

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - CAMPUS DE CASCAVEL
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E SAÚDE – MESTRADO

LUANA EMANUELLY SINHORI LOPES

**ATIVIDADE DA ENZIMA DEGRADADORA DE INSULINA NO FÍGADO DE
CAMUNDONGOS OBESOS SUBMETIDOS A GASTRECTOMIA VERTICAL**

CASCAVEL-PR

Junho/2021

LUANA EMANUELLY SINHORI LOPES

**ATIVIDADE DA ENZIMA DEGRADADORA DE INSULINA NO FÍGADO DE
CAMUNDONGOS OBESOS SUBMETIDOS A GASTRECTOMIA VERTICAL**

DISSERTAÇÃO apresentada ao Programa De Pós-Graduação em Biociências e Saúde – Mestrado, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Saúde.

Área de concentração: Biologia, processo saúde-doença e políticas de saúde

ORIENTADOR: Prof. Dr. Antonio Carlos Boschero

COORIENTADORA: Profa. Dra. Maria Lúcia Bonfleur

CASCADEL-PR

Junho/2021

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Sinhori Lopes, Luana Emanuely

Atividade da enzima degradadora de insulina no fígado de camundongos obesos submetidos a gastrectomia vertical / Luana Emanuely Sinhori Lopes; orientador Antonio Carlos Boschero; coorientadora Maria Lúcia Bonfleur. -- Cascavel, 2021.

81 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico Campus de Cascavel) -- Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-Graduação em BioCiências e Saúde, 2021.

1. Obesidade. 2. Insulina. 3. Fígado. 4. Cirurgia bariátrica . I. Boschero, Antonio Carlos, orient. II. Bonfleur, Maria Lúcia, coorient. III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

LUANA EMANUELLY SINHORI LOPES
ATIVIDADE DA ENZIMA DEGRADADORA DE INSULINA NO FÍGADO DE
CAMUNDONGOS OBESOS SUBMETIDOS A GASTRECTOMIA VERTICAL

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Saúde e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.



Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Boschero
UNICAMP



Profa. Dra. Maria Lúcia Bonfleur
UNIOESTE



Profa. Dra. Rosane Aparecida Ribeiro
UEPG

CASCADEL-PR

Junho/2021

*Dedico este trabalho à minha mãe,
Osmarina Sinhori, que sempre me apoiou,
me incentivou e acreditou em mim.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Dr. Antonio Carlos Boschero, que me aceitou como aluna, me recebeu em Campinas e me orientou com muita paciência e respeito. Muito obrigada por todos os ensinamentos.

Às professoras Dra. Maria Lúcia Bonfleur e Dra. Sandra Lucinei Balbo, que me receberam no laboratório ainda na graduação, me orientaram no TCC e, desde então, vêm me ensinando a ser uma pessoa e pesquisadora melhor a cada dia. Não tenho palavras para descrever o quanto sou grata por ter tido essa oportunidade e por todo o aprendizado que tive nestes últimos anos. Vocês são exemplos que vou levar para a vida. Muito Obrigada!

À minha amiga Jakeline Teleken, que sempre me ajudou, me ensinou e esteve ao meu lado em todos os momentos desde o dia em que me conheceu. Amiga, muito obrigada pelo apoio acadêmico, emocional e por essa amizade, da qual eu tenho muito orgulho e respeito. Obrigada por tudo!

À minha amiga Milara Bruna Moi, que me ensinou tudo que eu sei sobre o cuidado com os animais, me recebeu no laboratório e, desde então, está sempre comigo, me apoiando e me ajudando. Muito obrigada pela companhia, pelas tardes após as aulas, pelos dias de laboratório e pela amizade!

Às minhas colegas e amigas Janaina Wolfart e Lilian Pradal; o mestrado me proporcionou a oportunidade de conhecer essas meninas incríveis. Muito obrigada pelo apoio, pela parceria, por terem me acolhido, pelas tardes de estudos, os dias de nervosismo e também pelos dias felizes. Obrigada!

Aos pesquisadores e colegas José Maria, Gabriela Soares e Carine Marmantini, que me auxiliaram desde o início dos experimentos até as últimas análises, me receberam em Campinas e me ensinaram com muita paciência e cuidado. Muito obrigada! Sem vocês, a execução deste trabalho não seria possível.

Às minhas colegas e amigas Elen Carolina Zawoski, Gabriela Alves Bronckzek, Suelen Padilha, Ana Paula Rosolen, Ariadne Barbosa, Ana Carolina Retameiro e Marianela Diaz, muito obrigada pela companhia e pelos ensinamentos, vocês são especiais.

À Capes, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa de estudos.

Aos animais que deram a vida e permitiram a realização da pesquisa e deste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte deste trabalho e me ajudaram no seu desenvolvimento. Muito obrigada!

RESUMO

LOPES, L. E. S. **Atividade da enzima degradadora de insulina no fígado de camundongos obesos submetidos a gastrectomia vertical**. 81 p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, *Campus Cascavel*, Unioeste, 2021.

A obesidade é considerada um problema de saúde pública, pois favorece o desenvolvimento de comorbidades, como doenças cardiovasculares, hiperinsulinemia, resistência à insulina e o diabetes mellitus do tipo 2 (DM2). Visando ao tratamento da obesidade e suas comorbidades, a cirurgia bariátrica surge como uma alternativa eficaz e duradoura para esses pacientes. Dentre os procedimentos bariátricos mais realizados atualmente, destaca-se a gastrectomia vertical (GV), por apresentar efeitos como normalização da glicemia, melhora na sensibilidade à insulina e na concentração de insulina em jejum. A normalização da insulinemia pode ocorrer pela redução na secreção de insulina e/ou pelo aumento na sua depuração (*clearance*) pelo fígado. O *clearance* de insulina é realizado pela enzima degradadora de insulina, do inglês “*insulin degrading enzyme*” (IDE), principalmente no fígado. Contudo, os mecanismos envolvidos no *clearance* de insulina após a GV ainda não estão claros. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi verificar se ocorre a redução da insulinemia em camundongos obesos submetidos a GV e se esta redução se dá pelo aumento no *clearance* de insulina no fígado. Para isso, foram utilizados camundongos machos da linhagem C57Bl6/J, separados em grupo Controle (CTL, n=9) que recebeu dieta padrão e grupo Dieta Hiperlipídica (DH, n=18) que recebeu dieta hiperlipídica. Com 14 semanas de vida, os animais do grupo DH foram divididos em Grupo Dieta Hiperlipídica-falso operado (DH-FO, n=9) que passou pela falsa operação e Grupo Dieta Hiperlipídica-gastrectomia vertical (DH-GV, n=9) que passou pela gastrectomia vertical. Seis semanas após os procedimentos operatórios, os animais passaram pelos testes de tolerância à insulina e glicose (ipITT e ipGTT); em seguida, foram pesados e a glicemia em jejum foi mensurada. Na sequência, o sangue total foi coletado para dosagens plasmáticas de insulina e *peptídeo C*. Além disso, foram coletadas amostras de fígado para avaliar a atividade da enzima IDE. Após a indução da obesidade, o peso corporal, insulinemia e glicemia dos animais do grupo DH foram maiores em relação ao CTL, mostrando a eficiência da dieta para promover o ganho de peso. Após os procedimentos bariátricos, os animais do grupo DH-GV apresentaram redução no peso corporal, normalização da glicemia de jejum, melhora na tolerância à glicose e resistência à insulina, quando comparados com os animais do grupo DH-FO. A insulinemia em jejum dos animais DH-GV foi menor em relação ao grupo DH-FO e igual ao CTL. A insulinemia no estado alimentado dos animais DH-GV foi menor em relação ao DH-FO e maior comparado ao CTL. A concentração de *peptídeo C* em jejum e em estado alimentado dos animais HD-GV foi menor em relação ao grupo DH-FO e ao CTL. A razão *peptídeo C*/insulina, tanto no estado de jejum quanto no estado alimentado dos animais DH-GV, foi maior, quando comparada com o grupo DH-FO, porém, menor em relação ao CTL. A atividade da IDE no grupo DH-GV foi semelhante ao grupo DH-FO e menor comparada ao CTL. A GV foi eficaz na redução do peso corporal, normalização da glicemia e insulinemia de jejum, aumentou o *clearance* de insulina sem alterar a atividade dessa enzima.

Palavras-Chave: obesidade; fígado; insulina; cirurgia bariátrica

ABSTRACT

LOPES, L. E. S. **Activity of the insulin degrading enzyme in the liver of obese mice submitted to vertical gastrectomy.** 81 p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, *Campus Cascavel*, Unioeste, 2021.

Obesity is considered a public health problem, as it contributes to the development of health conditions such as cardiovascular disease, hyperinsulinemia, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus (DM). Aiming at the treatment of obesity and its clinical problems, bariatric surgery appears as an effective and long-lasting alternative for these patients. Among the most frequently performed bariatric procedures, the sleeve gastrectomy (SG) stands out for presenting effects such as normalization of blood glucose, improvement in insulin sensitivity, and fasting insulin concentration. Stabilization of insulinemia occurs through a reduction in insulin secretion and/or an increase in its clearance. Insulin clearance is performed by the insulin-degrading enzyme (IDE), mainly in the liver. However, changes in insulin clearance after SG are not fully elucidated. Thus, the present study aimed to verify whether there is a reduction in insulinemia in obese mice after SG and whether this reduction is due to an increase in insulin clearance in the liver. For this purpose, male mice of the C57BL/6 lineage were used, initially separated into a Control group (CTL, n=9) that received a standard diet, and a High-fat Diet group (DH, n=18) that received a high-fat diet. At 14 weeks of life, the animals in the DH group were subdivided into a High-fat diet-false-operated Group (DH-FO, n=9) which underwent a false operation, and the High-fat diet-sleeve gastrectomy Group (DH-GV, n= 9) submitted to sleeve gastrectomy. After completing 20 weeks, the animals were weighed and measured, and fasting blood glucose was measured. Subsequently, blood was collected for plasma insulin and C-peptide dosages. Furthermore, they were collected from the liver to assess the activity of the IDE enzyme. After the induction of obesity, the body weight, insulin, and glycemia of animals in the DH group were higher compared to the CTL, showing the efficiency of the high-fat diet in increasing weight gain. After bariatric procedures, animals in the DH-GV group showed reduced body weight, stabilization of fasting glucose, improved glucose tolerance, and insulin resistance, compared to animals in the DH-FO group. Fasting insulinemia in DH-GV animals was lower, compared to DH-FO animals, and equal to CTL. Fed insulinemia in DH-GV animals was lower, compared to DH-FO animals, and higher, compared to CTL. The concentration of C-peptide in the fasting and fed state of the DH-GV animals was lower, compared to the DH-FO and CTL group. The C-peptide/insulin ratio, both in the fasting state and in the fed state of the DH-GV animals, was higher, compared to the DH-FO animals, and lower, compared to the CTL group. The IDE activity was similar between the animals of the DH-FO and DH-GV groups and lower than that of the CTL. In conclusion, SG was effective in reducing body weight, stabilizing fasting glycemia and insulinemia; increasing insulin clearance without changing this enzyme's activity.

Keywords: obesity; insulin; bariatric surgery; insulin-degrading enzyme

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Mecanismo de secreção de insulina pelas células β no pâncreas de roedores	25
Figura 2: Tipos de cirurgias bariátricas. Em destaque a GV, utilizada nesse trabalho	29
Figura 3: Delineamento experimental.....	33
Figura 4: Esquema adaptado representativo final após a gastrectomia vertical.	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação de peso segundo o Índice de Massa Corporal (IMC) para adultos.....	22
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

- ABESO** – Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica
- ATP** – Adenosina trifosfato
- Ca²⁺** – Cálcio
- CNA** – Comprimento nasoanal
- CTL** – Controle
- DA** – Doença de Alzheimer
- DGYR** – Derivação gástrica em Y de *Roux*
- DH** – Dieta Hiperlipídica
- DH-FO** – Grupo dieta hiperlipídica falso operado
- DH-GV** – Grupo dieta hiperlipídica gastrectomia vertical
- DHGNA** – Doença hepática gordurosa não alcoólica
- DM2** – Diabetes Mellitus tipo 2
- DP** – Dieta padrão
- GK** – Glicoquinase
- GLP1** – Peptídeo semelhante ao glucagon 1
- GLUT2** – Transportador de glicose tipo 2
- GLUT4** – Transportador de glicose tipo 4
- GV** – Gastrectomia vertical
- G-6-P** – Glicose-6-fosfato
- IDE** – Enzima degradadora de insulina, do inglês “*insulin degrading enzyme*”
- IDE-KO** – Knockout para o gene IDE
- IMC** – Índice de massa corporal
- ipGTT** – Teste intraperitoneal de tolerância à glicose
- ipITT** – Teste intraperitoneal de tolerância à insulina
- IR** – Receptor de insulina, do inglês “*insulin receptor*”
- K⁺** – Potássio
- kDA** – Quilo Dalton
- mRNA** – RNA mensageiro
- OMS** – Organização Mundial da Saúde
- PYY** – Peptídeo YY

RI – Resistência à insulina

SBCBM – Sociedade Brasileira de Cirurgia Bariátrica e Metabólica

SUS – Sistema Único de Saúde

TNF – Fator de necrose tumoral

UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas

VIGITEL – Sistema de vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	17
OBJETIVOS	20
Objetivo Geral	20
Objetivos Específicos	20
REVISÃO DE LITERATURA	21
Obesidade	21
Insulina	23
Enzima Degradadora de Insulina (IDE)	26
Cirurgia Bariátrica	27
Modelo de Obesidade	30
METODOLOGIA	32
Animais	32
Dietas	33
Avaliação do peso	33
Cuidados pré-operatórios	33
Procedimentos cirúrgicos	34
Cuidados pós-operatórios	35
Teste de tolerância à glicose (ipGTT) e Teste de tolerância à insulina (ipITT)	36
Dosagem de insulina e <i>peptídeo C</i>	37
Eutanásia	37
Atividade enzimática da IDE	37
Análises estatísticas	38
ARTIGO CIENTÍFICO	39
CONSIDERAÇÕES/CONCLUSÕES FINAIS	58
REFERÊNCIAS GERAIS	60
ANEXO I – PARECER COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	72
ANEXO II – NORMAS PARA SUBMISSÃO REVISTA DIABETES, OBESITY AND METABOLISM	73
ANEXO III – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO	82

INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença crônica cuja incidência vem aumentando nos últimos anos, tanto no Brasil quanto no mundo. Mundialmente, em 2016, 39% dos adultos estavam com sobrepeso e 13% obesos, representando um aumento de 4% para 18% nos últimos 40 anos (WHO, 2018a). No Brasil, em 2019, a frequência de adultos com excesso de peso foi de 60,3% e de obesos foi de 26,8% (BRASIL, 2020). Uma pesquisa do Ministério da Saúde mostrou que a obesidade no Brasil aumentou 67,8% entre 2006 e 2018 (BRASIL, 2019a).

Por se tratar de uma doença multifatorial, diversos fatores podem levar à obesidade, como: fatores genéticos, endócrinos, ambientais e, principalmente, comportamentais (TAVARES; NUNES; SANTOS, 2010; KRZYSZTOSZEK; WIERZEJSKA; ZIELIŃSKA, 2015). A obesidade está associada ao desenvolvimento de comorbidades, como problemas cardiovasculares, apneia do sono e alguns tipos de câncer. Além disso, a maioria dos pacientes obesos apresenta hiperinsulinemia, que pode levar à resistência à insulina (RI) e, conseqüentemente, ao desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (SOWERS, 1998; WANG; BEYDOUN, 2007; SBEM, 2008; ROSIEK et al., 2015; REIS et al., 2016).

