em 2008 nos EUA. Outras doenças, como alterações musculoesqueléticas (osteoartrite) e alguns tipos de cânceres (endométrio, mama e cólon), também têm como fator de risco a obesidade ou o sobrepeso (1-3).

A obesidade infantil está associada a uma maior possibilidade de obesidade e morte prematura na vida adulta. Além desses riscos futuros, as crianças obesas sofrem com dificuldade respiratória, aumento do risco de fraturas, resistência à insulina e problemas psicológicos (1).

Em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, como o Brasil, as autoridades de saúde têm de encarar desafios no combate às doenças infecciosas e à obesidade, muitas vezes, na mesma comunidade, principalmente nas zonas urbanas. Crianças estão mais vulneráveis a cuidados de pré-natal e de nutrição inadequados e, ao mesmo tempo, estão expostas aos alimentos de alta densidade energética, por serem mais baratos, tendo como resultantes dois problemas paradoxais: desnutrição e obesidade (1).

O problema obesidade deva ser enfrentado em três níveis: individual, na sociedade e na indústria de alimentos. Em nível individual, medidas preventivas podem ser adotadas: consumir menor quantidade de gorduras totais; aumentar o consumo de vegetais, frutas, grãos e castanhas; limitar a ingestão de açúcares; e engajar-se em atividade física regular; tudo isso de forma a atingir um IMC adequado (1-3).

A sociedade como um todo e também o poder público devem apoiar as recomendações para o indivíduo, especialmente apoiando programas para os menos favorecidos. A indústria de alimentos pode ter um papel muito importante nesse cenário, reduzindo o conteúdo de gorduras, açúcares e sal nos alimentos processados; assegurando escolhas seguras de alimentos saudáveis para todos os consumidores; fazendo propaganda responsável; e criando programas de atividade física nos locais de trabalho (1-3).

1.2 GENÉTICA

O último mapeamento genético para obesidade, publicado em 2005, revelou que a obesidade tem dois componentes: o monogênico e o poligênico (4, 5).

A obesidade monogênica envolve principalmente mutações nas vias de sinalização da melanocortina, incluindo as mudanças no gene da leptina, do receptor da leptina, da proopiomelanocortina (POMC) e do

receptor da melanocortina (MCR4R). As duas síndromes genéticas mais bem descritas e associadas a um único gene são as síndromes de Prader-Willi (SPW) e de Bardet-Biedl (SBB) (4, 5).

A obesidade poligênica é a mais comum, o que torna o estudo da influência de determinados genes uma questão bastante complexa, pois a individualização desses genes é muito difícil em estudos populacionais. Mais de 600 *loci* em variados genes e mais de 400 genes estão mapeados como relacionados à obesidade, e 127 genes são candidatos a serem associados a fenótipos de obesidade. Todos os cromossomos humanos possuem esses genes ou *loci*, com exceção do cromossomo Y (4, 5).

Talvez muitos desses genes listados no relatório sejam falsos-positivos e que uns possam ser mais importantes do que outros no que tange à expressão de fenótipos ligados à obesidade. Existem, no entanto, evidências baseadas em meta-análises, de que 20 a 30% dos chamados “genes candidatos” possam estar realmente associados a fenótipos de obesidade. O desafio consiste em individualizar o risco de cada um deles e suas possíveis associações, e quais fatores ambientais interagem com esses genes para aumentar ou determinar maior ou menor risco de obesidade (4).

1.3 TRATAMENTO MEDICAMENTOSO

O tratamento medicamentoso da obesidade é limitado por fatores associados à eficácia e segurança. No Reino Unido, só existe uma droga liberada, que é um inibidor da lipase gástrica e pancreática, o orlistate. Na Europa e nos EUA, as respectivas agências reguladoras recomendam que uma droga, para ser aprovada, leve a uma perda ponderal maior que 5% em um ano, quando comparada a um placebo. O orlistate só atinge esse patamar em 30% dos pacientes. Algumas drogas em desenvolvimento, como a associação fentermina/topiramato, têm mostrado essa eficácia. A associação bupropiona/naltrexona e o cloridrato de locaserina também estão nesse grupo. A capacidade de prever a eficácia e os potenciais efeitos adversos são os maiores entraves na utilização e no desenvolvimento de novas drogas contra a obesidade (6).

Os modelos animais têm sido muito úteis na pesquisa de novas drogas antiobesidade, refletindo, com razoável garantia, as perdas ponderais que podem ser esperadas em seres humanos; no entanto, não se prestam aos testes para os efeitos colaterais. Os roedores, por

exemplo, não apresentam vômitos, e os efeitos psicológicos também são muito difíceis de serem reproduzidos experimentalmente (6).

Existem atualmente algumas drogas nos últimos estágios de desenvolvimento e são produto de pesquisas vultuosas de grandes indústrias farmacêuticas. Esses medicamentos serão eventualmente aprovados e, assim, drogas mais eficazes estarão em breve no mercado (6).

O portal (www.fda.gov) da *Food and Drug Administration* (FDA) informou a liberação recente (Junho/Julho de 2012) de novos medicamentos para uso como drogas antiobesidade.

Os hormônios intestinais também têm sido pesquisados como alternativas no tratamento da obesidade. Os principais são os hormônios anoréticos, como o Glucagon-Like-Peptide-1 (GLP-1), o Peptídeo YY (PYY) e a Oximodulina (OXM), este tem uma ação importante no controle da ingestão de alimentos no sistema nervoso central (SNC) (6).

Diferentemente das drogas em estágio de pesquisa mencionadas anteriormente, os hormônios intestinais são componentes essenciais do sistema fisiológico de regulação do apetite e, assim sendo, não apresentam os efeitos colaterais importantes das drogas, o que os torna um atraente alvo no tratamento da obesidade (6).

Um outro braço de pesquisa é a terapia com uma combinação de diversos hormônios intestinais. Uma vez que a manutenção do balanço energético envolve vários níveis de sinalização central e periférica, torna-se lógico o uso de vários hormônios intestinais para mimetizar o controle fisiológico do apetite (6).

Talvez a combinação mais promissora desses hormônios seja a do GLP-1 e o PYY. Essa combinação tem mostrado um efeito anorético somatório, tanto em camundongos como em seres humanos, principalmente quando utilizada pela via oral usando a tecnologia SNAC (sodium N-[8-(2-hydroxibenzoyl) amino caprylate). A via oral é obviamente a mais econômica e conveniente para a administração de medicamentos; no entanto, os hormônios peptídeos são facilmente degradados no ambiente intestinal, o que limita a sua absorção e biodisponibilidade. A tecnologia SNAC soluciona esse problema (6).

No Brasil, as drogas mais utilizadas são: o hidrocloreto de sibutramina, o cloridrato de anfepramona (dietilpropiona) e as drogas estimulantes tetracíclicas (5).

O hidrocloreto de sibutramina é a droga mais utilizada e apresenta efeitos colaterais administráveis. Seu mecanismo de ação é pela via da saciedade (5).

Os agentes inibidores das lipases gastrointestinais também foram aprovados para uso terapêutico. Seus efeitos sobre a perda de peso são mais modestos, porém apresentam ação sobre os níveis de glicemia, colesterol e lipídios (5).

Outro medicamento, o rimonabanto, pertence ao grupo das drogas relacionadas ao sistema endocanabinoide. É uma nova droga e atua como inibidor do receptor CB 1 do sistema endocanabinoide, e os estudos clínicos demonstraram perda de peso adequada e nível de segurança satisfatório (5).

Outros medicamentos em uso no país incluem a fluoxetina, a sertralina, a bupropiona e o topiramato, todos não tão seguros ou eficazes como os anteriores (5).

1.4 TRATAMENTO CIRÚRGICO

As recomendações do *National Institutes of Health* (NIH) para os Estados Unidos (EUA), mas que também se aplicam no Brasil, para indicar tratamento cirúrgico, são: IMC > que 40 e também IMC acima de 35, quando existem comorbidades, como problemas cardiopulmonares que implicam em risco de vida, diabetes grave ou problemas físicos induzidos pela obesidade que interfiram com o estilo de vida. A faixa etária deve estar entre 18 e 80 anos (7).

A Sociedade Brasileira de Cirurgia Bariátrica e Metabólica preconiza ainda que os candidatos à cirurgia devam estar na faixa de risco de IMC e comorbidades há dois anos e terem realizado tratamentos clínicos prévios sem sucesso (8).

A conferência de consenso do NIH, realizada em 1991, recomenda que a cirurgia bariátrica seja uma opção eficaz no tratamento de pacientes com obesidade mórbida. O tratamento dietético/medicamentoso em populações de obesos tem tido, a longo prazo, resultados ruins com os pacientes, mostrando índices expressivos de recidiva, principalmente com a interrupção do tratamento medicamentoso. Estudos controlados mostram superioridade do tratamento cirúrgico, quando comparado ao tratamento dietético/medicamentoso (9).

Atualmente, o tratamento cirúrgico já é um método bem estabelecido e com a maior taxa de sucesso entre os tratamentos da obesidade mórbida existentes. Nas últimas quatro décadas, inúmeras técnicas têm sido desenvolvidas com bases restritivas, disabsortivas e mistas. No momento, cerca de 70%-75% de todas as técnicas realizadas são as do

tipo *bypass* gástrico em Y-de-Roux (9).

Resultados de um estudo de coorte realizado pelo *University Healthsystem Consortium* que reuniu dados de 29 instituições universitárias dão conta que o *bypass* gástrico em Y-de-Roux tem uma taxa de complicações de 16% com uma taxa de 1,6% de deiscência de anastomose e mortalidade em 30 dias de 0,4%. Para as cirurgias restritivas (como a SG) a taxa de complicações foi de 3,2% e a taxa de mortalidade em 30 dias de 0%. As complicações elencadas da gastrectomia em Y-de-Roux são: deiscência anastomótica, infecção de ferida operatória, obstrução intestinal precoce, trombose venosa, hemorragia digestiva, hérnias internas com obstrução intestinal causada por esses orifícios herniários e estenose da anastomose (9).