A DM2 é uma doença que se caracteriza pela deficiência na secreção de insulina e/ou pela falha da ação desse hormônio, o que é chamado de RI (WHO, 2018b). Tanto a obesidade quanto a DM2 estão relacionadas à RI e hiperinsulinemia (KAHN; HULL; UTZCHNEIDER, 2006; KELLY et al., 2014). O desenvolvimento de RI e alterações no metabolismo da glicose são, em geral, processos graduais, que podem ser desencadeados pelo ganho de peso e obesidade. A redução da sensibilidade à insulina prejudica a utilização e o armazenamento dos carboidratos, aumentando a concentração de glicose sanguínea e estimulando o aumento compensatório da secreção de insulina, podendo levar à hiperinsulinemia (FU; GILBERT; LIU, 2013).

Estudos mostram a hiperinsulinemia como chave desencadeadora do processo patológico, levando à redução da sensibilidade dos receptores de insulina, resultando na RI e DM2 (GAVIN et al., 1974; KANETY et al., 1994). A insulina é produzida pelas células β no pâncreas e secretada principalmente em resposta ao aumento da concentração de glicose sanguínea. Em roedores, quando a

concentração de glicose circulante aumenta, esse nutriente é internalizado nas células β -pancreáticas pelos transportadores de glicose do tipo 2 (GLUT2). A glicose é, então, fosforilada a glicose-6-fosfato (G-6-P) e, em seguida, é oxidada, formando adenosina trifosfato (ATP). O ATP fecha os canais de K^+ -dependentes de ATP, despolariza as células β , e provoca a abertura dos canais Ca^{2+} -voltagem dependentes, resultando em influxo de Ca^{2+} que estimula a fusão das vesículas que contêm insulina com a membrana plasmática, permitindo a liberação do hormônio para o meio extracelular (JAHN; FASSHAUER, 2012; RUTTER et al., 2015).

Dois processos controlam a concentração de insulina no sangue: a secreção de insulina pelas células β do pâncreas e a depuração ou *clearance* de insulina, que ocorre principalmente no fígado, pela ação da enzima degradadora de insulina, do inglês “*insulin degrading enzyme*” (IDE). A IDE está presente em todos os tecidos, porém, em maior quantidade no fígado. Resumidamente, o *clearance* de insulina ocorre em três etapas: 1) a insulina se liga ao seu receptor (IR); 2) esse complexo insulina receptor é internalizado; e 3) ocorre a fragmentação da insulina pela enzima IDE no citoplasma (DUCKWORTH; BENNET; HAMEL, 1998; BRANDIMARTI et al., 2013). Assim, a redução na expressão ou atividade da IDE pode resultar na redução do *clearance* de insulina e, conseqüentemente, piorar o quadro de hiperinsulinemia. Além disso, defeitos na atividade da IDE estão ligados ao desenvolvimento de DM2 e doença de Alzheimer (DA). Curiosamente, animais nocaute para a IDE (IDE-KO) apresentam acúmulo do $A\beta$ -amiloide no cérebro (uma característica da DA), além de hiperinsulinemia e intolerância à glicose. A inativação da IDE em camundongos IDE-KO induz hiperinsulinemia e RI (FARRIS et al., 2003). A hiperinsulinemia resulta do aumento na secreção de insulina, associado à redução do seu *clearance*, em resposta à RI. Desse modo, reduzir a insulinemia pode ser uma estratégia para o tratamento de doenças relacionadas à obesidade e ao DM2.

Dentre os tratamentos indicados para a obesidade e DM2, destaca-se a cirurgia bariátrica, a qual é utilizada no tratamento de pacientes obesos mórbidos ($IMC > 40 \text{ Kg/m}^2$), pois promove redução sustentada do peso, além de melhora nas comorbidades associadas, normalizando as concentrações de glicose e insulina, e controlando a DM2 (DÉJARDIN et al., 2004; ZIMMET et al., 2011; STRATMANN et al., 2016). Dentre as operações bariátricas mais realizadas no mundo, destaca-se a gastrectomia vertical (GV), uma cirurgia do tipo restritiva, em que o estômago tem o volume reduzido a 20% do seu tamanho original, formando um tubo gástrico contínuo

entre o esôfago e o estômago. A GV promove rápido esvaziamento gástrico e trânsito intestinal acelerado, aumento da saciedade, aumento no GLP-1, PYY, remissão no DM2, redução de quadros de hipertensão, entre outros benefícios. Além disso, é considerada uma cirurgia de baixa complexidade técnica e possui baixo índice de complicações cirúrgicas (ALBANOPOULOS et al., 2015; UCLA, 2019).

A GV melhora a secreção, a sensibilidade à insulina, a tolerância à glicose e promove remissão a DM2, mesmo antes da redução do peso corporal (ALBANOPOULOS et al., 2015; DOUROS et al., 2019; ZETU et al., 2018), contudo, não existem estudos que mostram os efeitos da GV sobre o *clearance* de insulina e a sua relação com a IDE.

Com este trabalho, pretendíamos elucidar se a GV tem efeitos na melhora do *clearance* de insulina e para isso, avaliamos em camundongos obesos, submetidos a gastrectomia vertical, se ocorre aumento no *clearance* de insulina e se esse aumento é dependente de alterações na IDE hepática, apresentando a hipótese de que após a gastrectomia vertical ocorre melhora no *clearance* de insulina através de alterações na IDE, permitindo o reestabelecimento da normoinsulinemia.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar se ocorre aumento no *clearance* de insulina hepática após a gastrectomia vertical em camundongos obesos por dieta hiperlipídica e se esse aumento está relacionado à atividade da IDE em camundongos obesos por dieta hiperlipídica.

Objetivos Específicos

Avaliar os efeitos da GV em camundongos obesos pela dieta hiperlipídica sobre o peso corporal, glicemia e insulinemia.

Avaliar se a GV promove alterações no *clearance* de insulina e na atividade da enzima degradadora de insulina (IDE) hepática, em camundongos obesos por dieta hiperlipídica.

REVISÃO DE LITERATURA

Obesidade

A obesidade é uma doença multifatorial, definida como acúmulo excessivo de gordura local ou generalizada (LUZ; ENCARNAÇÃO, 2008; WHO, 2018a), decorrente do desequilíbrio energético ou balanço energético positivo, em que a energia consumida excede o gasto, levando ao ganho de peso (HILL; COMMERFORD, 1996; CABALLERO, 2007). Essa doença se manifesta em todas as faixas etárias e grupos econômicos, tornando-a um dos maiores problemas atuais de saúde pública no mundo atualmente (CABALLERO, 2007; CHAVES; DESTEFANI, 2016; ABESO, 2019).

A prevalência mundial da obesidade triplicou nos últimos 40 anos. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2016, cerca de 1,9 bilhões de adultos apresentavam excesso de peso e, destes, mais de 650 milhões eram obesos, incluindo cerca de 340 milhões de crianças ou adolescentes acima do peso ou obesas (WHO, 2018a). Estima-se que, em 2025, cerca de 2,3 bilhões de adultos estarão com sobrepeso e mais de 700 milhões, obesos (ABESO, 2019). No Brasil, a obesidade vem crescendo rapidamente. Segundo o Ministério da Saúde, entre 2006 e 2018, a incidência de obesidade aumentou 67,8%. A Pesquisa Nacional de Saúde mostrou que, em 2019, a frequência de adultos com excesso de peso foi de 60,3% e a frequência de adultos obesos foi de 26,8% (BRASIL, 2019a; BRASIL, 2020).

Para o diagnóstico de sobrepeso e obesidade em adultos, o método mais utilizado é o Índice de Massa Corporal (IMC), definido como o peso em quilogramas dividido pelo quadrado da altura em metros (kg/m^2). Indivíduos com IMC entre 25,0 e 29,9 Kg/m^2 são classificados com sobrepeso; aqueles com IMC iguais ou superiores a 30,0 Kg/m^2 são considerados obesos (WHO, 2018a) (Tabela 1).

Tabela 1: Classificação de peso segundo o Índice de Massa Corporal (IMC) para adultos**Fonte:** Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica (ABESO)

IMC (KG/M ²)	CLASSIFICAÇÃO	OBESIDADE GRAU/CLASSE	RISCO DE DOENÇA
<18,5	Magro ou baixo peso	0	Normal ou elevado
18,5-24,9	Normal ou eutrófico	0	Normal
25-29,9	Sobrepeso ou pré-obeso	0	Pouco elevado
30-34,9	Obesidade	I	Elevado
35-39,9	Obesidade	II	Muito elevado
≥40,0	Obesidade grave	III	Muitíssimo elevado

O desenvolvimento da obesidade é multifatorial e está relacionado com o aumento do sedentarismo aliado à redução ou nenhuma prática de exercícios físicos. Além disso, a mudança na dieta ocidental, em que alimentos ricos em carboidratos complexos, fibras, frutas, verduras são facilmente substituídas por alimentos ricos em carboidratos refinados, de rápida ingestão, ricos em gorduras animais e óleos vegetais, pré-processados, associados a *fast foods* e bebidas doces, que contribuem para a prevalência da obesidade (BLEIL, 1998; VEDANA et al., 2008; BIDDLE et al., 2010; WHO, 2018a; NICOLAIDIS, 2019). Esse excesso de energia ingerido é armazenado principalmente na forma de gordura que se acumula comumente nos adipócitos subcutâneos e ao redor dos órgãos (MALONE; HANSEN, 2019). Além disso, outros fatores podem levar à obesidade, dentre eles estão os fatores: genéticos, endócrinos, metabólicos, ambientais e, principalmente, comportamentais, resultados da interação entre a predisposição genética e influências ambientais por meio de mecanismos epigenéticos (HUBERT et al., 1983; BIDDLE et al., 2010; KRZYSZTOSZEK; WIERZEJSKA; ZIELIŃSKA, 2015; DI CIAULA; PORTINCASA, 2017).

A obesidade é considerada um fator de risco à saúde humana, pois traz consigo diversas comorbidades associadas, agravando o quadro clínico da doença. Entre estas, doenças cardiovasculares, dislipidemias, hipertensão, doenças respiratórias e distúrbios metabólicos, como a hiperinsulinemia. A inflamação dos adipócitos

decorrente da obesidade, além da produção de citocinas pró-inflamatórias, podem causar estresse oxidativo e levar à inativação do transportador de glicose (GLUT4), produzindo hiperinsulinemia (VECCHIÉ et al., 2017; MALONE; HANSEN, 2019). Associado a isso, defeitos no *clearance* de insulina também resultam em hiperinsulinemia (NAJJAR; PERDOMO, 2002). Pacientes obesos hiperinsulinêmicos estão propensos a desenvolver RI, que é uma disfunção metabólica base do DM2 (SOWERS, 1998; WANG; BEYDOUN, 2007; SBEM, 2008; ROSIEK et al., 2015; REIS et al., 2016). A hiperinsulinemia está associada a doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer (STOLAR, 1988; BALKAU et al., 2001; PAN; HONG, 2014; LIU et al., 2016; WILLIAMS; WU, 2016).

Indivíduos com IMC acima de 35 (obesidade grau II e grau III) apresentam menor taxa de depuração (*clearance*) de insulina, quando comparados com pacientes com IMC normal, havendo uma correlação inversa, em que o *clearance* de insulina diminui à medida que o IMC aumenta (ERDMANN et al., 2009). A exposição crônica à hiperinsulinemia leva à RI, portanto, reduzir a insulinemia apresenta-se como uma estratégia para a prevenção e tratamento de doenças relacionadas à obesidade e à RI.

Insulina

A insulina é um hormônio essencial para a homeostase glicêmica. Esse hormônio é produzido pelas células β no pâncreas. Em condições fisiológicas normais, sua produção é estimulada em concentrações de glicose limiares no plasma, entre 2-4 mM, permitindo que o estoque de insulina nessas células seja mantido em quantidades suficientes para garantir sua liberação adequada (BOLAND; RHODES; GRIMSBY, 2017).

A insulina é formada por uma cadeia A e uma cadeia B, unidas por duas ligações de dissulfeto. Sua síntese acontece em três etapas, iniciando pela tradução do mRNA, formando o peptídeo pré-pró-insulina; esse peptídeo é clivado no retículo endoplasmático por meio da remoção da sua porção N-terminal chamada de peptídeo sinal formando a pró-insulina; a pró-insulina é transportada ao complexo de Golgi, onde ocorre a excisão do *peptídeo C*, convertendo então a pró-insulina em insulina. A insulina e o *peptídeo C* são armazenados em grânulos e liberados em concentrações

equimolares em resposta ao aumento da concentração de glicose (BOLAND; RHODES; GRIMSBY, 2017; VAKILIAN; TAHAMTANI; GHAEDI, 2019).

O principal regulador da secreção de insulina nas células β é a concentração de glicose circulante no plasma. Apesar de a glicose ser o principal mediador da secreção desse hormônio, aminoácidos, ácidos graxos, incretinas, alguns neurotransmissores e outros hormônios também podem influenciar sua secreção (BOLAND; RHODES; GRIMSBY, 2017).

Em roedores, a secreção de insulina pelas células β pancreáticas ocorre após o influxo de glicose por meio de uma proteína integral de membrana chamada transportador de glicose do tipo 2 (GLUT2). Após a internalização da glicose, ela é fosforilada em glicose-6-fosfato (G6P) pela enzima glicocquinase (GK), e segue por meio da glicólise, até formar 2 moléculas de piruvato que são transportadas para a mitocôndria, onde são oxidadas e geram energia na forma de adenosina trifosfato (ATP). O aumento da razão ATP/ADP resulta no fechamento dos canais de potássio (K^+) sensíveis a ATP (ou ATP dependentes), impedindo que o K^+ deixe a célula, despolarizando, assim, a membrana plasmática. Essa despolarização leva à abertura de canais de Ca^{2+} voltagem dependentes, e grande influxo deste cátion ocorre por meio desses canais. O Ca^{2+} dentro da célula, agora em concentrações maiores, estimula o processo de fusão dos grânulos de insulina com a membrana plasmática e a exocitose de insulina na corrente sanguínea (JAHN; FASSHAUER, 2012; RUTTER et al., 2015) (Figura 1).

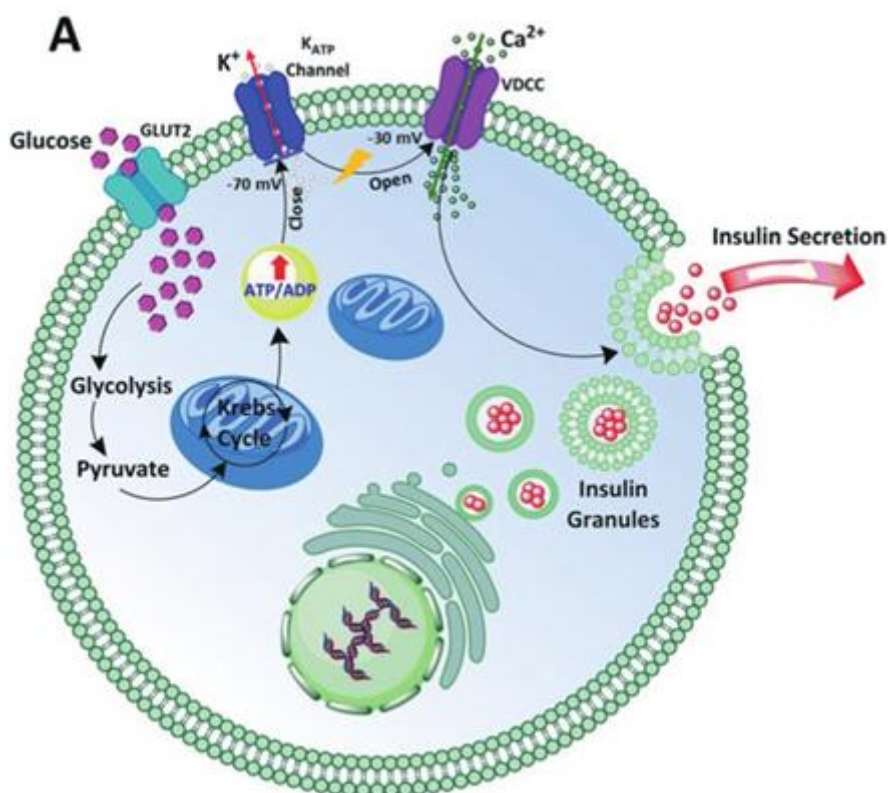


Figura 1: Mecanismo de secreção de insulina pelas células β no pâncreas de roedores

Fonte: Castiello, Heilemana e Tabriziana (2015)

A ação da insulina nos tecidos-alvos ocorre quando ela se liga ao seu receptor (IR). Esse receptor é formado por duas subunidades α e duas subunidades β . A insulina se liga à subunidade α , levando à autofosforilação da subunidade β , promovendo uma sequência de reações intracelulares, geralmente anabólicas, incluindo a translocação do transportador de glicose tipo 4 (GLUT4) para a membrana celular, permitindo a captação dessa hexose (GUO, 2014).

A insulina é responsável por aumentar a captação de glicose, principalmente nos tecidos adiposo e muscular, estimular a síntese proteica e de glicogênio, reduzir a produção de glicose pelo fígado, por meio do bloqueio da gliconeogênese e glicogenólise, induzir a lipogênese no fígado e no tecido adiposo, além de reduzir a lipólise (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002; ZECCHIN; CARVALHEIRA; SAAD, 2004). O aumento na secreção de insulina é o resultado compensatório à RI, ao contrário, a redução do *clearance* de insulina resulta em hiperinsulinemia. Após a liberação da insulina e sua entrada na veia porta, ela passa primeiramente pelo fígado, onde cerca de 50 a 80% dela é degradada (NAJJAR, 2002). Dessa forma, o fígado é

considerado um regulador da concentração de insulina que chega aos tecidos periféricos, por meio de um processo chamado depuração ou *clearance* de insulina. Visto isso, a manutenção da concentração de insulina plasmática depende, basicamente, de dois processos: a secreção de insulina pelo pâncreas e a sua remoção, chamada de *clearance* de insulina.

Enzima Degradadora de Insulina (IDE)

O *clearance* de insulina é realizado principalmente pela enzima degradadora de insulina, do inglês: “*insulin degrading enzyme*” (IDE). Essa enzima é uma zinco-metaloproteinase presente em vários compartimentos, incluindo citoplasma, vesículas intracelulares, membrana plasmática, mitocôndrias, meio extracelular e, principalmente, o fígado. Além da insulina, essa enzima também é responsável por degradar glucagon, amilina e β amiloide (VALERA MORA et al., 2003; PIVOVAROVA et al., 2016; TANG, 2016). A IDE é formada por dois domínios IDE-N e IDE-C com 55 kDa, conectados por um ligante, formando uma proteína final de 110 kDa, permitindo que a enzima apresente pelo menos dois estados conformacionais, aberto e fechado. Na ausência de substrato, a IDE se apresenta no estado conformacional aberto e, em contato com um substrato (insulina), seu estado conformacional é alterado para fechado (TANG, 2016).

A meia-vida curta da insulina circulante, apenas seis min, se deve, provavelmente, à alta eficiência no mecanismo de depuração, que se dá por três passos: a) a insulina se liga ao seu receptor na membrana plasmática; b) o complexo insulina-IR é internalizado; e c) a IDE cliva a insulina, gerando fragmentos não funcionais (DUCKWORTH; BENNET; HAMEL, 1998; BRANDIMARTI et al., 2013; MANOLOPOULOU et al., 2009).

A falha no *clearance* de insulina pode resultar em hiperinsulinemia, e o mesmo ocorre com a redução de sua atividade, que também foi relacionada à RI e obesidade (NAJJAR; PERDOMO, 2019). Pacientes com DM2 e doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) expressam menos IDE no fígado, quando comparados com pacientes com DHGNA sem DM2 ou pacientes saudáveis. Ainda, verificou-se menor expressão de IDE hepática em pacientes obesos, comparados a indivíduos magros

não diabéticos, propondo-se que uma redução na atividade da IDE poderia ser o elo primário de algumas doenças (PIVOVAROVA et al., 2015).

Camundongos nocaute de IDE (IDE-KO) apresentam diminuição no *clearance* de insulina em torno de 48-58% em comparação com os animais controles (FARRIS et al., 2003). Ressalta-se que camundongos IDE-KO possuem intolerância à glicose e hiperinsulinemia, indicando que a deficiência na IDE pode levar ao desenvolvimento do DM2 (FAKHRAI-RAD et al., 2000). Camundongos IDE-KO apresentam fenótipo diabético aos seis meses de vida, resultante de um efeito compensatório à hiperinsulinemia crônica, causada pela deleção completa de IDE ao longo da vida, quando comparados com os animais controle (ABDUL-HAY et al., 2011). Consequentemente, um desequilíbrio entre a secreção e o *clearance* de insulina pode alterar significativamente a insulinemia, podendo levar a quadros de hiperinsulinemia e ao desenvolvimento de DM2 (ERDMANN et al., 2009; NAJJAR; PERDOMO, 2019).

O DM2 é uma doença caracterizada inicialmente pela RI e por um defeito na secreção e/ou ação desse hormônio pelas células β -pancreáticas, o que gera um mecanismo de compensação dessas células objetivando um aumento na produção e secreção de insulina. A produção excessiva de insulina resulta na falha das células β , estabelecendo a DM2 (PRENTKI; NOLAN, 2006; OKWECHIME; ROBERSON; ODOI, 2015). De acordo com a Federação Internacional de Diabetes, 436 milhões de pessoas apresentam diabetes no mundo e, destes, 90% apresentam DM2, e estimativas mostram que, em 2045, cerca de 700 milhões de pessoas estarão com essa doença. No Brasil, em 2019, 16,8 milhões de pessoas estavam com diabetes e esse número subirá para 26 milhões em 2045 (IDF, 2019). Dentre os fatores que podem levar ao desenvolvimento do DM2, estão fatores genéticos, idade, sedentarismo, excesso de peso e obesidade (ALBERTI; ZIMMET; SHAW, 2007).

Cirurgia Bariátrica

O tratamento da obesidade e, conseqüentemente, as comorbidades associadas a esta doença, é complexo e multidisciplinar. Atualmente, existem formas de tratar a obesidade, como mudanças no estilo de vida por meio de dietas restritivas associadas à atividade física e aos tratamentos farmacológicos. O objetivo maior é a redução e manutenção duradoura do peso corporal, bem como melhora das

comorbidades associadas à obesidade. Contudo, esses tratamentos se tornam insuficientes em casos de pacientes com obesidade mórbida ($IMC > 40 \text{ Kg/m}^2$), geralmente refratários ao treinamento físico. Dessa forma, a cirurgia bariátrica surge como alternativa eficaz para o tratamento desses pacientes, em longo prazo.

Além da perda de peso prolongada, os procedimentos bariátricos promovem redução de comorbidades como osteoartrite, melhora na disfunção respiratória, na qualidade de vida e redução de fatores de risco cardiovasculares, com os pacientes apresentando redução na concentração plasmática de triglicérides, melhora no controle glicêmico e controle do DM2 (KARAMANAKOS et al., 2008; ABU-JAISH; ROSENTHAL, 2010; CHANG et al., 2014; MINGRONE et al., 2015; LEE; ALMALK, 2017).

O número de cirurgias bariátricas vem aumentando nos últimos anos. Segundo a Federação Internacional de Obesidade e Cirurgia Metabólica (IFSO), foram realizadas 833.687 cirurgias bariátricas no mundo em 2019. Somente no Brasil, entre 2011 e 2018, o número de procedimentos aumentou 84,73%, e em 2019 foram realizadas 68.530 cirurgias bariátricas (BRASIL, 2019b; SBCBM, 2020). O Sistema Único de Saúde (SUS) apresentou aumento de 215% no número de cirurgias entre 2008 e 2017 (SBCBM, 2018), sendo que, apenas em 2019, foram realizadas cerca de 12.568 mil cirurgias pelo sistema público, aumento de 10,2%, se comparado com 2018, obviamente acarretando despesas da ordem de dezenas de milhões de reais (BRASIL, 2019b; SBCBM, 2020). De acordo com a Sociedade Brasileira de Cirurgia Bariátrica e Metabólica (SBCBM), existem no Brasil cerca de 4,9 milhões de pessoas elegíveis a cirurgia bariátrica (SBCBM, 2018). São considerados elegíveis para a cirurgia bariátrica pacientes que apresentam obesidade mórbida ($IMC > 40,0 \text{ kg/m}^2$), ou pacientes que possuem $IMC > 35,0 \text{ kg/m}^2$ com comorbidades associadas, como DM2, hipertensão, dislipidemias e apneia obstrutiva do sono (FRIED et al., 2014).

As cirurgias bariátricas podem ser classificadas de três formas: restritivas, disabsortivas e mistas (DÉJARDIN et al., 2004; ABU-JAISH; ROSENTHAL, 2010). Nos procedimentos restritivos, ocorre a modificação do estômago, com o objetivo de reduzir a cavidade gástrica e, como consequência, o paciente terá a sensação de saciedade com ingestão de volume menor de alimento. Os procedimentos disabsortivos envolvem alterações no trato intestinal que provocam a redução da área de absorção de nutrientes. Enquanto nos procedimentos mistos, além da redução no volume do estômago, o intestino delgado do paciente também é alterado (redução da

área absorptiva), associando-se assim ambos os procedimentos anteriores (DAMASO; TOCK, 2005; TACK; DELOOSE, 2014) (Figura 2).

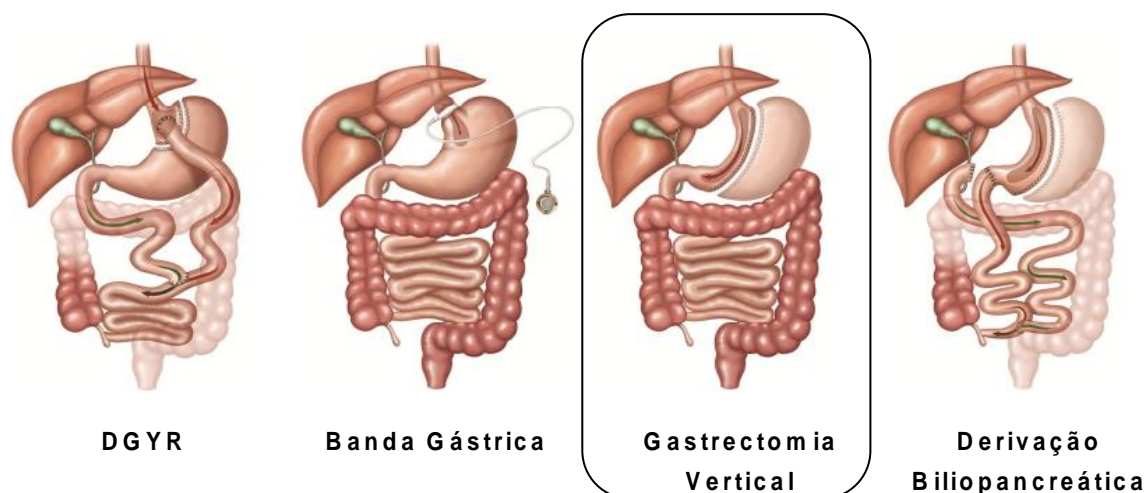


Figura 2: Tipos de cirurgias bariátricas. Em destaque a GV, utilizada neste trabalho

Fonte: Al-Najim, Docherty e Roux (2018)

Atualmente, um dos procedimentos bariátricos mais realizados no mundo é a gastrectomia vertical (GV) (CLAYTON; CARUCCI, 2018). Essa cirurgia é do tipo restritiva, com preservação do piloro e redução de 80% do volume do estômago, ao longo da curvatura maior, formando um tubo gástrico em continuidade com o esôfago e o duodeno (Figura 2). A GV promove rápido esvaziamento gástrico, trânsito intestinal acelerado e aumento da saciedade. Pacientes submetidos a GV apresentaram aumento na produção de glucagon, GLP-1, PPY e redução da produção de grelina (GOITEIN et al.; 2012; BENAIGES et al., 2015). Como consequência, promove redução no peso corporal, redução da massa gorda e melhora na tolerância à glicose, redução da hipertensão, da dislipidemia, da apneia do sono e compensação da DM2 (ALBANOPOULOS et al., 2015; UCLA, 2019). Contudo, as desvantagens incluem o risco de complicações de grampeamento, refluxo gastroesofágico e sua irreversibilidade (FREZZA, 2007; BENAIGES et al., 2015).

A redução de peso em pacientes que realizaram GV foi de $24,7 \pm 6,6\%$, enquanto nos tratados apenas com medicação tradicional (estipulado pela Associação Americana de Diabetes) foi de apenas $5,2 \pm 7,7\%$ (SCHAUER et al., 2012). Em pacientes submetidos a GV, a taxa de remissão de diabetes foi de 93,3% um ano após

o procedimento (ZETU et al., 2018). Um estudo comparando pacientes submetidos a cirurgia bariátrica com pacientes submetidos a tratamento farmacológico intensivo (hipoglicemiantes via oral ou insulina) mostrou remissão do DM2 em 80% dos pacientes submetidos a cirurgia, além de melhora da síndrome de apneia do sono e redução do uso de medicamentos para hipertensão e dislipidemias, em comparação com os pacientes submetidos ao tratamento farmacológico em que, além de permanecerem diabéticos, continuaram ou aumentaram o uso de medicamentos para hipertensão e dislipidemias (LEONETTI et al., 2012).

A GV melhorou a secreção de insulina e a depuração de glicose em camundongos obesos por dieta hiperlipídica, quando comparados ao falso operado (DOUROS et al., 2019). Pacientes que foram submetidos a GV apresentaram melhora no metabolismo glicêmico no décimo dia após a cirurgia e essa melhora se manteve após 6 meses (SIEBER et al., 2014; SMEU et al., 2015; CASELLA et al., 2016). Diante disso, pode-se concluir que a GV tem efeitos benéficos na melhora do metabolismo glicêmico e controle do DM2, porém, ainda não foram descritos todos os mecanismos responsáveis por essa melhora e se essas alterações podem ser decorrentes de mudanças no *clearance* de insulina e atividade da IDE.

Modelo de Obesidade

Atualmente, têm-se utilizado modelos de indução de obesidade, visando à compreensão dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia da obesidade. Dentre eles, estão indução de obesidade por mutações genéticas e modelos de indução de obesidade por alimentação, tendo como espelho o hábito alimentar humano, por exemplo, dieta de cafeteria, dietas hipercalóricas e dietas hiperlipídicas (DARKHAL et al., 2015).

A dieta hiperlipídica se assemelha ao hábito alimentar da população atual, contendo alimentos gordurosos, carboidratos, alimentos ultraprocessados e açúcares. Além disso, essa dieta apresenta respostas metabólicas em roedores semelhantes às decorrentes em humanos, estando associada com diversas doenças crônicas e fatais, como doenças cardiovasculares, esteatose hepática, DM2 e outras desordens metabólicas (ROSINI et al., 2012; DARKHAL et al., 2015). A dieta hiperlipídica

promove aumento do tecido adiposo, ganho de peso, RI e aumento no peso do fígado (GHIBAUDI et al., 2002; LEE et al., 2015; LIN et al., 2016).

Camundongos alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram aumento de peso corporal e adiposidade, quando comparados com os animais do grupo controle, apesar do consumo alimentar ter sido menor (LANG et al., 2019). Além do aumento do peso, animais alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram hiperinsulinemia, intolerância à glicose, RI e aumento no peso do fígado e tecido adiposo com 12-14 semanas de dieta hiperlipídica (KOTHARI et al., 2016). A dieta hiperlipídica também levou à inflamação do tecido adiposo gonadal com expressão de citocinas pró-inflamatórias, como TNF e esteatose hepática a partir da 24ª semana de dieta hiperlipídica (HEIJDEN et al., 2015).