Será dada maior atenção à técnica denominada gastrectomia vertical ou *sleeve-gastrectomy* (SG), que foi a intervenção cirúrgica usada neste trabalho experimental.

A SG, cada vez mais, tem se mostrado uma opção única no tratamento cirúrgico dos obesos mórbidos e não somente para os superobesos, para a qual ela foi inicialmente utilizada, como operação de transição ou como parte de uma técnica denominada *duodenal switch* (9).

Nos últimos cinco anos, a SG vem ganhando terreno como operação única no tratamento da obesidade mórbida, e já perfaz um total de 5% dentre as técnicas empregadas até 2011 (10).

A gastrectomia vertical não é isenta de complicações, e a mais importante é a deiscência com fistula, que ocorre geralmente próximo ao ângulo de Hiss na porção superior da última fileira de grampos. A incidência, na maioria das séries, é de cerca de 2%. Esse número pode ser maior em séries de cirurgiões ainda na curva de aprendizado e pode ser reduzido por uma segunda linha de sutura (10).

Sangramentos podem ocorrer em menos de 2%, e geralmente são devidos a defeitos na hemostasia na linha de sutura, nos vasos curtos, no baço e no grande omento (10).

Estenoses ocorrem com maior frequência no corpo gástrico e, geralmente, são mais diminuições da luz do estômago do que estenoses propriamente ditas, envolvendo a parede gástrica. São tratadas, na sua grande maioria, por dilatações por endoscopia. Quando as dilatações falham, sermiotomias podem ser realizadas por via laparoscópica, e na falência desta alternativa técnica, pode-se optar por uma conversão para gastroplastia em Y de Roux (10).

A ocorrência de refluxo gastroesofágico é uma complicação que deve ser discutida com o paciente candidato à gastrectomia vertical.

Essa complicação pode ser tratada com inibidores de bomba protônica ou por transformação em *bypass* gástrico, quando não responsiva à medicação (10).

A mortalidade hospitalar (30 dias) da literatura mundial é de 0,19% (10).

Um trabalho realizado na Bélgica, em 2010, com 83 pacientes seguidos por cinco anos, confirma os bons resultados da SG descritos também por outros autores, mas mostra uma queda na perda ponderal com o passar do tempo. A causa dessa tendência em ganhar peso permanece ainda desconhecida, talvez possa ser explicada por modificações neuro-hormonais ainda não totalmente explicadas ou também por aumento volumétrico do remanescente gástrico, com o passar do tempo, a despeito da calibração com sonda 30 F feita durante a operação. Esse último aspecto não pode ser confirmado porque nenhum paciente realizou um exame contrastado no período de seguimento estudado (11).

Um estudo realizado na Itália, em 2012, numa coorte de 60 pacientes, trinta com SG e trinta com tratamento clínico para obesidade e diabetes melito tipo 2 (DMT2), revelou a superioridade da SG num seguimento de 18 meses. Os autores se mostraram otimistas quanto aos resultados, mas enfatizaram a necessidade de um seguimento maior. Esse foi o primeiro estudo clínico controlado que mostrou como a SG pode vir a ser uma arma eficaz no tratamento do DMT2 (12).

1.5 GRELINA

O peptídeo grelina foi descoberto em 1999 por Kojima *et al.* no Japão, depois de inúmeras tentativas, a rigor mais de 500 ensaios, para descobrir o ligante órfão do receptor do secretagogo do hormônio do crescimento (GHS-R). A grelina é um hormônio-peptídeo composto de 28 aminoácidos com uma modificação no terceiro (serina). A modificação é uma octanoacilação desse aminoácido, que é essencial para a sua atividade biológica. Existe uma forma desacilada que não possui as mesmas propriedades da forma acilada (13, 14).

Somente em 2008, portanto nove anos após a descoberta da grelina e do conhecimento de que a acilação no resíduo serina 3 é essencial para sua atividade biológica, um trabalho de um grupo de pesquisadores na Universidade do Texas, em Dallas, revelou a enzima que promove a ligação do octanoato à grelina, que foi denominada GOAT: Ghrelin O-acyl Transferase (15).

Essa enzima pertence a uma extensa família de aciltransferases, que ligam ácidos graxos a lipídeos e proteínas. As enzimas dessa família, à luz do conhecimento atual, transferem ácidos graxos de cadeias longas, e a GOAT é a única que transfere um ácido graxo de cadeia média, no caso o octanoato. Considerando que a grelina é a única proteína octanoacilada em animais é bastante provável que ela seja o substrato exclusivo da GOAT (15).

A grelina é secretada principalmente na mucosa oxíntica do estômago (em ratos e no homem) e circula na corrente sanguínea, para ativar a liberação do hormônio do crescimento (GH) no núcleo arqueado do hipotálamo (13, 14).

Essa é uma função primária e muito importante da grelina. A estimulação máxima efetuada por ela, para liberar GH, é de duas a três vezes maior que a do hormônio liberador do hormônio do crescimento (GHRH), tanto em seres humanos como em ratos. Existe um pico de GH entre 5 e 15 minutos após uma injeção intravenosa de grelina, e injeções no interior dos ventrículos cerebrais também aumentam as concentrações de GH em ratos (16).

Outro efeito também muito importante da grelina é o de interferir no balanço energético do organismo, devido à sua potente ação orexígena. Outros efeitos incluem as ações no sistema cardiovascular, o aumento da motilidade e da secreção gástrica, a regulação do metabolismo da glicose e a supressão das ações do sistema nervoso simpático (17).

O nome grelina vem da palavra inglesa *ghrelin* que, por sua vez, deriva da raiz Proto-Indo-Europeia *ghre*, que significa crescimento, e o terminal *in* é característico dos hormônios (14).

A expressão do hormônio pode estar aumentada em situações como após gastrectomias, o que pode significar que existam outros sítios de produção do peptídeo, capazes de compensar a perda de peptídeo produzido em tecido gástrico (18).

Um estudo de Sakata *et al* utilizando técnicas de imonoistoquímica, mostra que a reatividade é basicamente igual nas várias regiões do trato gastrointestinal. As células do estômago são redondas e pequenas e chamadas de “células do tipo fechadas”. No duodeno, íleo e cólon, além das células fechadas, existe um outro tipo chamado de “células do tipo abertas”, com formato triangular e prolongamentos citoplasmáticos, que atingem o lúmen e estão presentes nas vilosidades e nas criptas (19).

Usualmente a grelina é transportada pela circulação sanguínea, mas é provável que as células abertas secretem o peptídeo na luz

intestinal por exocitose. Portanto, um mecanismo de atuação parácrino da grelina não pode ser excluído. Para reforçar essa ideia, já foi comprovada a alta permeabilidade da mucosa intestinal para macromoléculas, aumentando assim o efeito de hormônios presentes na luz intestinal, sejam eles secretados por células da vizinhança ou produzidos a distância e em trânsito pelo lúmen intestinal (20).

Pesquisadores alemães, estudando os receptores do paladar T1R (mais especificamente o receptor T1R3), presentes nas papilas gustativas e em células enteroendócrinas do estômago e do duodeno de roedores, concluíram que existe uma estreita associação entre as células enteroendócrinas do tipo “em escova” e as células de grelina no estômago. Esse conceito leva a crer que as “células em escova” percebam (sensoriamento) os nutrientes no quimo e conduzam essa informação a células produtoras de grelina da vizinhança, interagindo assim na produção do peptídeo. Diferentemente do estômago, a mucosa duodenal, como já foi mencionado, possui células de grelina do tipo abertas com acesso imediato ao lúmen intestinal. Foi detectada a presença de imunorreatividade para o receptor T1R3, principalmente no polo apical da célula aberta. Esse achado indica que as células de grelina duodenais são capazes de detectar estímulos luminiais. Dessa maneira, em contraste com as células do estômago, podem atuar simultaneamente como células sensoras do conteúdo luminal e como células efetoras, isto é, controlando também a liberação de grelina. Além disso, muitas células de grelina no duodeno também expressam T1R3 em domínios basolaterais, além da expressão apical, significando que essas células não só respondem a estímulos luminiais como também aos provenientes da corrente sanguínea (21).

Parte desses conceitos já havia sido anteriormente estabelecida por análise morfométrica, que revelou o fato de que a maioria das células imunorreativas está no estômago, cerca de dez a cem vezes mais do que em outro órgão (19).

As células do tipo abertas aumentam proporcionalmente em direção caudal; e, de uma maneira global, cerca de 60% das células imunorreativas intestinais são do tipo abertas. Essas células, ao que tudo indica, são fisiologicamente reguladas por informações provindas do lúmen, como propriedades químicas de nutrientes e/ou pH, enquanto que as células fechadas são moduladas por estimulação neuronal, distensão mecânica ou ação hormonal. Esses dados sugerem que a secreção de grelina é regulada por diferentes estímulos em diferentes regiões do trato intestinal. O estudo de Hass *et al.* acrescenta uma “função dupla”, sensória e efetora a algumas células abertas do duodeno (19, 21).

Nas células produtoras de grelina, a molécula desacilada está localizada principalmente ao redor do núcleo, enquanto que a grelina acilada é encontrada na região periférica do citoplasma. Esses fatos mostram que a grelina desacilada produzida no complexo de Golgi sofre a acilação em grânulos na periferia do citoplasma, próximo à membrana celular (22).

O epitélio intestinal, onde se localiza um grande número de células produtoras de grelina, é organizado em dois compartimentos distintos: as vilosidades (projeções digitais no lúmen) e as criptas (invaginações tubulares abaixo das vilosidades). A produção de células novas só ocorre nas criptas, e existem muito mais criptas do que vilosidades (23).

As células-tronco são as únicas células que residem permanentemente nas criptas e dão substrato ao contínuo processo de renovação do epitélio intestinal. Em camundongos BALB/c machos, a proporção criptas/vilosidades no duodeno é de 14:1. A população de células de uma vilosidade do intestino delgado é produto da contribuição das criptas ao redor dessa vilosidade. O número de células-tronco por cripta em alguns estudos é de 4 a 6, mas outros trabalhos relatam a existência de apenas uma célula-tronco por cripta (23).

No duodeno, objeto deste trabalho experimental, a renovação das células do epitélio, incluindo-se as células produtoras de grelina, dá-se por um processo de proliferação e perda celular. As células-tronco residentes nas criptas intestinais proliferam e originam células que migram em direção à luz intestinal e vão se diferenciar em células caliciais, absortivas e endócrinas (grelina), ou podem migrar em sentido oposto e originar as células de Paneth (24).

Durante esse processo migratório em direção à luz, as células do epitélio intestinal também sofrem um processo de proliferação até atingirem a transição cripta-vilosidade. As células das vilosidades são todas do tipo pós-mitóticas e vão até a região apical da vilosidade onde se perdem na luz intestinal por extrusão. O balanço entre perda e renovação dessas células deve ser muito bem equilibrado. Alterações nesta condição levam a processos patológicos, como doença celíaca, doenças inflamatórias intestinais, maior susceptibilidade a enterite actínica e neoplasias malignas (24).

A renovação celular geralmente envolve a morte celular programada, conhecida por apoptose, que inclui a destruição do genoma de células danificadas ou velhas. A apoptose se caracteriza por modificações morfológicas, como condensação de material do núcleo celular, formação de bolhas no citoplasma e encolhimento celular. Essas

alterações são dependentes da ação principalmente de enzimas, como a caspase-3 (24).

Conforme já mencionado, a forma biologicamente ativa da grelina é a acilada. Os níveis séricos e a quantidade de grelina não acilada no estômago são maiores que as respectivas quantidades da grelina “verdadeira”. Esse fato também ocorre com outros peptídeos sem uma ação determinada no organismo, provavelmente porque sua meia-vida é maior do que as das formas ativas, ou por falta de enzimas realmente eficazes na sua inutilização (25).

Existem evidências que a grelina acilada pode ser desacilada por uma potente enzima chamada paraoxanase. A grelina desacilada pode, então, ser tanto uma molécula precursora da grelina acilada, como o produto da ação da esterase paraoxanase sobre a grelina acilada (25).

A ação de estimulação do apetite acontece pela estimulação da grelina acilada sobre o núcleo arqueado do hipotálamo, onde também agem os peptídeos estimuladores do apetite, como o neuropeptídeo Y (NPY) e a proteína relacionada ao agouti (AgRP). Esses peptídeos são inibidos pela leptina, um potente antiorexígeno. Parte da ação orexígena da grelina se dá pela super-regulação dos genes que codificam esses potentes peptídeos em nível neuronal (16, 25).

Em camundongos *knockout*, para ambos os genes (NPY e AgRP), a ação da grelina foi totalmente perdida e predominou a ação da leptina, provando a sua qualidade de antagonista natural da grelina (16, 25).

Sendo um potente hormônio orexígeno, a grelina estimula o consumo de alimentos e o ganho ponderal. A maioria dos estudos mostra que em jejum os níveis de grelina estão aumentados e voltam ao normal quando ocorre a alimentação. Da mesma forma, o conteúdo de grelina gástrica diminui com o jejum, indicando que a grelina estocada no citoplasma é lançada na circulação aumentando os níveis séricos. No entanto, há estudos com resultados conflitantes em relação a esse tópico (26, 27).

Existe também regulação dos níveis de grelina pela ingestão de nutrientes. Há o conhecimento de que existe redução dos níveis séricos de grelina após a administração de glicose, mas esse efeito não se repetiu quando o piloro era bloqueado por um manguito, o que indica que as células reguladoras (provavelmente as células do tipo abertas) estão no duodeno ou jejuno (26).

Outra forma de regulação da grelina sérica é aquela por hormônios em geral e por hormônios entéricos. Existem estudos que mostram que a administração de glucagon causou aumentos transitórios

das grelinas acilada e não acilada. Como há uma proximidade histológica entre as células de grelina e as células D produtoras de somatostatina, existe um mecanismo inibitório da somatostatina sobre os níveis de grelina no sangue (26).

Um estudo de de la Cour *et al.* com técnicas de microdiálise, mostrou que a adrenalina, noradrenalina, endotelina e secretina estimulam a liberação de grelina (28).

Existem evidências de que os hormônios esteroides também estão envolvidos na estimulação da expressão de grelina. O tratamento da mucosa gástrica com estrógeno em ratos comprovou esse fato. Os hormônios esteroides têm, portanto, um papel importante na regulação da grelina gástrica em nível transcricional (29).

Existem receptores para grelina em gânglios neuronais aferentes, sugerindo uma sinalização pelo nervo vago do estômago até o cérebro, explicando por que a vagotomia inibe a ação da grelina como um estimulador do apetite. Uma denervação química com capsaicina tem efeito similar. Também se observou que a elevação dos níveis séricos de grelina é abolida pela vagotomia subdiafragmática ou pela administração de atropina (16).

Há inúmeros estudos relacionando a grelina a doenças como Anorexia Nervosa, Síndrome de Prader-Willi, Síndrome Policística e Doença Celíaca (26).

A Infecção pelo *Helicobacter pylori* (HP) e sua relação com a grelina também foi alvo de muitos trabalhos e intensa controvérsia. Há indicações de que a infecção pelo HP comprometa a expressão da grelina gástrica, e que a cura da infecção melhore esse aspecto (26, 30).

A pesquisa sobre grelina cresce exponencialmente e já existem trabalhos sobre as possíveis aplicações clínicas do peptídeo. Há evidências, em número razoável, de que a grelina tenha efeito anti-inflamatório. Isso se daria pela supressão da produção de citocinas pró-inflamatórias, entre as quais estão: IL-1beta, IL-6 e TNF-alfa tanto *in vitro* como *in vivo* (31).

Desde 2004, vem crescendo o número de ensaios clínicos em doenças ou distúrbios funcionais em que a administração de grelina, por via intravenosa ou subcutânea, pode melhorar estas condições: insuficiência cardíaca congestiva, doença pulmonar obstrutiva crônica, dispepsia funcional, anorexia nervosa, caquexia neoplásica, insuficiência renal terminal, osteoartrite e no pós-operatório de gastrectomia total e esofagectomia (31).

O interesse maior na grelina foi despertado principalmente pela sua já mencionada ação orexígena, que foi demonstrada em vários

experimentos pela elevação dos seus níveis plasmáticos antes das refeições em seres humanos e animais. O que até agora não se sabe é sobre o *mixing* das formas acilada e desacilada nessa elevação sérica. A administração periférica de grelina em seres humanos e diretamente no sistema nervoso central (em animais) aumenta o consumo de alimentos. A eliminação da grelina e de seu receptor em ratos pela tecnologia *knockout* provocou uma pequena, mas substancial, redução na obesidade em camundongos, que estavam em dietas com alto teor de gorduras. Esses fatos levaram a se pensar em inibidores da grelina como uma arma em potencial contra a obesidade (15).

Depois da descoberta da GOAT, pensou-se em um inibidor dessa enzima, uma vez que ela, como já foi mencionado, é altamente seletiva e, portanto, o provável inibidor teria poucos efeitos colaterais (15).

Em 2010, a revista *Science* publicou um trabalho de pesquisadores da Faculdade de Medicina da Universidade Johns Hopkins, nos EUA, descrevendo a síntese e a caracterização de um antagonista da GOAT. O peptídeo foi testado em culturas de tecido e em camundongos nos quais a administração intraperitoneal do antagonista melhorou a tolerância à glicose e reduziu o ganho ponderal nos animais normais, mas não teve efeito em camundongos deficientes em grelina, provando assim que as ações inibitórias são especificamente devidas à inibição da GOAT. Isso é um grande passo para futuras pesquisas em direção a uma droga que possa ser usada em seres humanos, tanto na esfera da obesidade quanto no diabetes (32).

A grande maioria das publicações recentes, sobre a relação grelina e diabetes ou grelina e resistência insulínica, sugere que possa realmente existir uma correlação entre a grelina e essas condições patológicas. Tudo indica que a grelina tem um papel supressivo na liberação de insulina pelas ilhotas pancreáticas (33).

Pesquisas recentes sugerem que a grelina circulante possa suprimir a secreção de insulina estimulada pela elevação da glicemia e piore a tolerância à glicose em indivíduos saudáveis. Isso levanta a possibilidade de que antagonistas da grelina poderiam melhorar a função das células beta. A relevância clínica desses achados, no entanto, ainda não foi totalmente esclarecida e não existem a rigor respostas conclusivas se a grelina realmente tem um papel fisiológico na secreção de insulina em seres humanos (33).

Serão necessários estudos com maior tempo de seguimento para o completo esclarecimento dessa relação tão importante. Provavelmente medições separadas das grelinas acilada e não acilada possam contribuir

para um melhor entendimento do papel que a grelina desempenha na regulação do metabolismo da glicose (33).

Muitos tecidos cancerosos expressam grelina, e ela parece ter um papel significativo na proliferação tumoral, capacidade de invasão, migração das células neoplásicas e processo de apoptose. Até o momento, existem dúvidas se a grelina inibe ou promove o desenvolvimento tumoral, ou mesmo que ela possa ter, dependendo da situação, um efeito de dupla ação. Em algumas culturas de tecido, a grelina é um hormônio inibidor da apoptose e, assim sendo, um facilitador do crescimento tumoral (34).