Camundongos que receberam dieta hiperlipídica tiveram uma redução na depuração de insulina, quando comparados com os animais do grupo controle (FOLEY et al., 2020). A redução na depuração ou *clearance* de insulina e RI são fatores que podem levar ao desenvolvimento do DM2; dessa forma, fica claro que mais estudos são necessários acerca do *clearance* de insulina, visando ao desenvolvimento de novos tratamentos para esses pacientes.

METODOLOGIA

Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57Bl/6 com 3 semanas de vida. Os animais foram obtidos no Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP e mantidos no Departamento de Biologia Estrutural e Funcional – UNICAMP sob condições de temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro-escuro de 12h. Os animais permaneceram em aclimatação até os 30 dias de vida e receberam ração padrão (Nuvital, Brasil) e água à vontade. Foram alocados quatro animais por caixa. Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas (protocolo nº 5242-1/2019).

A partir da 4ª semana de vida, os animais foram separados em dois grupos: 1) Grupo Controle (CTL), que recebeu dieta padrão para roedores e água à vontade durante todo o experimento; e 2) Grupo Dieta Hiperlipídica (DH) que recebeu dieta hiperlipídica e água à vontade durante todo o experimento. Com 14 semanas de vida, os animais do grupo DH foram subdivididos em dois grupos (Figura 3):

1) Grupo Dieta Hiperlipídica + Falso Operado (DH-FO), em que os animais foram submetidos à falsa operação;

2) Grupo Dieta Hiperlipídica + Gastrectomia Vertical (DH-GV), em que os animais foram submetidos à gastrectomia vertical.

Os animais foram *eutanasiados* com 20 semanas de vida. Na Figura 3, apresentamos o delineamento experimental.

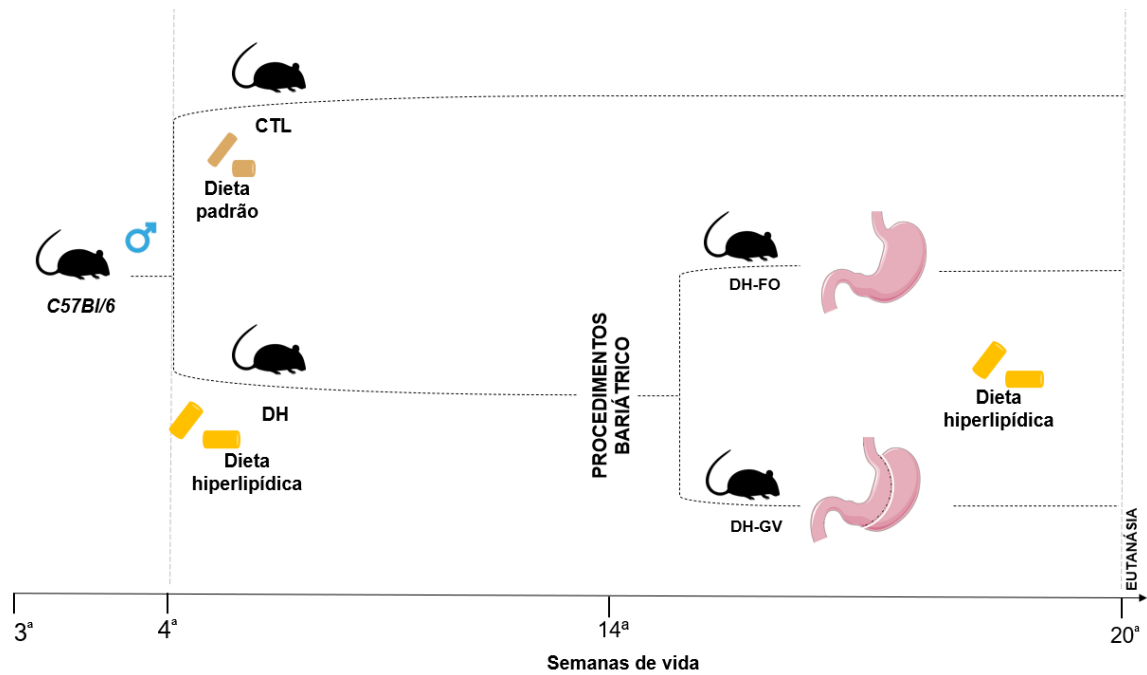


Figura 3: Delineamento experimental

Fonte: A autora

Dietas

A dieta padrão (DP) para roedores foi obtida no Biotério Central da UNICAMP (Nuvital, Brasil); ela possui 3,8 kcal/g e 10% de gordura na sua composição. A dieta hiperlipídica (DH) foi adquirida da empresa PragSoluções (Brasil) e possui 4,9 kcal/g e 45% de gordura na sua composição.

Avaliação do peso

Semanalmente, a partir da 4ª semana de vida até o dia da eutanásia, os animais foram pesados individualmente para acompanhamento da evolução do peso corporal.

Cuidados pré-operatórios

Durante os cuidados pré-operatórios e pós-operatórios, os medicamentos utilizados foram: antibiótico Enrofloxacin (Chemitril®, Chemitec®, SP, Brasil) 20

mg/kg, anti-inflamatório Meloxicam (Eurofarma®, SP, BR) 2 mg/kg, analgésicos Tramadol (Vitalis®, Bogotá, Colômbia) 5 mg/kg. Para hidratação dos olhos, a pomada Liposic® (Bausch & Lomb Incorporated, Berlim, Alemanha) e 3 ml de Ringer Lactato (JP Industria Farmacêutica S.A., Ribeirão Preto, BR).

Uma semana antes dos procedimentos, todos os animais receberam dieta líquido-pastosa. No dia da cirurgia, os animais permaneceram em jejum por 12h e, através de intubação nasotraqueal, foram anestesiados com isoflurano a 1% (BioChimico, Rio de Janeiro, Brasil), sob oxigênio a 1 L/min em ventilação espontânea. Receberam, cinco min antes do início da cirurgia, dose única de profilaxia antibiótica intramuscular, anti-inflamatório e analgésico subcutâneo, e foi utilizada pomada para hidratar os olhos do animal durante a cirurgia. Foi utilizada técnica asséptica para preparação do campo operatório e da parede abdominal. Para hidratação, foi realizada injeção subcutânea de solução de Ringer Lactato (3 ml). A temperatura corporal adequada do camundongo foi garantida durante o procedimento cirúrgico pelo uso de aquecedores de mesa.

Procedimentos cirúrgicos

Para a falsa cirurgia, foi realizada uma incisão na linha média epigástrica do abdome dos animais do grupo DH-FO. A cavidade abdominal foi exposta e as alças intestinais foram massageadas, utilizando um cabo de bisturi esterilizado. Antes da sutura, os animais receberam uma dose de antibiótico e analgésico na cavidade abdominal. A laparotomia foi fechada com sutura contínua, por planos, com fio de polipropileno 6-0, assim como a pele.

Para a GV, o abdome dos animais do grupo DH-GV foi aberto por uma incisão na linha média epigástrica. Foi realizada a secção gástrica com uma tesoura a partir do ângulo de His proximal do duodeno com ressecção aproximada de 80% do volume total do estômago, incluindo-se a ressecção completa do fundo gástrico. Foram realizados pontos separados no estômago com fio polipropileno 7-0 no nível do ângulo de His, região medial do corpo e na porção distal do antro. Esses procedimentos asseguram que o estômago residual corresponda ao volume de apenas 20% do total do volume estomacal. Foi administrada, na cavidade abdominal ainda aberta, uma dose de antibiótico e analgésico, como descrito anteriormente. A laparotomia foi

fechada com sutura contínua, por planos, com fio de polipropileno 6-0. A pele também foi fechada com sutura contínua, utilizando fio de polipropileno 6-0 (Figura 4).

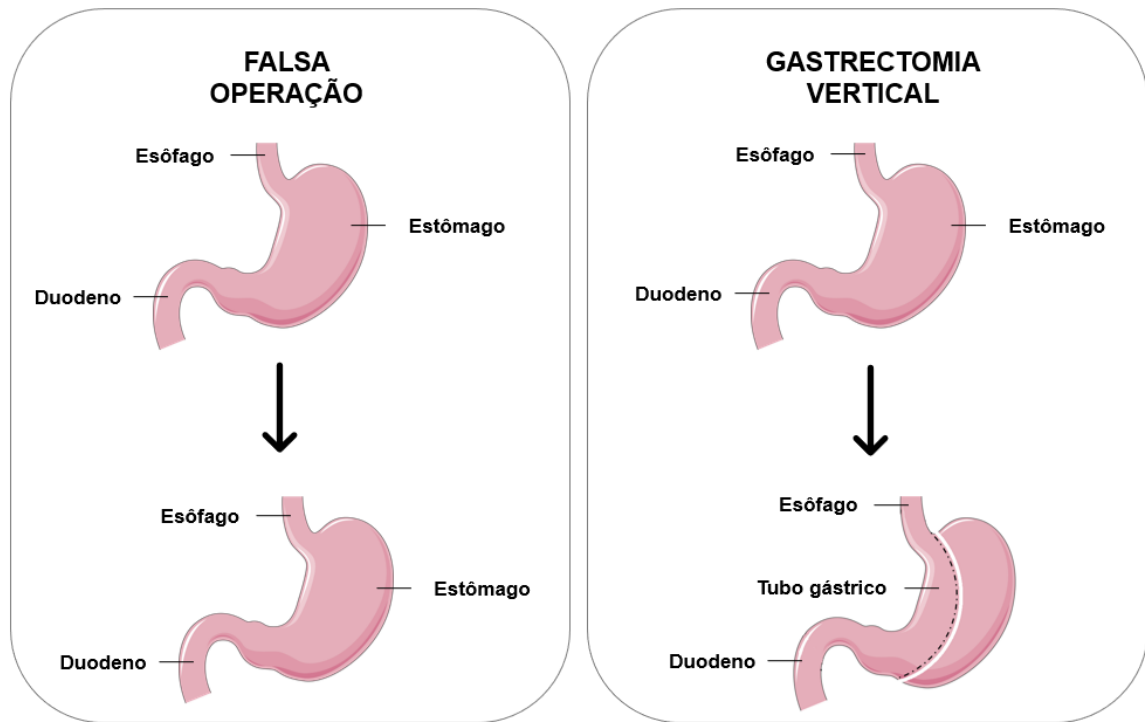


Figura 4: Esquema representativo final após a gastrectomia vertical

Fonte: A autora

Cuidados pós-operatórios

No pós-operatório imediato, os animais receberam solução de Ringer Lactato subcutâneo para hidratação. Na primeira noite após o procedimento, os animais receberam solução de Ringer Lactato com antibiótico, anti-inflamatório e analgésico. Para os dias subsequentes, o procedimento foi o seguinte:

- 1º dia de pós-operatório: Ringer Lactato, antibiótico, anti-inflamatório e analgésico de 12/12 horas.
- 2º dia de pós-operatório: Antibiótico, anti-inflamatório e analgésico de 12/12 horas e hidratação com água de coco associada a 20% de glicose no bebedouro.
- 3º dia de pós-operatório: Antibiótico e hidratação com água de coco associada a 20% de glicose no bebedouro.

- 4º e 5º dias de pós-operatório: Antibiótico, hidratação com água de coco associada a 20% de glicose no bebedouro e dieta hiperlipídica liquidificada e coada no bebedouro.
- 6º dia de pós-operatório: Antibiótico, água, dieta líquida no bebedouro e dieta pastosa na placa de petri.
- 7º e 8º dias de pós-operatório: Água, dieta líquida no bebedouro e dieta pastosa na placa de petri.
- 9º, 10º e 11º dias de pós-operatório: Água e dieta pastosa.

A partir do décimo segundo dia, os animais receberam água no bebedouro e dieta hiperlipídica à vontade até o dia da eutanásia. Durante os 12 dias de pós-operatório, os animais permaneceram em caixas individuais e, a partir do 8º dia, foi introduzida maravalha na caixa. Após o 12º dia de cirurgia, foram alocados 4 animais por caixa novamente.

Teste de tolerância à glicose (ipGTT) e Teste de tolerância à insulina (ipITT)

Foram realizados os testes ipGTT e ipITT pré-operatório com 14 semanas de vida e pós-operatório com 20 semanas de vida.

Para o ipGTT, após jejum de 12 horas, foi feita a coleta de sangue através da cauda dos animais para mensuração da glicemia de jejum (tempo 0), por meio de um glicosímetro (Accu-chek®, Roche, Basileia, Suíça). A seguir, os animais receberam uma injeção intraperitoneal (ip) de solução de glicose (2 g/Kg de PC). A glicemia foi avaliada, novamente, nos tempos 15, 30, 60, 90 e 120 min após a aplicação de glicose.

Para o ITT, os animais permaneceram em jejum por 4 horas. A glicemia de jejum (tempo 0) foi avaliada; em seguida, foi administrada insulina regular HUMULIN® R (LILLY FRANCE S.A.S., Fegersheim, França) (1U/Kg de PC) via intraperitoneal, e a glicemia foi avaliada nos tempos 3, 6, 9, 12, 15 min após a administração.

Dosagem de insulina e *peptídeo C*

Com 20 semanas de vida, foi realizada a dosagem de insulina e *peptídeo C*. As amostras de sangue foram coletadas através da cauda dos animais e a glicemia foi medida pelo glicosímetro. A coleta de sangue dos animais foi realizada, primeiro após jejum de 12h e, em seguida, após a realimentação (30 min de acesso livre à dieta). As amostras de sangue foram centrifugadas a 11000 g por 15 min a 4°C para obtenção do plasma.

Para a dosagem de insulina, foi utilizado o Kit Mercodia Mouse Insulin ELISA (10-1247-1, Sylveniusgatan, Suécia) e, para a dosagem do *peptídeo C*, o Kit ELISA Rat/Mouse C-Peptide 2 (Cat. EZRMCP2-21K, Darmstadt, Germany), de acordo com as instruções do fabricante. A razão *peptídeo C*/insulina da mesma amostra foi calculada para quantificação do *clearance* de insulina.

Eutanásia

Após 8 horas de jejum, os animais foram pesados e a glicemia de jejum foi mensurada. Após essas avaliações, os animais foram dessensibilizados com isoflurano e decapitados para coleta de sangue. Em seguida, foi realizada laparotomia e coletado o fígado.

Atividade enzimática da IDE

A atividade da IDE foi avaliada, utilizando-se o Kit comercial SensoLyte® 520 IDE Activity (Cat. AS-72231, AnaSpec, Fremont, CA). Fragmentos de fígado foram homogeneizados em tampão proveniente do kit comercial e, em seguida, centrifugadas a 10000 g, 4°C por 15 min para coleta do sobrenadante. Em uma placa de 96 poços, primeiramente foi realizada a curva padrão e, em seguida, foram adicionados 5 µL de cada amostra, junto com 100µL de substrato para IDE. Foi realizada a leitura da fluorescência de 5 em 5 min durante 60 min em temperatura de 37°C. Princípio do método: quando a IDE quebra o substrato, isso resulta em aumento de 5-FAM fluorescente, sendo monitorado em emissão= 490 nm /520 nm.

Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Para as avaliações estatísticas dos dados pré-operatórios, foi utilizado o teste de normalidade Shapiro-Wilk; para variáveis que estavam em normalidade, foi utilizado o teste T de *Students*; e, para amostras que não apresentaram normalidade, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Para os dados pós-operatórios, foi utilizado o teste de normalidade Shapiro-Wilk; para as variáveis que apresentaram normalidade, foi utilizado o teste de análise de variância ANOVA fator único, seguido de post-hoc test *Tukey*; e, para amostras que não apresentaram normalidade, foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis fator único, seguido do post-hoc test de *Dunn*. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$. As análises foram realizadas no programa estatístico GraphPad Prism versão 6.0 para Windows (GraphPad Software©).

ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo 1: Sleeve gastrectomy increases insulin clearance in mice.

ARTIGO CIENTÍFICO**Sleeve gastrectomy increases insulin clearance in mice**

Gabriela M Soares¹, Luana E S Lopes^{1,2}, Sandra L Balbo^{1,2}, Carine Marmentini¹, Gabriela A Bronczek¹, Mirian A Kurauti³, Licio A Velloso¹ Everardo M Carneiro¹, Antonio C Boschero¹, José Maria Costa-Júnior^{1*}

¹Obesity and Comorbidities Research Center, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

²Laboratory of Endocrine Physiology and Metabolism, Biological Sciences and Health Center, Western Paraná State University (UNIOESTE), Cascavel, PR, Brazil.

³Department of Physiological Sciences, Biological Sciences Center, State University of Maringá (UEM), Maringá, PR, Brazil.

***Correspondence:** José Maria Costa-Júnior. Obesity and Comorbidities Research Center, Institute of Biology, University of Campinas, UNICAMP, Barao Geraldo, Campinas, SP. CEP: 13083-865, Brazil. Tel.: +55 19 3521 0011. E-mail address: josefisiioexer@gmail.com

Short running title: Insulin clearance in SG mice model

Word counts for the abstract: 244

Word counts for the main body of the text (excluding references and legends): 2165

Number of references: 25

Number of tables: 0

Number of figures: 4

Abstract

Aims: To determine the effect of sleeve gastrectomy (SG) upon insulin clearance in obese mice.

Materials and methods: 30 days old C57BL/6 mice were fed on chow (CTL) or high-fat diet (HFD) during 10 weeks. After the development of an obese phenotype, HFD mice were randomly assigned into two groups: Sham-surgical (HFD-SHAM) and SG-surgical (HFD-SG). After postoperative care, we evaluated body weight gain and glucose-insulin homeostasis through glucose and insulin tolerance tests (ipGTT and ipITT). In addition, we evaluated in vivo insulin clearance by calculating the plasma c-peptide and insulin ratio in fast and after a refeeding. Hepatic IDE activity was also measured.

Results: Here, we confirmed that SG reduced insulinemia (Fasting: 1.9 ± 0.3 ng/mL HFD-SHAM, 0.9 ± 0.1 ng/mL HFD-SG; Fed: 3.4 ± 0.03 ng/mL HFD-SHAM, 1.9 ± 0.1 ng/mL HFD-SG) by reducing insulin secretion, assessed by the analysis of plasmatic c-peptide content (Fasting: 243.2 ± 1.7 ng/mL HFD-SHAM, 194.4 ± 2.9 ng/mL HFD-SG; Fed: 322.3 ± 2.2 ng/mL HFD-SHAM, 232.2 ± 2.1 ng/mL HFD-SG), and increasing insulin clearance, which was evaluated through the calculation of plasmatic C-peptide:insulin ratio (Fasting: 146.8 ± 20.7 HFD-SHAM, 219.4 ± 16.0 HFD-SG; Fed: 95.2 ± 1.2 HFD-SHAM, 123.5 ± 4.0 HFD-SG). However, liver IDE activity was not altered (0.0032 ± 0.0001 /per ug total protein HFD-SHAM, 0.0030 ± 0.0004 /per ug total protein HFD-SG), suggesting that other mechanisms may be related to an increment of insulin clearance in SG mice.

Conclusions: In summary, our results indicate that SG mice models seem to successfully simulate the improvements of insulin-glucose homeostasis, observed in humans, reinforcing the usage of SG mice as a proper experimental model of bariatric surgery.

Keywords: insulin degrading enzyme, hepatic insulin clearance, hyperinsulinemia, bariatric surgery, high-fat diet, obesity

Introduction

Bariatric surgery is a very effective measure to counteract obesity complications, i.e., glucose intolerance, insulin resistance and hyperinsulinemia¹⁻⁵. The reduction in the plasmatic insulin level, after Roux-en-Y gastric bypass surgery (RYGB), has been acquainted to a major role of augmented insulin clearance than reduced insulin secretion in humans⁶⁻¹⁰. An increase in the human insulin clearance after sleeve gastrectomy (SG) also has been reported^{10,11}.

Around 80% of insulin is degraded in the hepatocytes during its first liver passage, and the insulin degrading enzyme (IDE) seems to be crucial for this process^{12,13}. Indeed, IDE-KO mice develop insulin resistance, associated with a dramatic hyperinsulinemia¹⁴. Also, insulin resistant obese mice, fed on high-fat diet, develop reduction in insulin clearance associated to a reduced liver IDE activity. The recovery of insulin sensitivity by the physical exercise performance or bile acid TUDCA administration restored the insulin clearance and liver IDE expression in those mice^{15,16}.

The majority of the studies that explored the insulin clearance after bariatric surgery have been done in humans, impeding the analysis of the possible involvement of liver IDE in this context. Keeping this outline in mind, we sought to verify whether the mice model of GS mirrors the outcomes related to insulin clearance observed in humans, and if liver IDE activity regulated it.

Here, we demonstrated that GS partially recovered the insulin clearance in obese mice. However, it was not associated with the liver IDE modulation, which indicates that other mechanism might be involved in the GS-induced insulin clearance.

Materials and methods

Animals

3-week-old C57BL6/J male mice were obtained from the University of Campinas Facilities and maintained at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ on 12-h light-dark cycle. From the 4th week-old, the animals were divided into two groups: control group (CTL), which received standard chow (Nuvital, PR, Brazil), and high-fat diet group (HFD), which received a diet containing 45% kcal from lipid (Prag Soluções, SP, Brazil). At 14-week-old, HFD mice were divided into two groups, being that one group was submitted to sleeve gastrectomy (HFD-SG), and the other group underwent sham operation (HFD-SHAM). Mice were weighted once a week until the end of the experimental period. Euthanasia was performed at 20-week-old. All experiments were approved by the Animal Care Committee at UNICAMP (License Number: 5242-1/2019).

Sleeve gastrectomy and Sham operations

After 12 h of fasting, mice were anesthetized with 1% isoflurane (BioChimico, Itatiaia, Brazil) with nasotracheal intubation (1L/min O₂). For the Sham group, an incision was made in the epigastric midline of the abdomen, then, the stomach and abdominal cavity were exposed, and the small intestine was massaged using a sterile scalpel handle. Before suturing, a dose of 20 mg/kg of Enrofloxacin (Chemitril®, Chemitec®, SP, Brazil) and 5 mg/kg of Tramadol (Vitalis®, Bogotá, Colômbia) were administered to the abdominal cavity. The laparotomy was closed with continuous suture, with 6-0 polypropylene thread, as well as the skin. For SG, an incision was made in the epigastric midline of the abdomen, and the stomach was exposed. The incision was performed from the angle of His and 80% of the volume of the stomach was removed, including complete resection of the gastric fundus, forming a gastric tube that connected the esophagus to the duodenum¹⁷. Before suturing, a dose of 20 mg/kg Enrofloxacin (Chemitril®, Chemitec®, SP, Brazil) and Tramadol (Vitalis®, Bogotá, Colômbia) 5 mg/kg were administered to the abdominal cavity. The laparotomy was closed with continuous suture, with 6-0 polypropylene thread, as well as the skin. Mice received 20 mg/kg of Enrofloxacin (Chemitril®, Chemitec®, SP, Brazil), for 7 days after surgery, and 2 mg/kg of Meloxicam

(Eurofarma®, SP, Brazil) plus 5 mg/kg of Tramadol (Vitalis®, Bogotá, Colômbia) for 2 days. Mice were kept on liquid diet for 5 days after surgery. On day 6, mice were given doughy HFD, and they were switched back to solid HFD on day 12.

Intraperitoneal glucose (ipGTT) and insulin (ipITT) Tolerance tests

For ipGTT, mice were subjected to 12h of fasting. Blood glucose level was measured by a glucometer (Accu-chek®, Roche, Basileia, Switzerland) at time 0' and 15, 30, 60, 90, and 120 min after they received an intraperitoneal glucose dose of 2 g/kg. For ipITT, after 4h of fasting, blood glucose level was measured (time 0') by a glucometer (Accu-chek®, Roche, Basileia, Switzerland). Following, mice received an intraperitoneal administration of insulin of 1 U/kg; thereafter, glycemia was measured at 3, 6, 9, 12, and 15 min. Both tests were performed with 14-week-old (preoperative) and 20 week-old (postoperative).

Plasma Insulin and C-Peptide Measurements

Mouse insulin (Catalog #10-1247-1, Mercodia, Sylveniusgatan, Sweden) and C-peptide Elisa Kits (Catalog #EZRMCP2-21K, Millipore, Darmstadt, Germany) were used to measure plasma insulin and C-peptide. Plasma samples were obtained by centrifugation of blood samples at 11000 rpm for 15 min at 4°C. The assays were performed as indicated by the kit protocol. The blood samples for insulin and C-peptide measurements were collected in fed and fasted states at the end of the treatment. The c-peptide:insulin ratio of the same samples was calculated to quantify the insulin clearance¹⁸.

IDE activity Measurements

Liver IDE activity was measured using SensoLyte 520 IDE Activity Assay Kit (Catalog #AS-72231; AnaSpec, Fremont, Canada) by following the manufacturer's instructions. Total IDE activity was calculated as described previously¹⁵ and normalized per µg of protein content

determined using the Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Catalog #5000006, BioRad, CA, USA).

Statistical Analysis

The data are presented as the mean \pm standard error of the mean (SEM). To evaluate data normality, we applied the Shapiro–Wilk test. When normal, we used the parametric Student’s t-test (to compare two groups) or One-Way ANOVA with an unpaired Tukey’s post-hoc test (to compare 3 groups); otherwise, the non-parametric Mann–Whitney test (to compare two groups) or Kruskal-Wallis test (to compare 3 groups) were adopted. The difference between groups was considered statistically significant if $P \leq 0.05$.

Results

High-fat diet increases body weight gain and impairs glucose tolerance and insulin sensitivity in mice

Firstly, we evaluated body weight gain of mice during the course of ten weeks receiving a high-fat diet. As expected, HFD mice displayed higher body weight gain compared to CTL mice (Fig. 1A), as confirmed by the area under the curve (AUC) (Fig. 1B).

Next, to investigate the effects of the high-fat diet on glucose homeostasis, we performed intraperitoneal glucose and insulin tolerance tests (ipGTT and ipITT). We observed that HFD mice presented impaired glucose tolerance, as determined by the higher AUC of blood glucose during ipGTT (Fig. 1C and D). Furthermore, HFD also displayed insulin resistance (Fig. 1E and F).

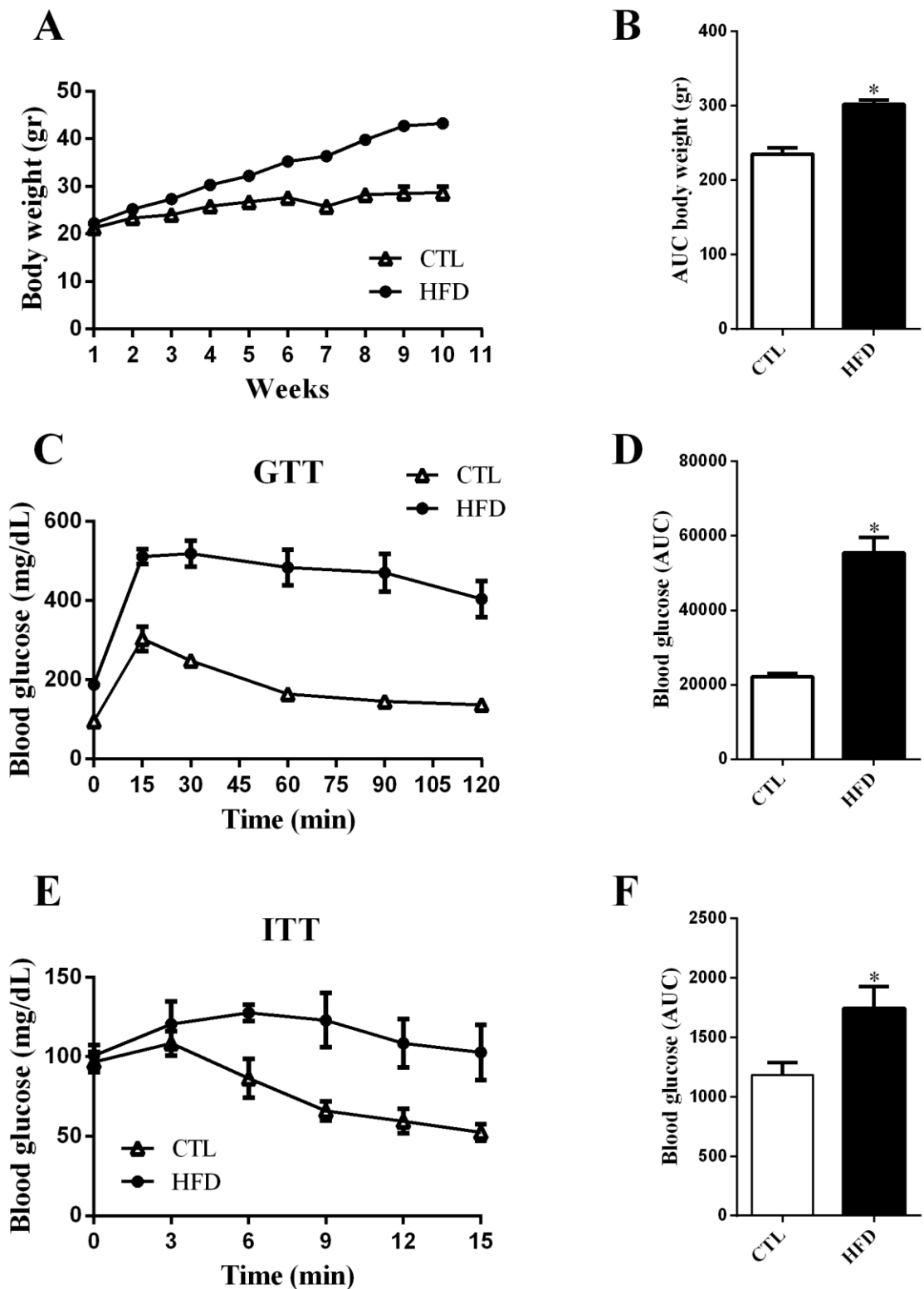


Figure 1. High-fat diet increases body weight gain, impairs glucose tolerance and insulin sensitivity in mice. Body weight over the course of the experimental period (A) and its respective area under the curve (AUC) (B) of CTL and HFD. Blood glucose of CTL and HFD

during the intraperitoneal glucose tolerance test (ipGTT) (C). Area under the curve (AUC) of total blood glucose concentration of CTL and HFD during ipGTT (D). Blood glucose of CTL and HFD during the intraperitoneal insulin tolerance test (ipITT) (E). Area under the curve (AUC) of total blood glucose concentration of CTL and HFD during ipITT (F). Data are the mean \pm SEM. * $P \leq 0.05$ (N=4-6) (Student's t-test or Mann-Whitney test).

SG reduces body weight gain and improves glucose tolerance and insulin sensitivity in HFD-SG mice

Once HFD mice presented overweight, glucose intolerance and insulin resistance, we divided them into two other groups: HFD-SHAM and HFD-SG. After that, each group underwent its respective surgical procedure and body weight was measured once a week, after postoperative care. As observed in Fig. 2A, before the surgical procedure HFD-SHAM and HFD-SG mice presented similar body weight, which was higher than CTL mice. In addition, due to the postoperative care, they lost weight achieving values close to those of CTL mice (week 1). In the subsequent weeks, HFD-SHAM mice displayed increased body weight gain, recovering similar values to those of the preoperative period. Whereas, body weight gain in HFD-SG mice was less pronounced, confirming the efficacy of the sleeve gastrectomy (Fig. 2B). To access the effect of sleeve gastrectomy on glucose homeostasis of HFD mice, we performed postoperative ipGTT and ipITT, and HFD-SG mice presented improved glucose (Fig. 2C and D) and insulin (Fig. 2E and F) tolerance compared to HFD-SHAM.