Em outros estudos, a grelina aparece como um peptídeo capaz de aumentar a migração e a invasão celulares, processos chaves na metastatização tumoral. Os pesquisadores alertam que se deva ter cautela na utilização de grelina como arma terapêutica, como na liberação de GH ou no tratamento da caquexia neoplásica, até que essas questões fiquem melhor esclarecidas (34).

Num estudo dos níveis de grelina em doenças gastrointestinais, os níveis mais baixos estavam associados à gastrite crônica, e os mais elevados foram observados em pacientes portadores de câncer gástrico e gastrite aguda. Especula-se que os níveis altos de grelina em pacientes com câncer do estômago possa ser uma resposta compensatória muito provavelmente à custa de produção em outros órgãos, como duodeno, jejuno, íleo, cólon, rins e pulmão. Os mecanismos precisos dessa resposta ainda são desconhecidos (35).

A relação entre carcinogênese e grelina parece ser uma questão ainda a ser estudada melhor, como, por exemplo, nos casos de carcinoma epidermóide de esôfago, em que parece existir uma relação inversa entre a incidência dessa neoplasia e os níveis de grelina sérica (36).

Células de carcinoma colo retal *in vitro* secretam grelina em excesso, e essas células parecem atuar tanto de forma parácrina quanto autócrina. Um excesso de proliferação também pode ser observado em tumores do pâncreas e hepatomas. Por outro lado, linhagens de tecidos neoplásicos de mama, próstata e tireoide exibem tanto efeitos proliferativos como antiproliferativos, dependendo do tipo celular e da dose de grelina administrada (35).

Um estudo prospectivo, com uma amostra bastante significativa, revelou que indivíduos com níveis baixos de grelina sérica estariam mais propensos a desenvolverem câncer de estômago e câncer da junção esofagogástrica, atualmente já considerado um novo tipo de tumor. A grelinemia poderia, portanto, tornar-se um marcador de atrofia

do fundo gástrico, sinalizando para um possível desenvolvimento dos dois tipos de tumores acima mencionados (35).

Em 2003, Corbetta *et al.* descreveu um caso de uma neoplasia pancreática e hipersecreção de grelina não associado com aspectos clínicos compatíveis com acromegalia. No ano seguinte, houve a publicação do primeiro caso de grelinoma. Pesquisadores suecos e portugueses descreveram um caso de grelinoma gástrico com hipersecreção de grelina, que poderia representar um novo tipo de tumor neuroendócrino. Os autores sugerem a pesquisa de imunorreatividade para grelina em todos os tumores neuroendócrinos de origem gástrica, além da dosagem de grelina no sangue periférico (37, 38).

Uma descoberta interessante foi a de grelina em plantas, fato que merece ainda mais pesquisas para que se possa entender o porquê da existência de um hormônio ligado à ingestão de alimentos, e que sinaliza para um sistema nervoso sofisticado do reino animal, em exemplares do reino vegetal (39).

2. JUSTIFICATIVA:

Por volta de 2007, quando o projeto desta pesquisa estava sendo desenvolvido, havia na literatura trabalhos sobre as qualidades da SG, como a “nova” cirurgia para o tratamento da obesidade em procedimento único e não combinado a outras técnicas, um exemplo disso é o *duodenal switch*. Também já havia indicações para o tratamento da obesidade em geral e não somente para os superobesos, indicação inicial da técnica. Os pesquisadores, no entanto, em sua maioria, apontavam para um aspecto, por assim dizer, “negativo” da operação: o aumento de peso principalmente após o terceiro ano da realização da cirurgia (40-43).

Alguns aspectos técnicos foram apontados com possíveis causas dessa recuperação ponderal: dilatação do tubo gástrico remanescente com o passar do tempo, calibragem do tubo gástrico com sonda muito pequena e, conseqüentemente, confecção de um tubo gástrico muito grande. Outra possibilidade seria a persistência de fundo gástrico com sua grande massa de células produtoras de grelina. A possibilidade de compensação dos níveis séricos de grelina por produção em órgãos outros, que não o estômago, também foi considerada, mas pouco valorizada ou mesmo estudada experimentalmente. (40-43).

Esse fato levou a conceber-se um experimento que pudesse quantificar as células de grelina no duodeno, o segundo maior produtor

de grelina depois do estômago, após a SG

Se houvesse comprovação que em pontos de tempo estabelecidos a população de células de grelina fosse significativamente maior nos animais submetidos à SG do que a de controles, isso fortaleceria a tese de que o aumento de peso estaria relacionado à produção compensatória de grelina em sítios de produção secundária como o duodeno.

3. HIPÓTESES :

Hipótese Nula (H0) = Não existe diferença entre o número de células imunorreativas para grelina no duodeno de ratos, submetidos à SG depois de 30 e 60 dias, quando comparados a ratos não operados.

Hipótese Alternativa (H1) = Existe diferença entre o número de células imunorreativas para grelina no duodeno de ratos, submetidos à SG depois de 30 e 60 dias, quando comparados a ratos não operados.

II OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

A SG remove a maior parte das células produtoras de grelina. Essa redução poderia induzir o duodeno a produzir mais células desse peptídeo de forma compensatória. O objetivo deste trabalho foi estudar de maneira quantitativa se esta compensação ocorre.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Contar, por meio de microscopia ótica, as células imunorreativas para grelina em segmentos de duodeno de ratos Wistar, distribuídos em três grupos: o grupo controle (ratos não operados) e os grupos de estudo (animais que foram submetidos à SG e reoperados 30 e 60 dias após a cirurgia). Comparar os grupos pelo teste de ANOVA

Analisar as médias ponderais antes e depois das cirurgias.

III MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo experimental controlado e randomizado.

3.2 AMOSTRA

Foram utilizados 18 ratos Wistar, adultos com 90 dias, machos, pesando entre 250 e 350 g. Os dados de peso e idade são da chegada dos animais provindos do Biotério Central.

Os animais foram obtidos do Biotério Central da UFSC, após autorização da Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA), protocolo n° 0252.

Foram acomodados no laboratório da Técnica Operatória e Cirurgia Experimental (TOCE) do Hospital Universitário da UFSC, em gaiolas de plástico com tampo de metal gradeado com orifício para bebedouro do tipo garrafa e depressão no gradeado superior para colocação de ração para roedores. Cada gaiola abrigava cinco ratos, e eles tiveram livre acesso à água de torneira e ração para roedores.

Os 18 ratos foram aleatoriamente alocados em três grupos de seis animais cada da seguinte forma: seis animais compuseram o grupo chamado controle (C); outros seis animais compuseram o grupo, que foi submetido a uma SG e reoperados 30 dias depois para remoção de um segmento duodenal, o qual foi denominado grupo trinta dias (30D); um terceiro grupo de seis ratos foi submetido a uma SG e reoperados 60 dias após para retirada do segmento duodenal, e foi chamado de grupo sessenta dias (60D).

Todos os animais eram da mesma idade e da mesma linhagem (Wistar), e o número de animais por grupo foi definido por ser usual nesse tipo de estudo e porque não se sabia, de antemão, qual a diferença entre os grupos a ser obtida.

3.3 ASPECTOS ÉTICOS

Todos os procedimentos experimentais do trabalho foram circunstanciados em projeto encaminhado à CEUA da UFSC, onde foi aprovado e recebeu o número PP-0252.

3.4 PROCEDIMENTOS ANESTÉSICO-CIRÚRGICOS

Para realização dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram submetidos à anestesia geral por injeção intramuscular de cetamina (100mg/kg) e xilazina (10mg/Kg) nos membros pélvicos. Doses adicionais foram eventualmente injetadas pela mesma via, quando havia sinais de superficialização do plano anestésico.

Os animais foram pesados em balança de precisão antes das cirurgias.

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados em condições de antissepsia.

3.5 INTERVENÇÕES

Cirurgia no Grupo C

Depois de serem pesados, os animais foram operados em decúbito dorsal sobre uma prancheta de madeira. Foram fixados a essa prancheta por tiras de esparadrapo nos quatro membros. A tricotomia da área operatória foi feita com máquina de barbear e a antissepsia da pele foi realizada com solução de polivinilpirrolidona (Povidine®).

Uma laparotomia mediana infraxifoídea de aproximadamente 3 cm foi realizada, e a cavidade abdominal abordada com auxílio de cotonetes umedecidos em solução salina para facilitar a manipulação das estruturas intra-abdominais. Uma régua plástica foi colocada sobre o duodeno a partir do piloro, e um segmento duodenal medindo 5 cm foi ressecado junto com uma faixa de 0,5 cm de tecido pancreático. Considerando-se que o duodeno de um rato mede em média 7 cm (em animais com pesos semelhantes aos dos grupos desse trabalho), cerca de 70% do órgão foi estudado (44). (Figura 1 e 2)

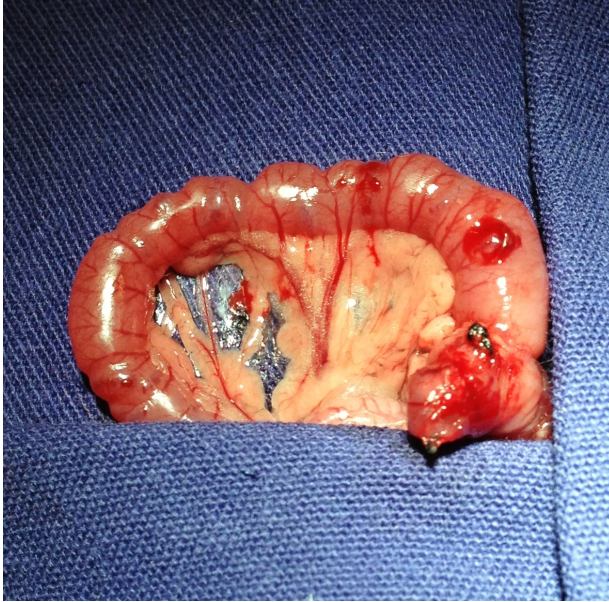


Figura 1: Duodeno exposto. Segmento de 5cm a partir do piloro

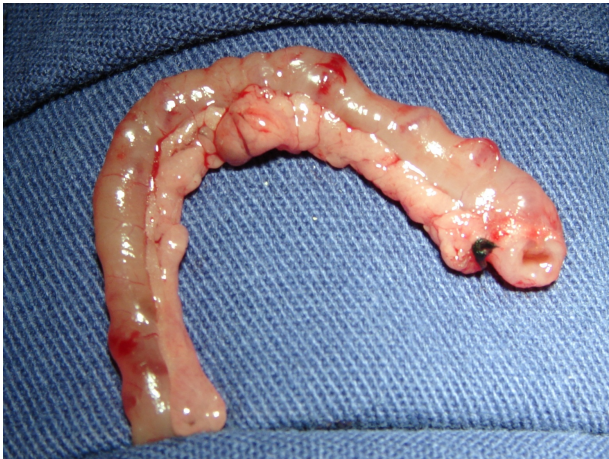


Figura 2: Duodeno seccionado no piloro com segmento de pâncreas

Esse espécime foi liberado do tecido pancreático, aberto no eixo

longitudinal do lado medial, e ambas as peças colocadas em solução de formalina a 10%. (Figuras 3 e 4)