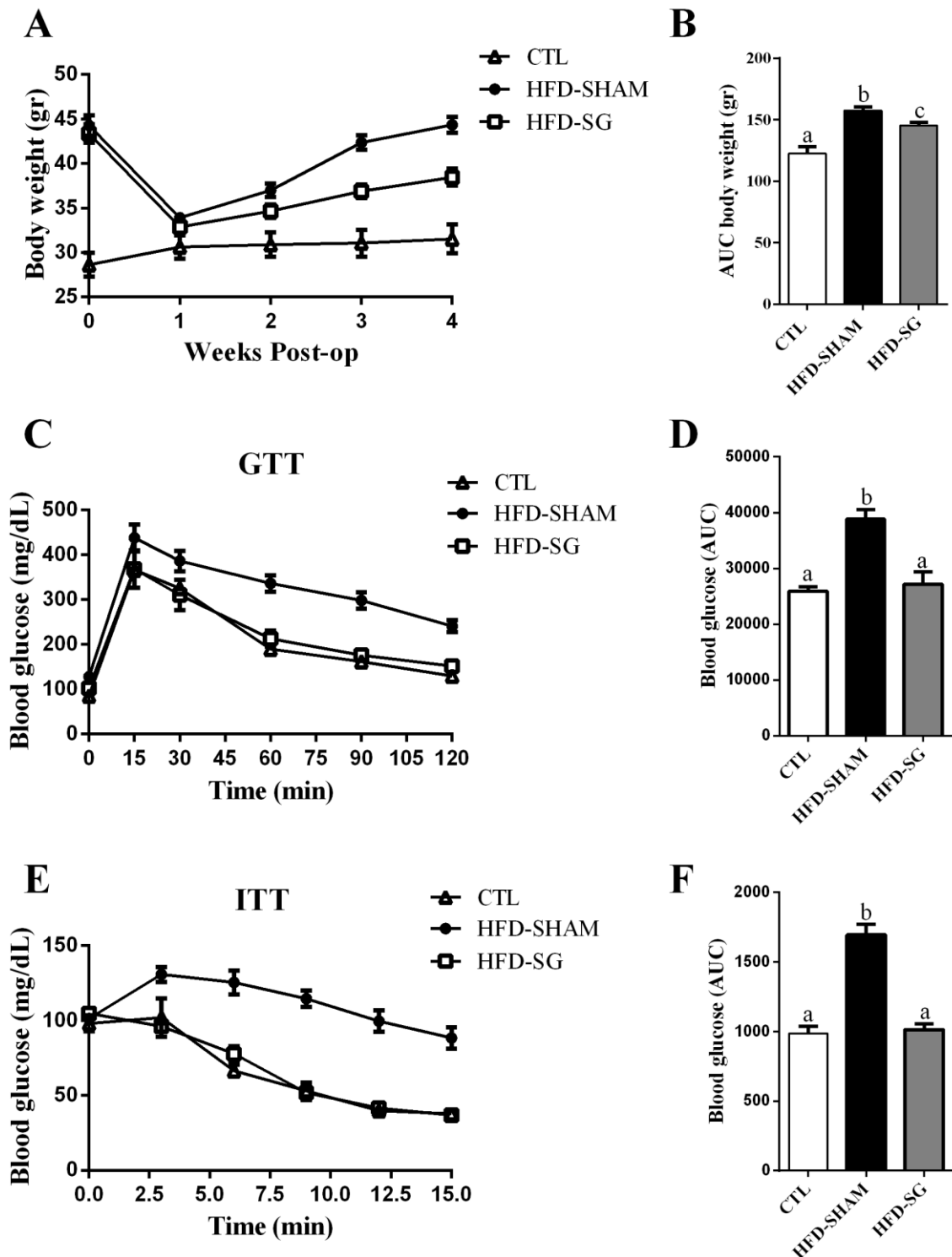


Figure 2. Sleeve gastrectomy reduces body weight gain, improves glucose tolerance and insulin sensitivity in HFD-SG mice. Postoperative body weight (A) and its respective area under the curve (AUC) (B) of CTL, HFD-SHAM and HFD-SG. Blood glucose of CTL, HFD-SHAM and HFD-SG during the intraperitoneal glucose tolerance test (ipGTT) (C). Area under

the curve (AUC) of total blood glucose concentration of CTL, HFD-SHAM and HFD-SG during ipGTT (**D**). Blood glucose of CTL, HFD-SHAM and HFD-SG during the intraperitoneal insulin tolerance test (ipITT) (**E**). Area under the curve (AUC) of total blood glucose concentration of CTL, HFD-SHAM and HFD-SG during ipITT (**F**). Data are the mean \pm SEM. Different letters indicate statistic differences between groups, $P \leq 0.05$ (N=4-8) (One-Way ANOVA or Kruskal-Wallis test).

SG reduces fasting and fed insulin and C-peptide and increases insulin clearance in HFD-SG mice

Evidences suggest that glucose homeostasis improves after bariatric operations due to, at least in part, an increase in insulin clearance. Thus here, we evaluated insulin clearance in obese mice after performing sleeve gastrectomy operation by the calculation of C-peptide:insulin ratio in fasting and fed states. HFD-SHAM displayed higher plasma insulin compared to CTL in fasting (Fig. 3A) and fed states (Fig. 3B). However, HFD-SG presented lower plasma insulin compared to HFD-SHAM mice, in both fasting (Fig. 3A) and fed (Fig. 3B) states. When we evaluated plasma C-peptide, HFD-SHAM showed higher values compared to CTL mice (Fig. 3C and D). In addition, HFD-SG presented lower plasma C-peptide levels than HFD-SHAM mice, and even lower levels than CTL mice, in fasting (Fig 3C) and fed state (Fig. 3D). These results suggest an increase in insulin clearance, confirmed by the increased C-peptide:insulin ratio in the HFD-SG, compared to HFD-SHAM mice (Fig. 3E and F).

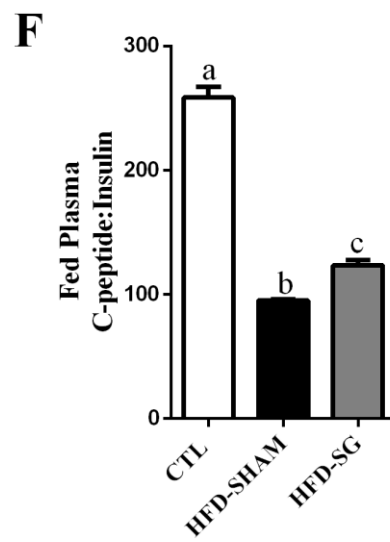
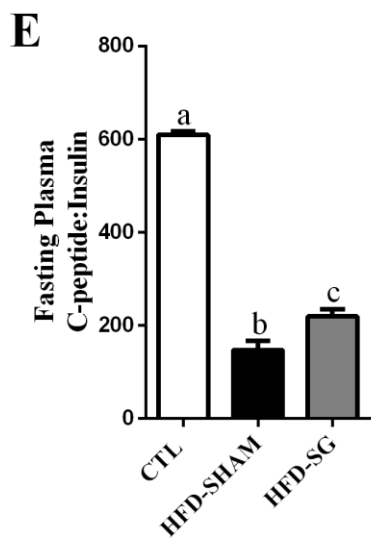
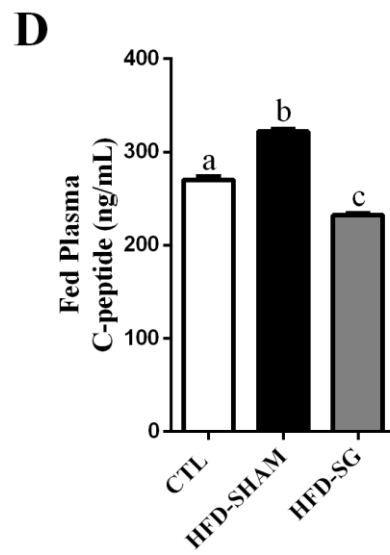
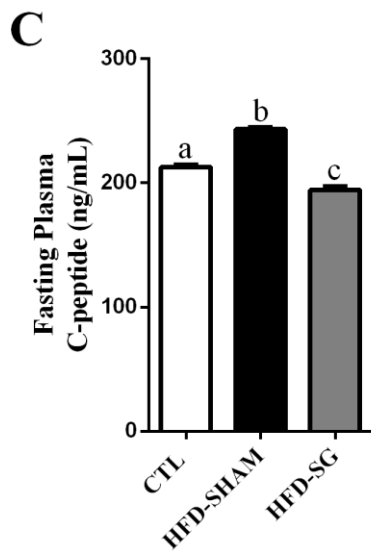
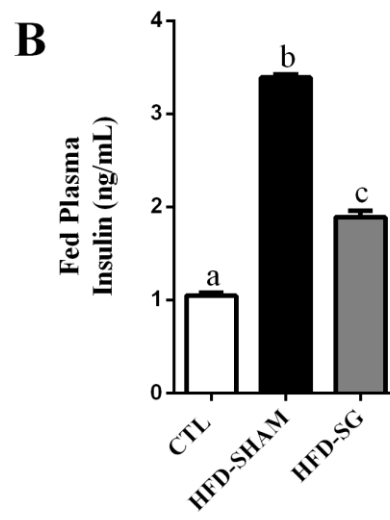
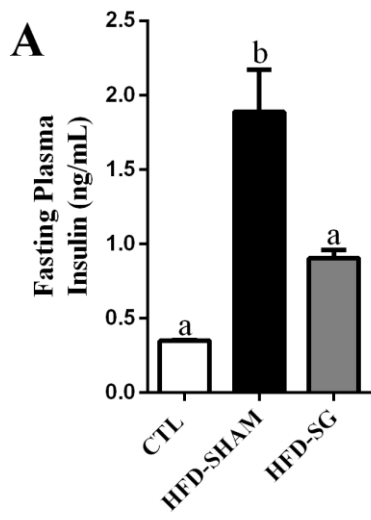


Figure 3. **High-fat diet increases fasting and fed insulin and C-peptide, and reduces insulin clearance in mice, whereas sleeve gastrectomy restores these parameters.** Plasma insulin in fasting (A) and fed (B) state of CTL, HFD-SHAM and HFD-SG. Plasma C-peptide in fasting (C) and fed (D) state of CTL, HFD-SHAM and HFD-SG. C-peptide:insulin ratio in fasting (E) and fed (F) state of CTL, HFD-SHAM and HFD-SG. Data are the mean \pm SEM. Different letters indicate statistic differences between groups, $P \leq 0.05$ (N=5-7) (One-Way ANOVA or Kruskal-Wallis test).

SG did not alter IDE activity in the liver of HFD-SG mice

Hepatic IDE is the major enzyme responsible for insulin clearance. In this way, we evaluated IDE activity in the liver. We observed that both HFD-SHAM and HFD-SG presented reduced IDE activity, compared to CTL (Fig. 4A and B). However, there was no difference between HFD-SHAM and HFD-SG regarding IDE activity (Fig. 4A and B), demonstrating that sleeve gastrectomy did not alter the activity of this enzyme.

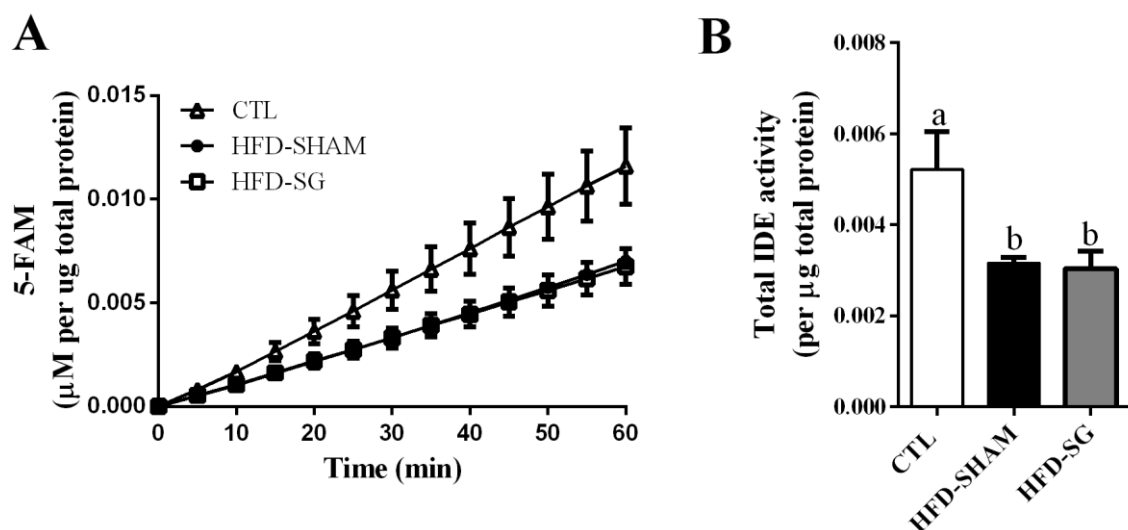


Figure 4. **Sleeve gastrectomy did not alter insulin degrading enzyme (IDE) activity in the liver of HFD-SG mice.** Kinetic of IDE activity assay (A) and total IDE activity (B) in the liver of CTL, HFD-SHAM and HFD-SG. Fluorescent intensity at Ex/Em = 490/520 nm was recorded

every 5 min for 60 min. 5-FAM concentration was calculated using a standard curve and normalized per μg of total protein. Data are the mean \pm SEM. Different letters indicate statistic differences between groups, $P \leq 0.05$ (N=6-9) (One-Way ANOVA or Kruskal-Wallis).

Discussion

As expected, we demonstrated that SG mice model exhibited beneficial effects upon glucose homeostasis and body weight, in agreement with previous studies¹⁹⁻²². In addition, we observed here that HFD-SG mice presented increased insulin clearance, as observed in humans^{10,11}. These results support previous findings, suggesting the SG mice as an experimental model that accurately mimics the effects observed in humans.

To measure insulin clearance, we assessed the plasma concentration of C-peptide and insulin, in fasting state and after re-feeding, and calculated the ratio between these molecules²³. Insulin and C-peptide are co-secreted by the pancreatic β cells (ratio 1:1); however, C-peptide has a longer half-time than insulin^{15,18,24}. Thus, decrease in the C-peptide:insulin ratio indicates reduction in the insulin clearance. As expected, insulin clearance was reduced in HFD-SHAM mice compared to controls (Fig. 3E and F). The SG surgery partially recovered it, as judged by the elevation of C-peptide:insulin ratio of HFD-SG compared with HFD-SHAM mice (Fig. 3E and F). These findings are in agreement with human studies^{10,11}.

Liver is the most important site for insulin degradation, where it mainly occurs by the action of IDE^{12,13}. As expected, obese mice showed reduced IDE activity (Fig. 4A and B). However, we did not observed differences in the IDE activity between the HFD-SHAM and HFD-SG mice (Fig. 4A and B), which indicate that other mechanisms may be involved.

In fact, IDE degrades insulin in the endosomes that are formed after the insulin binds to insulin receptor^{12,13,25}. Considering that the insulin sensitivity was improved after the SG surgery, it is plausible to speculate that more insulin is present in the endosomes, increasing the

capacity of IDE to interact with its substrate, augmenting the insulin degradation without altering its activity.

In summary, we confirmed that SG mice model accurately represents the human surgery outcomes and, subjoined the SG-induced increased insulin clearance as another parameter to prove it. Nevertheless, the higher insulin clearance observed in the HFD-SG mice was independent of liver IDE activity. It indicates that the improvement of insulin sensitivity that occurs after the surgery might be sufficient to increase the insulin degradation by itself.