Figura 3: Segmento de duodeno (5cm). Tecido pancreático já ressecado



Figura 4: Segmento de duodeno (5 cm) aberto no lado medial

A seguir, o animal foi submetido à morte indolor assistida (MIA) por uma injeção intracardíaca de cloreto de potássio.

Cirurgia nos grupos 30D e 60D

Assim como no grupo C, os animais após pesagem foram operados em decúbito dorsal sobre uma prancheta de madeira revestida de fórmica e fixados a esta prancheta cirúrgica por tiras de esparadrapo nos quatro membros. A tricotomia da área operatória foi feita com máquina de barbear e a antissepsia foi realizada com solução de polivinilpirrolidona (Povidine®).

Uma laparotomia mediana infraxifoídea de aproximadamente 3 cm foi realizada, e a cavidade abdominal mantida aberta por meio de fios de sutura, passados em cada lado da parede abdominal e fixados na prancheta cirúrgica com esparadrapo. O estômago foi abordado e ligeiramente trazido para fora da cavidade abdominal para facilitar a gastrectomia.

A SG foi realizada pela técnica descrita por Castelan Filho *et al.* com modificações do autor (45).

A técnica preconizada consiste na dissecação de vasos da grande curvatura do estômago e liberação de eventuais aderências e prossegue como descrito a seguir:

Um clampe intestinal de uso em cirurgia pediátrica é colocado ao longo da grande curvatura gástrica a partir do antro cerca de 0,5 cm do piloro. O estômago é então seccionado com tesoura de Metzemaum na face convexa do clampe retirando cerca de 70% de estômago. Cuidado especial deve ser tomado em não deixar o clampe por muito tempo comprimindo o tecido gástrico para evitar isquemia e não deixar a linha de secção muito próxima à saída do esôfago no corpo gástrico para evitar obstrução esofágica. Uma sutura à maneira de Schmieden com Prolene® 6-0 (Ethicon, SP, Brasil) é realizada para a rafia da grande curvatura.

As modificações propostas foram acrescentar um segundo plano de sutura sero-serosa também com Prolene® 6-0 (Ethicon, SP, Brasil) para maior garantia da integridade da linha de sutura na tentativa de prevenir vazamentos e fistulas, que foram complicações encontradas no estudo piloto e utilizar um clampe intestinal curvo. Outra diferença é que não foi utilizado o jejum pré-operatório preconizado pelos autores da técnica original.

A hemostasia e integridade da linha de sutura são verificadas e pontos separados adicionais do mesmo fio aplicados quando necessários. A cavidade é lavada com solução salina e a parede abdominal fechada em dois planos separadamente: o peritônio- músculo-aponeurótico e a

pele; ambos com sutura contínua com nylon 4-0. (Figuras 5-8)

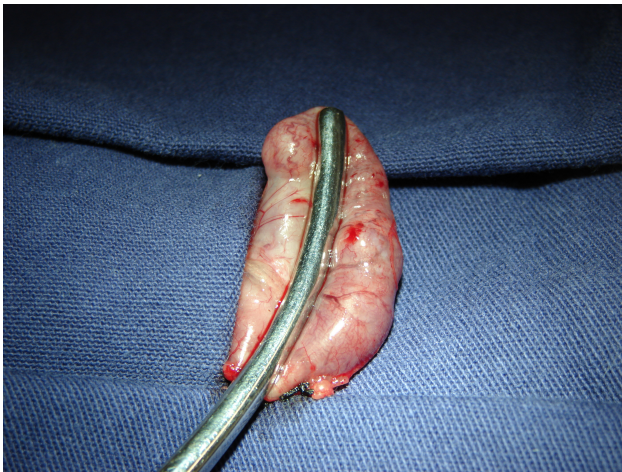


Figura 5: Estômago clampeado ao longo da grande curvatura.

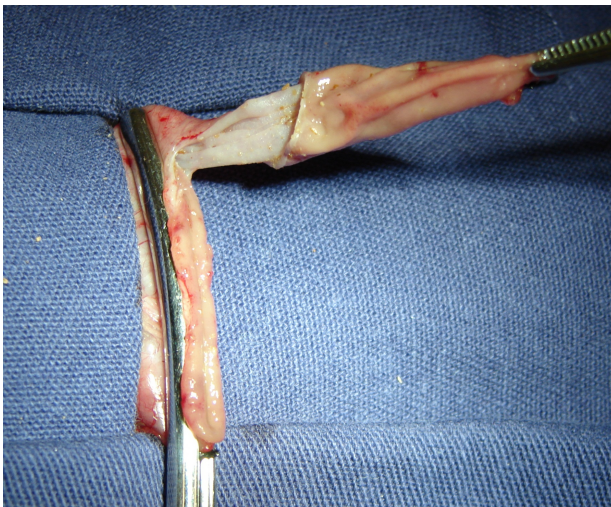


Figura 6: Ressecção gástrica ao longo da grande curvatura



Figura 7: Ressecção completada. Grande curvatura gástrica a ser suturada.



Figura 8: Grande curvatura suturada em 2 planos. SG completada.

Ainda com o animal anestesiado, 10 ml de solução salina foram

injetados no subcutâneo do dorso para hidratação no pós-operatório imediato.

O animal foi colocado em um tubo de papel-bolha (isolante térmico), em gaiola individual, até total recuperação da anestesia. Uma lâmpada de 60W foi colocada sobre a gaiola para fornecer calor e evitar a hipotermia durante o pós-operatório imediato. A sala de recuperação pós-anestésica foi mantida entre 23 e 25° C.

Nos primeiros dois dias de pós-operatório, os animais foram alimentados com uma dieta líquida, composta de solução glico-salina (5% / 0,9%) acrescida de uma solução de Glicopan pet® (Vetnil, SP, Brasil). Essa solução contém vitaminas e aminoácidos e é utilizada como suplementação nutricional em pequenos animais. No terceiro dia de pós-operatório, os animais passaram à dieta normal para roedores e água *ad libitum*.

Reoperações

Trinta ou sessenta dias após, os animais foram reoperados.

Depois de anestesiados, pesados e fixados sobre a prancheta cirúrgica, uma incisão sobre a cicatriz anterior foi realizada para acessar a cavidade abdominal, e aderências foram liberadas para acessar o duodeno.

Uma régua plástica foi utilizada para medir 5 cm de duodeno a partir do piloro. Esse segmento foi então ressecado juntamente com uma faixa de 0,5 cm de pâncreas. O tecido pancreático foi removido do duodeno e este foi aberto no lado medial. Os segmentos de duodeno e pâncreas foram colocados em frascos separados com solução de formalina tamponada e devidamente codificados.

Após a remoção do duodeno e de parte do pâncreas, os animais foram submetidos à MIA por injeção intracárdica de cloreto de potássio. A cavidade abdominal foi fechada com pontos separados, e as carcaças encaminhadas para o lixo hospitalar.

As peças de pâncreas foram armazenadas para outros experimentos, e as de duodeno encaminhadas ao Laboratório de Anatomia Patológica, onde foram submetidas aos procedimentos descritos a seguir.

3.6 PROCEDIMENTOS HISTOPATOLÓGICOS

Uma faixa central e longitudinal do segmento duodenal (aspecto lateral), medindo 0,2 cm, foi ressecada e dividida no sentido transversal em três partes, de maneira a caber em uma lâmina.

Todo material foi processado em histotécnico LUPE PT 05® e, posteriormente, os fragmentos foram incluídos em blocos de parafina e codificados, segundo o protocolo de pesquisa.

Os blocos, após congelados, foram submetidos a cortes com espessura de 2 micra em micrótomo Leica 2040 Autocut®.

A partir dos cortes, foram confeccionadas lâminas para coloração de hematoxilina-eosina (HE) e lâminas para análise imunoistoquímica pelo método descrito abaixo.

Imunoistoquímica

Os tecidos foram corados imunoistoquimicamente usando o método da biotina-estreptavidina rotulada (LSAB).

Resumidamente, as peças foram desparafinizadas, reidratadas e incubadas com peróxido de hidrogênio a 3% em metanol, por 20 minutos, para bloquear a atividade da peroxidase endógena. A recuperação antigênica foi feita usando um tampão de citrato (pH 6,0), por 40 minutos, à temperatura de 95 a 98° C, e os espécimes foram deixados esfriar por 30 minutos à temperatura ambiente.

Os tecidos foram incubados com anticorpo primário antigrelina, desenvolvido em coelhos para uso em ratos e camundongos (Phoenix Pharmaceuticals, CA, EUA), na diluição de 1:10000, por 12 horas, à temperatura de 8° C, em uma câmara umidificada e com anticorpo secundário biotinilado (Dako, CA, EUA), também por 30 minutos à temperatura ambiente.