Acknowledgements

The authors thank Tatiane Ramos and Wilson (Bill) for technical assistance. This study was supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP, <http://www.fapesp.br/>, grant numbers 2015/12611-0, 2016/17102-9 and 2019/00728-0) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, <http://cnpq.br/>).

References

- 1 Wolfe, B. M., Kvach, E. & Eckel, R. H. Treatment of Obesity: Weight Loss and Bariatric Surgery. *Circ Res* **118**, 1844-1855, doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.307591 (2016).
- 2 Batterham, R. L. & Cummings, D. E. Mechanisms of Diabetes Improvement Following Bariatric/Metabolic Surgery. *Diabetes Care* **39**, 893-901, doi:10.2337/dc16-0145 (2016).
- 3 Jørgensen, N. B. *et al.* Sustained Improvements in Glucose Metabolism Late After Roux-En-Y Gastric Bypass Surgery in Patients with and Without Preoperative Diabetes. *Sci Rep* **9**, 15154, doi:10.1038/s41598-019-51516-y (2019).
- 4 Rosen, C. J. & Ingelfinger, J. R. Bariatric Surgery and Restoration of Insulin Sensitivity - It's Weight Loss. *N Engl J Med* **383**, 777-778, doi:10.1056/NEJMe2024212 (2020).

- 5 Ferrannini, E. & Mingrone, G. Impact of different bariatric surgical procedures on insulin action and beta-cell function in type 2 diabetes. *Diabetes Care* **32**, 514-520, doi:10.2337/dc08-1762 (2009).
- 6 Dirksen, C. *et al.* Mechanisms of improved glycaemic control after Roux-en-Y gastric bypass. *Diabetologia* **55**, 1890-1901, doi:10.1007/s00125-012-2556-7 (2012).
- 7 Goldfine, A. B. & Patti, M. E. Diabetes improvement following Roux-en-Y gastric bypass: understanding dynamic changes in insulin secretion and action. *Diabetes* **63**, 1454-1456, doi:10.2337/db13-1918 (2014).
- 8 Bojsen-Møller, K. N. Mechanisms of improved glycaemic control after Roux-en-Y gastric bypass. *Dan Med J* **62**, B5057 (2015).
- 9 Vauris, C. *et al.* β -cell pancreatic dysfunction plays a role in hyperglycemic peaks observed after gastric bypass surgery of obese patients. *Surg Obes Relat Dis* **12**, 795-802, doi:10.1016/j.soard.2015.10.073 (2016).
- 10 Nannipieri, M. *et al.* Roux-en-Y gastric bypass and sleeve gastrectomy: mechanisms of diabetes remission and role of gut hormones. *J Clin Endocrinol Metab* **98**, 4391-4399, doi:10.1210/jc.2013-2538 (2013).
- 11 Mullally, J. A., Febres, G. J., Bessler, M. & Korner, J. Sleeve Gastrectomy and Roux-en-Y Gastric Bypass Achieve Similar Early Improvements in Beta-cell Function in Obese Patients with Type 2 Diabetes. *Sci Rep* **9**, 1880, doi:10.1038/s41598-018-38283-y (2019).
- 12 Duckworth, W. C., Bennett, R. G. & Hamel, F. G. Insulin degradation: progress and potential. *Endocr Rev* **19**, 608-624, doi:10.1210/edrv.19.5.0349 (1998).
- 13 Najjar, S. M. & Perdomo, G. Hepatic Insulin Clearance: Mechanism and Physiology. *Physiology (Bethesda)* **34**, 198-215, doi:10.1152/physiol.00048.2018 (2019).

- 14 Abdul-Hay, S. O. *et al.* Deletion of insulin-degrading enzyme elicits antipodal, age-dependent effects on glucose and insulin tolerance. *PLoS One* **6**, e20818, doi:10.1371/journal.pone.0020818 (2011).
- 15 Kurauti, M. A. *et al.* Acute exercise restores insulin clearance in diet-induced obese mice. *J Endocrinol* **229**, 221-232, doi:10.1530/JOE-15-0483 (2016).
- 16 Vettorazzi, J. F. *et al.* Bile acid TUDCA improves insulin clearance by increasing the expression of insulin-degrading enzyme in the liver of obese mice. *Sci Rep* **7**, 14876, doi:10.1038/s41598-017-13974-0 (2017).
- 17 Garibay, D. & Cummings, B. P. A Murine Model of Vertical Sleeve Gastrectomy. *J Vis Exp*, doi:10.3791/56534 (2017).
- 18 Kurauti, M. A. *et al.* Hyperinsulinemia is associated with increasing insulin secretion but not with decreasing insulin clearance in an age-related metabolic dysfunction mice model. *J Cell Physiol* **234**, 9802-9809, doi:10.1002/jcp.27667 (2019).
- 19 Ding, L. *et al.* Vertical sleeve gastrectomy confers metabolic improvements by reducing intestinal bile acids and lipid absorption in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **118**, doi:10.1073/pnas.2019388118 (2021).
- 20 Ding, L. *et al.* Vertical sleeve gastrectomy activates GPBAR-1/TGR5 to sustain weight loss, improve fatty liver, and remit insulin resistance in mice. *Hepatology* **64**, 760-773, doi:10.1002/hep.28689 (2016).
- 21 Chaudhari, S. N. *et al.* Bariatric surgery reveals a gut-restricted TGR5 agonist with anti-diabetic effects. *Nat Chem Biol* **17**, 20-29, doi:10.1038/s41589-020-0604-z (2021).
- 22 Douros, J. D. *et al.* Sleeve gastrectomy rapidly enhances islet function independently of body weight. *JCI Insight* **4**, doi:10.1172/jci.insight.126688 (2019).

- 23 Bronczek, G. A. *et al.* The Bile Acid TUDCA Improves Beta-Cell Mass and Reduces Insulin Degradation in Mice With Early-Stage of Type-1 Diabetes. *Front Physiol* **10**, 561, doi:10.3389/fphys.2019.00561 (2019).
- 24 Leighton, E., Sainsbury, C. A. & Jones, G. C. A Practical Review of C-Peptide Testing in Diabetes. *Diabetes Ther* **8**, 475-487, doi:10.1007/s13300-017-0265-4 (2017).
- 25 Najjar, S. M. *et al.* Insulin-stimulated phosphorylation of recombinant pp120/HA4, an endogenous substrate of the insulin receptor tyrosine kinase. *Biochemistry* **34**, 9341-9349, doi:10.1021/bi00029a009 (1995).

Figure legends

Figure 1. High-fat diet increases body weight gain, impairs glucose tolerance and insulin sensitivity in mice. Body weight over the course of the experimental period (A) and its respective area under the curve (AUC) (B) of CTL and HFD. Blood glucose of CTL and HFD during the intraperitoneal glucose tolerance test (ipGTT) (C). Area under the curve (AUC) of total blood glucose concentration of CTL and HFD during ipGTT (D). Blood glucose of CTL and HFD during the intraperitoneal insulin tolerance test (ipITT) (E). Area under the curve (AUC) of total blood glucose concentration of CTL and HFD during ipITT (F). Data are the mean \pm SEM. * $P \leq 0.05$ (N=4-6) (Student's t-test or Mann-Whitney test).

Figure 2. Sleeve gastrectomy reduces body weight gain, improves glucose tolerance and insulin sensitivity in HFD-SG mice. Postoperative body weight (A) and its respective area under the curve (AUC) (B) of CTL, HFD-SHAM and HFD-SG. Blood glucose of CTL, HFD-SHAM and HFD-SG during the intraperitoneal glucose tolerance test (ipGTT) (C). Area under the curve (AUC) of total blood glucose concentration of CTL, HFD-SHAM and HFD-SG

during ipGTT (**D**). Blood glucose of CTL, HFD-SHAM and HFD-SG during the intraperitoneal insulin tolerance test (ipITT) (**E**). Area under the curve (AUC) of total blood glucose concentration of CTL, HFD-SHAM and HFD-SG during ipITT (**F**). Data are the mean \pm SEM. Different letters indicate statistic differences between groups, $P \leq 0.05$ (N=4-8) (One-Way ANOVA or Kruskal-Wallis test).

Figure 3. High-fat diet increases fasting and fed insulin and C-peptide, and reduces insulin clearance in mice, whereas sleeve gastrectomy restores these parameters. Plasma insulin in fasting (**A**) and fed (**B**) state of CTL, HFD-SHAM and HFD-SG. Plasma C-peptide in fasting (**C**) and fed (**D**) state of CTL, HFD-SHAM and HFD-SG. C-peptide:insulin ratio in fasting (**E**) and fed (**F**) state of CTL, HFD-SHAM and HFD-SG. Data are the mean \pm SEM. Different letters indicate statistic differences between groups, $P \leq 0.05$ (N=5-7) (One-Way ANOVA or Kruskal-Wallis test).

Figure 4. Sleeve gastrectomy did not alter insulin degrading enzyme (IDE) activity in the liver of HFD-SG mice. Kinetic of IDE activity assay (**A**) and total IDE activity (**B**) in the liver of CTL, HFD-SHAM and HFD-SG. Fluorescent intensity at Ex/Em = 490/520 nm was recorded every 5 min for 60 min. 5-FAM concentration was calculated using a standard curve and normalized per μg of total protein. Data are the mean \pm SEM. Different letters indicate statistic differences between groups, $P \leq 0.05$ (N=6-9) (One-Way ANOVA or Kruskal-Wallis).

CONSIDERAÇÕES/CONCLUSÕES FINAIS

O objetivo principal deste trabalho foi o de avaliar em camundongos obesos, por dieta hiperlipídica, se ocorre aumento no *clearance* de insulina hepática após a gastrectomia vertical, e se esse aumento está relacionado à atividade da IDE.

Inicialmente, observamos que camundongos tratados durante 12 semanas, com dieta DH, apresentaram aumento no peso corporal, hiperglicemia e RI, quando comparados ao grupo controle, confirmando a eficácia da dieta na indução da obesidade e comorbidades associadas (LIU et al., 2015). Essas observações são importantes, uma vez que a redução do *clearance* de insulina nos animais obesos pode indicar que essa deficiência esteja associada à redução na expressão e atividade da IDE (ERDMANN et al., 2009). Ainda, em roedores, o mau funcionamento da IDE contribuiu para o desenvolvimento de RI e hiperglicemia (FARRIS et al., 2003).

A GV é utilizada no tratamento da obesidade e suas comorbidades, promovendo melhora da homeostase glicêmica e, muitas vezes, remissão do DM2, antes mesmo da redução de peso corporal. Neste trabalho, mostramos que a GV atenuou os efeitos provocados pela dieta hiperlipídica, reduzindo o ganho de peso corporal, diminuindo a glicemia e insulinemia, melhorando a sensibilidade à insulina e a tolerância à glicose dos animais DH. A melhora na tolerância à glicose e à insulina observada pelo ipGTT e ipITT, respectivamente, é resultante da maior captação de glicose pelos tecidos e do *clearance* mais eficaz da insulina, após a cirurgia (DOUROS; TONG; D'ALESSIO, 2019). Segundo Li e colaboradores, a GV reduziu o peso corporal, melhorou a hiperglicemia e RI em camundongos obesos por dieta hipercalórica, sugerindo que a melhora desses parâmetros pode ser decorrente do aumento no gasto energético (LI et al., 2019). Além disso, a GV reduziu fatores inflamatórios, provocados por dieta hipercalórica, bem como a deposição de gordura no fígado (HUA et al., 2021). Portanto, nossos resultados reforçam achados da literatura, sugerindo que a GV atenuou os efeitos induzidos pela ingestão da dieta hiperlipídica nos animais DH, com destaque para a normalização dos níveis plasmáticos de glicose e insulina.

A insulinemia é resultado do equilíbrio entre a secreção de insulina pelas células β e o seu *clearance*, que ocorre preferencialmente no fígado. Um fenômeno interessante que ocorre com a secreção de insulina é que, juntamente com esse hormônio, é secretado o *peptídeo C* (também um hormônio), produto da clivagem da

pró-insulina. A insulina e o *peptídeo C* são co-secretados em concentrações equimolares pelas células β , porém, a meia-vida do *peptídeo C* (20-30 min) é maior do que a da insulina (3-5min). Essa diferença na meia-vida dos dois hormônios permite a avaliação precisa do quanto de insulina secretada foi degradada em determinado período de tempo (JONES; HATTERSLEY, 2013; VAKILIAN; TAHAMTANI; GHAEDI, 2019). Resumindo, quando a razão *peptídeo C*/insulina no plasma é alta, isso indica que muita insulina já foi degradada, sendo o contrário verdadeiro.

Assim, pela avaliação da razão *peptídeo C*/insulina, observamos que animais DH, submetidos a GV, apresentaram melhora no *clearance* de insulina que estava diminuído pela dieta hiperlipídica, o que explica, pelo menos em parte, a redução da insulinemia nos animais do grupo DH-GV. Esses resultados convergem com o mostrado por um estudo em pacientes sedentários e atletas, em que atletas apresentaram maior sensibilidade à insulina e maior taxa de *clearance* em comparação com os sedentários (AHRÉN; THORSSON, 2003). A seguir, avaliamos se o aumento observado no *clearance* da insulina está relacionado a alterações na IDE, no fígado desses animais e mostramos que a atividade da IDE nos animais DH-GV foi similar ao DH-FO e menor, quando comparada ao CTL, ou seja, a GV não alterou a atividade da IDE, dessa forma, a melhora no *clearance* de insulina pode ser decorrente de outros mecanismos.

Concluindo, os resultados obtidos neste trabalho demonstram que a GV foi capaz de aumentar o *clearance* de insulina em animais obesos sem alterar a atividade da IDE. Mais estudos são necessários para compreender o mecanismo envolvido no aumento do *clearance* de insulina, porém, esses resultados indicam a IDE como um possível alvo para o tratamento de pacientes obesos e intolerantes à glicose.

REFERÊNCIAS GERAIS

ABDUL-HAY, S. O.; KANG, D.; MCBRIDE, M.; LI, L.; ZHAO, J.; LEISSRING, M. A. Deletion of insulin-degrading enzyme elicits antipodal, age-dependent effects on glucose and insulin tolerance. **Plos One**, v.6, n.6, p. 20818, 2011.

ABESO. **Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e Síndrome Metabólica**, 2019. Disponível em: <http://www.abeso.org.br/atitude-saudavel/mapa-obesidade>. Acesso em 5 julho, 2019.

ABU-JAISH, W.; ROSENTHAL, R. J. Sleeve gastrectomy: a new surgical approach for morbid obesity. **Journal Expert Review of Gastroenterology e Hepatology**, v. 4, p. 101-119, 2010.

AHRÉN, B.; THORSSON, O. Increased insulin sensitivity is associated with reduced insulin and glucagon secretion and increased insulin clearance in man. **J Clin Endocrinol Metab**, v.88, p.1264-70, 2003.

ALBANOPOULOS, K.; TSAMIS, D.; NATOUDI, M.; ALEVIZOS, L.; ZOGRAFOS, G.; LEANDROS, E. The impact of laparoscopic sleeve gastrectomy on weight loss and obesity-associated comorbidities: the results of 3 years of follow-up. **Surgical Endoscopy**, 2015.

ALBERTI, K. G. M. M.; ZIMMET, P.; SHAW, J. International Diabetes Federation: a consensus on Type 2 diabetes prevention. **Diabetic Medicine**, v. 24, n. 5, p. 451-463, 2007.

AL-NAJIM, W.; DOCHERTY, N. G.; le ROUX, C. W. Food intake and eating behavior after bariatric surgery. **Physiological Reviews**, v. 98, p. 1113-1141, 2018.

BALKAU, B., KAHN, H. S.; COURBON, D.; ESCHWEGE, E.; DUCIMETIERE, P. Hyperinsulinemia Predicts Fatal Liver Cancer but Is Inversely Associated with Fatal Cancer at Some Other Sites. **Diabetes Care**, v. 24, p. 843–849, 2001.