A seguir as peças foram incubadas com estreptavidina conjugada à peroxidase (Dako, CA, EUA), por 40 minutos, à temperatura ambiente e então tratadas por 1 minuto com 3-3-diaminobenzidina (DAB), a qual atuou como um cromógeno. Os espécimes foram então contracorados com hematoxilina de Harris, por 9 minutos, desidratados em etanol estratificado com xileno e montados sob lamínulas com ERV-MOUN (EasyPath, SP, Brasil). O estômago do rato, conhecido por expressar grelina em altas quantidades, foi usado

como controle positivo para o experimento, e o controle negativo foi um espécime que recebeu uma solução tamponada de PBS, em vez do anticorpo primário. O resultado positivo foi indicado pela coloração marrom no sítio de ligação do anticorpo.

3.7 MEDIDAS

Contagem Celular e Índice de Células de Grelina

Cada lâmina continha três porções do segmento de 5 cm de duodeno de cada rato: proximal, médio e distal.

Um patologista sem conhecimento das codificações das lâminas, utilizando um microscópio ótico Leica DM 500® com aumento de 400X, contou **todas** as células imunopositivas para grelina e **todas** as vilosidades. Três contagens totais foram realizadas, e os resultados da última contagem foram usados na análise estatística. Somente as células nucleadas com cromógeno marrom no citoplasma ou em qualquer parte da membrana celular foram consideradas para contagem. Os resultados foram anotados em uma planilha.

As células abertas foram englobadas na contagem e seus números destacados.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O Índice de Células de Grelina (ICG) e Análise Estatística

Considerando que, mesmo tendo origem em segmentos de 5 cm de duodeno, os espécimes nas lâminas não tinham microscopicamente o mesmo tamanho, o que poderia criar um viés na contagem das células, uma vez que todas as células de cada espécime seriam contadas.

Para normalizar esses números, criou-se um índice de células de grelina (ICG), que era o número de células imunopositivas em cada lâmina (portanto em cada rato), dividido pelo número de vilosidades na mesma lâmina. Esse quociente foi denominado ICG, e gerou números que foram utilizados na análise estatística.

O teste ANOVA unicaudado foi utilizado para acessar a significância

estatística, comparando os três grupos entre si. A análise de variância é um teste estatístico utilizado em pesquisa clínica e experimental com o objetivo de determinar se existem diferenças significantes entre dois ou mais grupos de médias. O teste analisa as médias dentro dos grupos e entre os grupos da amostra. Num estudo unicaudado uma variável é manipulada (variável independente) , neste estudo os grupos de ratos, e uma variável que se presume ser modificada por essa manipulação, no estudo o ICG, é a variável dependente (46).

A significância foi estabelecida como $p < 0,05$ e os dados são apresentados como médias e desvios-padrão dos ICG. Para o processamento dos dados, foi utilizado o pacote de software SSPS (SSPS, Inc, IL, EUA).

Os dados de peso (médias) foram tratados pelo teste de t de Student com $p < 0,05$.

IV RESULTADOS

Em todos os animais foi encontrado alimento sólido no interior da cavidade gástrica quando das reoperações.

As células imunopositivas para grelina foram somente observadas nas vilosidades e nas criptas da camada mucosa do duodeno. As células do tipo abertas foram encontradas em vilosidades e criptas.

As Figuras 9 e 10 mostram células imunocoradas nas vilosidades e nas criptas.

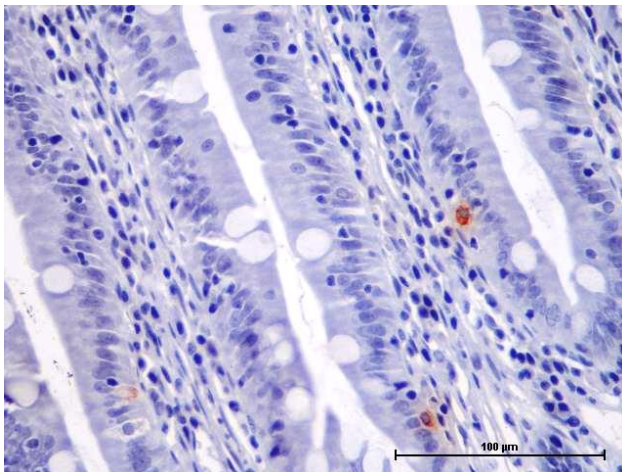


Figura 9: células de grelina em vilosidades duodenais. (400X)
Microscópio: Nikon - Câmera: Nikon Digital Sight-
Software: NIS 2.10

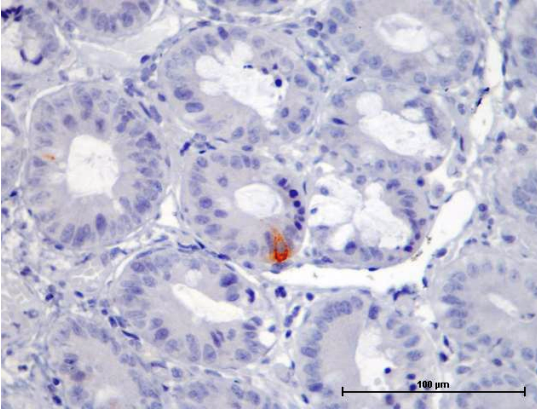


Figura 10: célula de grelina do tipo aberta em cripta duodenal. 400X

Microscópio: Nikon - Câmera: Nikon Digital Sight- Software: NIS 2.10

A tabela 1 mostra os resultados para cada grupo, incluindo o número de células de grelina imunopositivas, o número de células do tipo abertas, o número de vilosidades e o ICG. O número de células do tipo abertas foi incluído na contagem total de cada grupo.

Tabela 1: Número de células, vilosidades e ICG^a em cada grupo

Grupo	Células de grelina	Vilosidades	ICG
C	439(6) ^b	1567	0,2801
30D	484(6) ^b	1496	0,3235
60D	567(13) ^b	1647	0,3442

^a ICG: índice de células de grelina

^b Número de células do tipo abertas entre parênteses.

Observou-se um aumento do número de células imunopositivas para grelina, principalmente entre o grupo C e o grupo 60D, que se refletiu no ICG (0,28 para 0,34). O número de vilosidades se manteve praticamente sem grande diferença.

O teste de ANOVA unicaudado foi usado para analisar as possíveis diferenças entre os grupos, principalmente entre o grupo C e os grupos 30D e 60D (Tabela 2).

Tabela 2: Comparações dos ICG^a entre os grupos

Grupos	Média	Desvio Padrão
C	0.282	0.823
30D	0.343	0.798
60D	0.338	0.134
p=0.53*		

^a ICG: Índice de células de grelina

* ANOVA (95% CI)

A análise estatística não mostrou aumento compensatório com significância estatística no número de células de grelina imunopositivas numa amostra de duodeno de ratos submetidos à SG, 30 e 60 dias depois da operação, quando comparados a animais não operados.

A tabela 3 mostra a evolução ponderal dos ratos nos grupos de estudo com os dados do peso inicial, antes da SG e do peso 30 e 60 dias após.

Tabela 3: Peso dos animais nos grupos de 30 e 60 dias analisados pelo teste de t de Student

Grupos	Média Peso Inicial (g)	Média Peso Final (g)	p
30 DIAS	260	310	0,000898
60 DIAS	222	343	0,002368

p=0,05

V DISCUSSÃO

Foi investigada a possibilidade de que, após a remoção da maior parte (cerca de 70%) da mucosa gástrica responsável pela produção de grelina por uma SG, outros órgãos produtores desse peptídeo, eventualmente, poderiam aumentar a sua produção de forma compensatória.

A opção pelo rato Wistar como animal de experimentação foi devida a vários fatores : o modelo animal de SG já descrito e com bons resultados, a disponibilidade desses animais no Biotério Central, a facilidade de armazenamento em pequenos espaços, e a experiência cirúrgica dos pesquisadores com o rato.

Apesar do tamanho pequeno dos órgãos do rato, a anatomia do trato gastrointestinal é muito semelhante a dos seres humanos. O estômago do rato tem um cárdia ou estômago anterior que é contínuo com o esôfago e é forrado por epitélio escamoso; é mais fino e não possui função motora. O fundo e a região pilórica (a região glandular) tem uma anatomia similar a dos humanos. O grande e pequeno omentos são semelhantes aos da anatomia humana (47).

O perfil metabólico desta cepa (Wistar) é de animais não obesos, não diabéticos, mas suscetíveis a essas e outras doenças metabólicas quando alimentados com uma dieta rica em gorduras, detalhe importante em pesquisas com obesidade. A dieta ocidental torna esses animais obesos (47).

É claro que técnicas cirúrgicas são melhor desenvolvidas em animais maiores. Existem relatos de SG em porcos mas em número menor do que em ratos. A escolha do animal de experimentação depende de uma série de fatores, mas principalmente do objetivo do experimento e da viabilidade da intervenção. O rato Wistar preenche praticamente todas as condições a serem alcançadas neste trabalho, como por exemplo as metas de fisiologia e anatomia celular pós-cirúrgicas. (47).

Outra vantagem do rato Wistar é a de que a sua molécula de grelina difere da molécula da grelina humana em apenas dois aminoácidos, além disso os anticorpos anti-grelina de rato podem ser utilizados em seres humanos (25).

Não foram encontrados estudos com primatas nessa área, nas bases de dados pesquisadas (PubMed e Scielo).

A logística adotada neste experimento foi a de fazer previamente um número grande de "cirurgias-piloto" para que se pudesse não só treinar a técnica cirúrgica como observar detalhes em

relação à anestesia, mortalidade e outras particularidades que poderiam de alguma forma afetar o trabalho nos grupos do estudo. As cirurgias foram realizadas em 2009 quando havia poucos relatos na literatura a respeito de cirurgia bariátrica em ratos.

Visando otimizar o tempo da pesquisa, uma vez que os animais já estavam alocados aleatoriamente em seus grupos, realizamos as cirurgias nessa ordem: grupo 60 dias, grupo 30 dias e grupo controle. Todos os procedimentos foram completados em quatro meses.

Atualmente se sabe que são muitas as dificuldades com essas técnicas em pequenos animais. Existe nítida correlação de mortalidade elevada com anestesia inalatória, sangramentos mesmo de pequena monta e também com ratos acima de 300 g. Outro ponto importante é a eversão da mucosa gástrica após a secção na grande curvatura o que neste estudo foi evitado pela técnica de Schmieden que é invaginante e o segundo plano sero-seroso (48).

A opção pelo duodeno ocorreu por ser esse o órgão com a maior população de células de grelina depois do estômago, dessa forma num pequeno segmento de intestino poderíamos detectar um maior número de células produtoras de grelina (19).

Em seres humanos, observou-se que logo após uma gastrectomia convencional os níveis séricos de grelina são reduzidos à metade, mas gradualmente aumentam, sugerindo que outros tecidos também sejam produtores de grelina para que o organismo consiga atingir os níveis anteriores à cirurgia (49).

Esse experimento, inédito até esta data, revelou que não ocorreu um aumento das células de grelina no duodeno dos ratos submetidos à SG. Não era o objetivo deste estudo analisar os níveis de grelinemia, e tão somente quantificar o número de células produtoras de grelina presentes no duodeno, antes e depois da operação.

As células do tipo abertas, presentes em vilosidades e criptas, foram documentadas e tiveram seus números anotados; serão objeto de estudo particularizado a ser publicado.

Sabe-se que existem células-tronco nas criptas intestinais do duodeno, tanto em seres humanos como em ratos. Essas células proliferam na base das criptas e migram para a superfície, onde ocorre uma diferenciação em células endócrinas, como as células produtoras de grelina e também em outros tipos celulares, como células caliciais, células abortivas e células de Paneth (24).

Daí a hipótese de que, mediante um estímulo ainda não muito bem compreendido, novas células das mais variadas linhagens possam ser geradas, inclusive células produtoras de grelina.

Neste experimento, foram analisados os primeiros cinco centímetros do duodeno em três grupos de seis ratos. Um grupo que não sofreu qualquer alteração cirúrgica em seu estômago, e dois grupos depois de 30 e 60 dias após uma SG.

Todas as células de grelina, presentes nesses segmentos duodenais, foram contadas manualmente por um patologista não conhecedor das condições do experimento, em microscópio ótico, com aumento de 400X.

Como o duodeno possui uma população celular produtora de grelina menor do que o estômago, a forma que se encontrou, para poder se realizar análises comparativas entre os grupos, foi a contagem individual de toda a população celular produtora de grelina, após a identificação das mesmas, por método imunoistoquímico. Zhao *et al.* refere que a quantidade de células de grelina no estômago é cerca de dez a vinte vezes maior que no duodeno (22).

Os animais foram mantidos em condições mais fisiológicas possíveis, não sendo instituído o jejum no pré-operatório.

O fato de existir alimento no estômago dos animais, não alteraria a função celular onde havia produção de grelina, pois as células estariam com maior quantidade do peptídeo, que reagiria com os anticorpos anti-grelina, favorecendo a reação e marcando as células desejadas, identificadas como produtoras do peptídeo em estudo.

O tempo em que foram realizadas as reoperações, respectivamente 30 e 60 dias, baseou-se na relação da idade dos ratos com a idade de seres humanos.

Um editorial de Quinn, em 2005, apontou que, em termos médios, cada mês da vida de um rato de laboratório corresponde a aproximadamente dois anos de vida de seres humanos (50).

O estudo em tela teve, como ponto fundamental, analisar os animais de maneira temporal análoga a um estudo em seres humanos dois e quatro anos após a cirurgia (SG).

O estudo em 30 e 60 dias em ratos, segundo o que foi estabelecido por Quinn *et al.*, cobre o período de tempo em que alguns autores observaram em seres humanos a recuperação ponderal, que poderia ser atribuída ao aumento de grelina (50).

O estudo de Himpens *et al.* publicado em 2010, estudou 53 pacientes submetidos à SG, sistematicamente, durante um ano e seguidos por até seis anos. Esses autores concluíram que existe perda de peso importante até o terceiro ano e que há recuperação ponderal a partir do terceiro ano. A esperança de que a remoção da massa de células produtoras de grelina do fundo gástrico pudesse garantir para sempre a

perda ponderal não se confirmou. O que parece ser mais verdadeiro é o fato de que células produtoras de grelina, antes “dormentes” dispersas por todo tubo digestivo e em maior número no duodeno, passariam a produzir o hormônio e anulariam parcialmente o efeito da SG (51).

O fato de não se ter obtido um aumento das células produtoras de grelina nos períodos de tempo escolhidos, pode ser creditado, por exemplo, a fenômenos não ainda bem explicados em relação à transformação de células-tronco em células especializadas no que diz respeito ao tempo em que essas transformações ocorreriam.

Embora a pesquisa em relação à grelina tenha sido desencadeada em todo o mundo científico, a partir de sua descoberta em 1999, ainda não foi possível estabelecer o mecanismo completo da transformação de células-tronco em células produtoras do peptídeo grelina.

Talvez o aumento do número de animais para estudo, ou a ressecção de maior quantidade de tecido duodenal, possa favorecer a profundidade da análise e, de alguma forma, causar modificação nos resultados.

Talvez se possa estudar esses animais por mais tempo, como, por exemplo, seis meses após a cirurgia. Isso representaria um tempo muito longo considerando-se a vida-média desses animais (2 anos) mas um grupo de 90 dias poderia, quem sabe, trazer resultados diferentes dos obtidos.

O objetivo do experimento era saber, única e exclusivamente, se haveria ou não compensação celular, ou seja, se ocorreria aumento do número de células produtoras de grelina no duodeno, de modo a compensar a exclusão da celularidade do estômago, retirada por procedimento cirúrgico.

Um dos pontos fortes do estudo é o de que não foi utilizada a técnica de contagem de células em campos aleatórios, o que diminuiria a amostra celular, mas contadas todas as células presentes na amostra duodenal selecionada, e esse número relacionado com a quantidade de vilosidades em cada segmento estudado, o que resultou na criação de um índice denominado ICG.

Essa é a novidade apresentada por este estudo, que é a correlação entre o número de vilosidades e criptas com o número de células produtoras de grelina, possibilitando assim quantificação e correlação numérica no achado.

Assim, cada animal no estudo contribuiu com um número de células de grelina duodenais, resultante de uma relação entre o número

de células contadas e o número de vilosidades e suas criptas, nas quais essas células foram encontradas.

Esse método permite que se analisem quantitativamente células intestinais em segmentos de intestino de tamanhos diferentes.

Com essa metodologia, estudando vilosidades, criptas e número de células produtoras de grelina, pode-se afirmar, neste estudo, que não houve compensação da exclusão cirúrgica de parte do estômago com aumento do número de células duodenais produtoras de grelina.

O ICG fez com que se minimizassem ao máximo as diferenças de tamanho entre os diversos segmentos duodenais que, embora macroscopicamente medissem 5 cm, tinham, na realidade, tamanhos diferentes quando vistos ao microscópio.

Uma dificuldade técnica encontrada no estudo foi estabelecer a diluição exata do anticorpo que, segundo informações do fabricante, é de 1:200.

Nessa diluição não foi possível a individualização correta das células de grelina.

Procurou-se então a diluição ideal para a identificação celular, sendo obrigatória a realização de vários testes em pilotos com diferentes diluições, iniciadas com a recomendada pelo fabricante, a qual não foi adequada (*overstaining*).

A diluição do anticorpo foi obtida por tentativas, com diluições sucessivas de 1:800, 1:1000, 1:2000, 1:8000 até que foi conseguida a diluição ideal, a qual foi utilizada: 1:10.000.

Um outro aspecto a ser considerado é o aumento de peso em ambos os grupos (tabela 3). Este achado poderia ser interpretado como uma falha da SG, um aumento compensatório de células de grelina, o que pode ser descartado pelos resultados finais do estudo, ou o que nos parece mais plausível, aumento de peso do animal pelo seu crescimento, uma vez que se passaram quatro meses do início ao fim dos procedimentos cirúrgicos.

Os resultados deste experimento são favoráveis à SG, uma vez que um dos possíveis pontos fracos dessa técnica cirúrgica, a recuperação do peso, poderia ser creditada ao aumento da produção de grelina por células de outros sítios que não a mucosa oxíntica do estômago, como, por exemplo, o duodeno.

Como já foi mencionado, outros estudos, modificando variáveis metodológicas utilizadas neste experimento, como o aumento do tamanho da amostra e/ou a ampliação dos períodos de tempo, são necessários para uma total compreensão dessa questão.

VI CONCLUSÃO

Não foi evidenciado aumento compensatório, nos períodos de tempo indicados, de células produtoras de grelina no duodeno dos ratos submetidos à SG.

REFERÊNCIAS

1. Organization WH. Obesity and Overweight Fact Sheet # 311 2011. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>.
2. Haidar YM, Cosman BC. Obesity epidemiology. Clinics in colon and rectal surgery. 2011 Dec;24(4):205-210.
3. Lagerros YT, Rossner S. Obesity management: what brings success? Therapeutic advances in gastroenterology. 2013 Jan;6(1):77-88.
4. Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Argyropoulos G, Walts B, et al. The human obesity gene map: the 2005 update. Obesity (Silver Spring). 2006 Apr;14(4):529-644.
5. Walmir C, Tambascia, M.A., Halpern, A. . Curso de Atualização em Obesidade. Editores SF, editor. São Paulo: Segmento Farma; 2007. 80 p.
6. McGavigan AK, Murphy KG. Gut hormones: the future of obesity treatment? Br J Clin Pharmacol. 2012 Mar 27;74(6):911-919.
7. Azagury DE, Lautz DB. Obesity overview: epidemiology, health and financial impact, and guidelines for qualification for surgical therapy. Gastrointest Endosc Clin N Am. 2011 Apr;21(2):189-201.
8. Metabólica SBdCBe. Cirurgia Bariátrica e Metabólica -Quem pode Fazer. [cited 2012 25022012]. Available from: <http://www.sbc.org.br/cbariatrica.asp?menu=5>.
9. Smith BR, Schauer P, Nguyen NT. Surgical approaches to the treatment of obesity: bariatric surgery. Med Clin North Am. 2011 Sep;95(5):1009-30.
10. Brethauer SA. Sleeve gastrectomy. Surg Clin North Am. 2011 Dec;91(6):1265-1279
11. D'Hondt M, Vanneste S, Pottel H, Devriendt D, Van Rooy F, Vansteenkiste F. Laparoscopic sleeve gastrectomy as a single-stage procedure for the treatment of morbid obesity and the resulting quality of life, resolution of comorbidities, food tolerance, and 6-year weight loss. Surg Endosc. 2011 Aug;25(8):2498-2504.
12. Leonetti F, Capoccia D, Coccia F, Casella G, Baglio G, Paradiso F, et al. Obesity, Type 2 Diabetes Mellitus, and Other Comorbidities: A Prospective Cohort Study of Laparoscopic Sleeve Gastrectomy vs Medical Treatment. Arch Surg. 2012 Apr 16;E1-E6.
13. Kojima M. The discovery of ghrelin--a personal memory. Regul Pept. 2008 Jan 10;145(1-3):2-6.

14. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*. 1999 Dec 9;402(6762):656-660.
15. Yang J, Brown MS, Liang G, Grishin NV, Goldstein JL. Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. *Cell*. 2008 Feb 8;132(3):387-396.
16. Sato T, Nakamura Y, Shiimura Y, Ohgusu H, Kangawa K, Kojima M. Structure, regulation and function of ghrelin. *J Biochem*. 2012 Feb;151(2):119-128.
17. Kojima M, Kangawa K. Ghrelin: from gene to physiological function. *Results Probl Cell Differ*. 2010;50:185-205.
18. Fetissov SO, Laviano A, Kalra S, Inui A. Update on Ghrelin. *International Journal of Peptides*. 2010;2010:1-4.
19. Sakata I, Nakamura K, Yamazaki M, Matsubara M, Hayashi Y, Kangawa K, et al. Ghrelin-producing cells exist as two types of cells, closed- and opened-type cells, in the rat gastrointestinal tract. *Peptides*. 2002 Mar;23(3):531-536.
20. Słupecka M, Wolinski J, Pierzynowski SG. The effects of enteral ghrelin administration on the remodeling of the small intestinal mucosa in neonatal piglets. *Regul Pept*. 2012 Feb 10;174(1-3):38-45.
21. Hass N, Schwarzenbacher K, Breer H. T1R3 is expressed in brush cells and ghrelin-producing cells of murine stomach. *Cell Tissue Res*. 2010 Mar;339(3):493-504.
22. Zhao Z. Characteristic features of ghrelin cells in the gastrointestinal tract and the regulation of stomach ghrelin expression and production. *World Journal of Gastroenterology*. 2008;14(41):6306-6311.
23. Cosentino L, Shaver-Walker P, Heddle JA. The relationships among stem cells, crypts, and villi in the small intestine of mice as determined by mutation tagging. *Dev Dyn*. 1996 Dec;207(4):420-428.
24. Schauser K, Larsson LI. Programmed cell death and cell extrusion in rat duodenum: a study of expression and activation of caspase-3 in relation to C-jun phosphorylation, DNA fragmentation and apoptotic morphology. *Histochem Cell Biol*. 2005 Sep;124(3-4):237-43.
25. Kojima M, Kangawa K. Ghrelin: structure and function. *Physiol Rev*. 2005 Apr;85(2):495-522.
26. Sakata I, Sakai T. Ghrelin cells in the gastrointestinal tract. *Int J Pept*. 2010;2010:1-7.
27. Sonmez MF, Ozan E. Determination of ghrelin immunoreactivity in the rat stomach after fasting and refeeding. *Acta Histochem*. 2007;109(3):193-199.

28. de la Cour CD, Norlen P, Hakanson R. Secretion of ghrelin from rat stomach ghrelin cells in response to local microinfusion of candidate messenger compounds: a microdialysis study. *Regul Pept.* 2007 Oct 4;143(1-3):118-126.
29. Sakata I, Tanaka T, Yamazaki M, Tanizaki T, Zheng Z, Sakai T. Gastric estrogen directly induces ghrelin expression and production in the rat stomach. *J Endocrinol.* 2006 Sep;190(3):749-757.
30. Osawa H, Kita H, Ohnishi H, Nakazato M, Date Y, Bowlus CL, et al. Changes in plasma ghrelin levels, gastric ghrelin production, and body weight after *Helicobacter pylori* cure. *J Gastroenterol.* 2006 Oct;41(10):954-961.
31. Akamizu T, Kangawa K. The physiological significance and potential clinical applications of ghrelin. *Eur J Intern Med.* 2012 Apr;23(3):197-202.
32. Barnett BP, Hwang Y, Taylor MS, Kirchner H, Pfluger PT, Bernard V, et al. Glucose and weight control in mice with a designed ghrelin O-acyltransferase inhibitor. *Science.* 2010 Dec 17;330(6011):1689-1692.
33. Ukkola O. Ghrelin in Type 2 diabetes mellitus and metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol.* 2011 Jun 20;340(1):26-8.
34. Chopin L, Walpole C, Seim I, Cunningham P, Murray R, Whiteside E, et al. Ghrelin and cancer. *Mol Cell Endocrinol.* 2011 Jun 20;340(1):65-69.
35. Murphy G, Kamangar F, Dawsey SM, Stanczyk FZ, Weinstein SJ, Taylor PR, et al. The relationship between serum ghrelin and the risk of gastric and esophagogastric junctional adenocarcinomas. *J Natl Cancer Inst.* 2011 Jul 20;103(14):1123-1129.
36. Murphy G, Kamangar F, Albanes D, Stanczyk FZ, Weinstein SJ, Taylor PR, et al. Serum ghrelin is inversely associated with risk of subsequent oesophageal squamous cell carcinoma. *Gut.* 2011 Dec 16;61:1533-1537
37. Corbetta S, Peracchi M, Cappiello V, Lania A, Lauri E, Vago L, et al. Circulating ghrelin levels in patients with pancreatic and gastrointestinal neuroendocrine tumors: identification of one pancreatic ghrelinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Jul;88(7):3117-3120.
38. Tsolakis AV, Portela-Gomes GM, Stridsberg M, Grimelius L, Sundin A, Eriksson BK, et al. Malignant gastric ghrelinoma with hyperghrelinemia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Aug;89(8):3739-3744.
39. Aydin S, Geckil H, Zengin F, Ibrahim Ozercan H, Karatas F, Turgut-Balik D, et al. Ghrelin in plants: what is the function of an appetite hormone in plants? *Peptides.* 2006 Jul;27(7):1597-1602.

40. Baltasar A, Serra C, Perez N, Bou R, Bengochea M. Re-sleeve gastrectomy. *Obes Surg*. 2006 Nov;16(11):1535-1538.
41. Cohen R, Uzzan B, Bihan H, Khochtali I, Reach G, Catheline JM. Ghrelin levels and sleeve gastrectomy in super-super-obesity. *Obes Surg*. 2005 Nov-Dec;15(10):1501-1502.
42. Langer FB, Bohdjalian A, Felberbauer FX, Fleischmann E, Reza Hoda MA, Ludvik B, et al. Does gastric dilatation limit the success of sleeve gastrectomy as a sole operation for morbid obesity? *Obes Surg*. 2006 Feb;16(2):166-171.
43. Weiner RA, Weiner S, Pomhoff I, Jacobi C, Makarewicz W, Weigand G. Laparoscopic sleeve gastrectomy--influence of sleeve size and resected gastric volume. *Obes Surg*. 2007 Oct;17(10):1297-1305.
44. Mayhew TM, Middleton C. Crypts, villi and microvilli in the small intestine of the rat. A stereological study of their variability within and between animals. *J Anat*. 1985 Aug;141:1-17.
45. de Bona Castelan J, Bettiol J, d'Acampora AJ, Castelan JV, de Souza JC, Bressiani V, et al. Sleeve gastrectomy model in Wistar rats. *Obesity surgery*. 2007 Jul;17(7):957-961.
46. Fitzgerald SM, Flinn S. Evaluating research studies using the analysis of variance (ANOVA): issues and interpretations. *J Hand Ther*. 2000 Jan-Mar;13(1):56-60.
47. Rao RS, Rao V, Kini S. Animal models in bariatric surgery--a review of the surgical techniques and postsurgical physiology. *Obes Surg*. 2010 Sep;20(9):1293-1305.
48. Fischer L, Clemens G, Gehrig T, Kenngott H, Becker K, Bruckner T, et al. Challenges and pitfalls of experimental bariatric procedures in rats. *Obesity facts*. 2012;5(3):359-371.
49. Hosoda H, Kojima M, Mizushima T, Shimizu S, Kangawa K. Structural divergence of human ghrelin. Identification of multiple ghrelin-derived molecules produced by post-translational processing. *J Biol Chem*. 2003 Jan 3;278(1):64-70.
50. Quinn R. Comparing rat's to human's age: How old is my rat in people years? *Nutrition*. 2005;21(6):775-777.
51. Himpens J, Dobbeleir J, Peeters G. Long-term Results of Laparoscopic Sleeve Gastrectomy for Obesity. *Annals of Surgery*. 2010;252(2):319-324.