BENAIGES, D.; MÁ-S-LORENZO, A.; GODAY, A.; RAMON, J. M.; CHILLARÓN, J. J.; PEDRO-BOTET, J.; ROUX, J. A. F. Laparoscopic sleeve gastrectomy: More than a restrictive bariatric surgery procedure?. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21(41), p. 11804-11814, 2015.

BIDDLE, S.; CAVILL, N.; EKELUND, U.; GORELY, T.; GRIFFITHS, M.; JAGO, R.; OPPERT, J. M.; RAATS, M. M.; SALMON, J.; STRATTON, G.; VICENTE-RODRÍGUEZ, G.; BUTLAND, B.; PROSSER, L.; RICHARDSON, D. Sedentary Behaviour and Obesity: Review of the Current Scientific Evidence. **Department of Health**, 2010.

BLEIL, S.I. O padrão alimentar ocidental: consideração sobre as mudanças de hábito no Brasil. **Cadernos de Debate**, v. 6, n. 1, p. 1-25, 1998.

BOLAND, B. B.; RHODES, C. J.; GRIMSBY, J. S. The dynamic plasticity of insulin production in β -cells. **Molecular Metabolism**, n. 6, p. 958-973, 2017.

BRANDIMARTI, P., COSTA-JÚNIOR, J. M., FERREIRA, S. M., PROTZEK, A. O., SANTOS, G. J., CARNEIRO, E. M., REZENDE, L. F. Cafeteria diet inhibits insulin clearance by reduced insulin-degrading enzyme expression and mRNA splicing. **Journal of Endocrinology**, v. 219, n. 2, p. 173-182, 2013.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Brasil atinge maior índice de obesidade nos últimos treze anos, 2019a. Disponível em: <http://saude.gov.br/noticias/agencia-saude/45612-brasileiros-atingem-maior-indice-de-obesidade-nos-ultimos-treze-anos>. Acesso em: 21 julho, 2019.

BRASIL. **Empresa Brasil de Comunicação**. Número de cirurgias bariátricas aumenta 84,73% em sete anos, 2019b. Disponível em: <http://agenciabrasil.ebc.com.br/saude/noticia/2019-09/numero-de-cirurgias-bariatricas-aumenta-8473-em-sete-anos>. Acesso em 8 novembro, 2019.

BRASIL. **Empresa Brasil de Comunicação**. IBGE: obesidade mais do que dobra na população com mais de 20 anos, 2020. Disponível em: <https://agenciabrasil.ebc.com.br/saude/noticia/2020-10/ibge-obesidade-mais-do-que-dobra-na-populacao-com-mais-de-20-anos>. Acesso em 8 junho, 2021.

CABALLERO, B. The global epidemic of obesity: an overview. **Epidemiologic Reviews**, v. 29, p. 1-5, 2007.

CARVALHEIRA, J. B. C.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. A. Vias de Sinalização da Insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 4, p. 419-425, 2002.

CASELLA, G. SORICELLI, E.; GIANNOTTI, D.; COLLALTI, M.; MASELLI, R.; GENCO, A.; REDLER, A.; BASSO, N. Long-term results after laparoscopic sleeve

gastrectomy in a large monocentric series. **Surgery for Obesity and Related Diseases**, v. 12, n. 4, p. 757–762, 2016.

CASTIELLO, R. F.; HEILEMAN, K.; TABRIZIAN, M. Microfluidic perfusion systems for secretion fingerprint analysis of pancreatic islets: applications, challenges and opportunities. **Lab on a chip, critical review**, 2015.

CHAVES, Y. S.; DESTEFANI, A. C. Fisiopatologia, diagnóstico e tratamento da síndrome de dumping e sua relação com a cirurgia bariátrica. **Arquivo Brasileiro de Cirurgia Digestiva**, v. 29, p. 116-119, 2016.

CHANG, S. H.; STOLL, C. R.; SONG, J.; VARELA, J. E.; EAGON, C. J.; COLDITZ, G. A. The effectiveness and risks of bariatric surgery: an updated systematic review and meta-analysis, 2003-2012. **JAMA Surgery**, v. 149, p. 275-87, 2014.

CLAYTON, R. D.; CARUCCI, L. R. Imaging following bariatric surgery: roux-en-Y gastric bypass, laparoscopic adjustable gastric banding and sleeve gastrectomy. **Br J Radiol**, v. 91, p. 20180031, 2018.

DAMASO, A.; TOCK, L. Obesidade - perguntas e respostas. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2005

DARKHAL, P.; GAO, M.; MA, Y.; LIU, D. Blocking High Fat Diet-induced Obesity, Insulin Resistance and Fatty Liver by Overexpression of Il-13 Gene in Mice. **International Journal of Obesity**, v. 39, n. 8, p. 1292-1299, 2015.

DÉJARDIN D. D. C.; PEREFERRER F. S.; GONZÁLEZ M. H.; BLASCO S. B.; SALA M. A. The evolution of experimental surgery in the field of morbid obesity. **Obesity Surgery**, v. 14, p. 1263-1272, 2004.

Diabetes Atlas. **International Diabetes Federation (IDF)**. Ninth edition, 2019.

DI CIAULA, A.; PORTINCASA, P. Diet and Contaminants: Driving the Rise to Obesity Epidemics? **Current Medicinal Chemistry**, 2017.

DOUROS, J. D.; NIU, J.; SDAO, S.; GREGG, T. FISHER-WELLMAN, K. BHARADWAJ, M.; MOLINA, A.; ARUMUGAM, R.; MARTIN, M. PETRITTO, E.; MERRINS, M. J.; HERMAN, M. A.; TONG, J.; CAMPBELL, J. Sleeve gastrectomy rapidly enhances islet function independently of body weight. **JCI Insight**, v. 4, p. 6, 2019.

DOUROS, J. D.; NIU, J.; SDAO, S.; GREGG, T.; MERRINS, M. J.; CAMPBELL, J.; TONG, J.; D'ALESSIO, D. Temporal plasticity of insulin and incretin secretion and insulin sensitivity following sleeve gastrectomy contribute to sustained improvements in glucose control. **Mol Metab.** V. 28, p144-150, 2019.

DOUROS, J. D.; TONG, J.; D'ALESSIO, D. A. The Effects of Bariatric Surgery on Islet Function, Insulin Secretion, and Glucose Control. **Endocrine reviews**, v. 40, p. 1394-1423, 2019.

DUCKWORTH, W. C., BENNET, R. G., HAMEL, F. G. Insulin degradation: progress and -potential. **Endocrine Reviews**, v. 19, p. 608-24, 1998.

ERDMANN, J.; MAYR, M.; OPPEL, U.; SYPCHENKO, O.; WAGENPFEIL, S.; SCHUSDZIARRA, V. Weight-dependent differential contribution of insulin secretion and clearance to hyperinsulinemia of obesity. **Regulatory Peptides**, v. 152, p. 1-7, 2009.

FAKHRAI-RAD, H.; NIKOSHKOV, A.; KAMEL, A.; FERNSTRÖM, M.; ZIERATH J. R.; NORNGREN, S.; LUTHMAN, H.; GALLI, J. Insulin-degrading enzyme identified as a candidate diabetes susceptibility gene in GK rats. **Hum Mol Genet**, v. 9, n. 14, p. 2149-58, 2000.

FARRIS, W.; MANSOURIAN, S.; CHANG, Y.; LINDSLEY, L.; ECKMAN, E. A.; FROSCH, M. P.; ECKMAN, C. B.; TANZI, R. E.; SELKOE, D. J.; GUENETTE, S. Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, p. 4162-7, 2003.

FOLEY, K. P.; ZLITNI, S.; DUGGAN, B. M.; BARRA, N. G.; ANHÊ, F. F.; CAVALLARI, J. F.; HENRIKSBO, B. D.; CHEN, C. Y.; HUANG, M.; LAU, T. C.; PLANTE, R.; SCHWAB, M.; MARETTE, A.; SCHERTZER, J. D. Gut microbiota impairs insulin clearance in obese mice. **Molecular metabolism**, v. 42, p. 101067, 2020.

FREZZA, E. E. Laparoscopic Vertical Sleeve Gastrectomy for Morbid Obesity. The Future Procedure of Choice? **Surgery Today**, v. 37, p. 275–281, 2007.

FRIED, M.; YUMUK, V.; OPPERT, J. M.; SCOPINARO, N.; TORRES, A.; WEINER, R.; YASHKOV, Y.; FRÜHBECK, G. Interdisciplinary European guidelines on metabolic and bariatric surgery. **Obesity Surgery**, v. 24, p. 42–55, 2014.

FU, Z.; GILBERT, E. R.; LIU, D. Regulation of Insulin Synthesis and Secretion and Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes. **Current diabetes reviews**, v. 9, n. 1, p. 25-53, 2013.

GAVIN, J. R.; ROTH, J.; NEVILLE JR, D. M.; de MEYTS, P.; BUELL, D. N. Insulin-dependent regulation of insulin receptor concentrations: a direct demonstration in cell culture. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 71, p. 84-8, 1974.

GHIBAUDI, L.; COOK, J.; FARLEY, C.; HEEK, M. V.; HWA J. J. Fat Intake Affects Adiposity, Comorbidity Factors, and Energy Metabolism of Sprague-Dawley Rats. **Obesity**, v. 10, n. 9, p. 956-963, 2002.

GOITEIN, D.; LEDERFEIN, D.; TZIONI, R.; BERKENSTADT, H.; VENTURERO, M.; RUBIN, M. Mapping of ghrelin gene expression and cell distribution in the stomach of morbidly obese patients--a possible guide for efficient sleeve gastrectomy construction. **Obesity Surgery**, n. 22(4), p. 617-22, 2012.

GUO, S. Insulin signaling, resistance, and metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms. **Journal of Endocrinology**, v. 220, n. 2, p. T1-T23, 2014.

HUA, R.; WANG, G.; SHEN, W.; YANG, Y.; WANG, M.; WU, M.; SHAO, Y.; HE, M.; ZANG, Y.; YAO, Q.; ZHANG, Z. Sleeve gastrectomy ameliorated high-fat diet (HFD)-induced non-alcoholic fatty liver disease and upregulated the nicotinamide adenine dinucleotide +/ Sirtuin-1 pathway in mice. **Asian J Surg**, v.44, p. 213-220, 2021.

HILL, J. O.; COMMERFORD, R. Exercise, fat balance and energy balance. **International journal of sport nutrition**, v. 6, n.2, p. 80-92, 1996.

HUBERT, H. B.; FEINLEIB, M.; MCNAMARA, P. M.; CASTELLI, W. P. Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants on the Framingham Heart Study. **Circulation**, v. 67, p. 968-977, 1983.

IFSO Global Registry. **The International Federation for the Surgery of Obesity and Metabolic Disorders**. Fifth edition, 2019.

JAHN, R., FASSHAUER, D. Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles. **Nature**, v. 490, n. 7419, p. 201, 2012.

JONES, A. G.; HATTERSLEY, A. T. The clinical utility of C-peptide measurement in the care of patients with diabetes. **Diabet Med**, v.30, p.803-17, 2013.

KAHN, S. E.; HULL, R. L.; UTZSCHNEIDER, K. M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, vol. 444, p.14, 2006.

KANETY, H.; MOSHE, S.; SHAFRIR, E.; LUNENFELD, B.; KARASIK, A. Hyperinsulinemia induces a reversible impairment in insulin receptor function leading to diabetes in the sand rat model of non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Medical Sciences**, vol. 91, p. 1853-1857, 1994.

KARAMANAKOS, S. N.; VAGENAS, K.; KALFARENTZOS, F.; ALEXANDRIDES, T. K. Weight loss, appetite suppression, and changes in fasting and postprandial ghrelin and peptide-YY levels after Roux-en-Y gastric bypass and sleeve gastrectomy: a prospective, double blind study. **Annals of Surgery**, v.247, p.401-7, 2008.

KELLY, C. T.; MANSOOR, J. DOHM, D. L.; CHAPMAN, W. H. H.; PENDER, J.; PORIES, W. J. Hyperinsulinemic syndrome: The metabolic syndrome is broader than you think. **Surgery**, v.156, p.405-11, 2014.

KOTHARI, V.; LUO, Y.; TORNABENE, T.; O'NEILL, A. M.; GREENE, M. W.; GEETHA, T.; BABU, J. R. High fat diet induces brain insulin resistance and cognitive impairment in mice. **Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease**, v. 1863, p. 499-508, 2016.

KRZYSZTOSZEK, J., WIERZEJSKA, E., ZIELIŃSKA, A. Obesity. An analysis of epidemiological and prognostic research. **Archives of Medical Science**, v.16, n.11, p.24-33, 2015.

LANG, P.; HASSELWANDER, S.; LI, H.; XIA, N. Effects of different diets used in diet-induced obesity models on insulin resistance and vascular dysfunction in C57BL/6 mice. **Scientific Reports**, p. 9, n. 19556, 2019.

LEE, H. S.; LEE, Y. J.; CHUNG, Y. H.; NAM, Y.; KIM, S. T.; PARK, E. S.; HONG, S. M.; YANG, Y. K.; KIM, H. C.; JEONG, J. H. Beneficial Effects of Red Yeast Rice on High-Fat Diet-Induced Obesity, Hyperlipidemia, and Fatty Liver in Mice. **Journal of Medicinal Food**, v. 18, n. 10, p. 1095-1102, 2015.

LEE, M. O. Determination of the surface of the White rat with its application to the expression of metabolic results. **American Journal of Physiology**, v. 89, p. 24-33, 1929.

LEE, W.; ALMALKI, O. Recent advancements in bariatric/metabolic surgery. **Annals of Gastroenterol Surgery**, v. 1, p. 171-179, 2017.

LEONETTI, F.; CAPOCCIA, D.; COCCIA, F.; CASELLA, G.; BAGLIO, G.; PARADISO, F.; ABBATINI, F.; IOSSA, A.; SORICELLI, E.; BASSO, N. Obesity, type 2 diabetes mellitus, and other comorbidities: a prospective cohort study of laparoscopic sleeve gastrectomy vs medical treatment. **Archives of Surgery**, v. 147, p. 694-700, 2012.

LI, P.; RAO, Z.; LAING, B.; BUNNER, W. P.; LANDRY, T.; PRETE, A.; YUAN, Y.; ZHANG, Z.; HUANG, H. Vertical sleeve gastrectomy improves liver and hypothalamic functions in obese mice. **Journal of Endocrinology**, v. 241, p. 135-147, 2019.

LIN, Y. Y.; HSIEH, P. S.; CHENG, Y. J.; CHENG, S. M.; CHEN, C. J.; HUANG, C. Y.; KUO, C. H.; KAO, C. L.; SHYU, W. C.; LEE, S. D. Anti-apoptotic and Pro-survival Effects of Food Restriction on High-Fat Diet-Induced Obese Hearts. **Cardiovascular Toxicology**, 2016.

LIU, S.; ZHANG, Q.; CHEN, C.; GE, D.; QU, Y.; CHEN, R.; FAN, Y.; LI, N.; TANG, W. W.; ZHANG, W.; ZHANG, K.; WANG, A. R.; ROWAN, B. G.; HILL, S. M.; SARTOR, O.; ABDEL-MAGEED, A. B.; MYERS, L.; LIN, Q.; You, Z. Hyperinsulinemia enhances interleukin-17-induced inflammation to promote prostate cancer development in obese mice through inhibiting glycogen synthase kinase 3-mediated phosphorylation and degradation of interleukin-17 receptor. **Oncotarget**, v. 22, p. 13651-66, 2016.

LIU, Z.; PATIL, I. Y.; JIANG, T.; SANCHETI, H.; WALSH, J. P.; STILES, B. L.; YIN, F.; CADENAS, E. High-Fat Diet Induces Hepatic Insulin Resistance and Impairment of Synaptic Plasticity. **PLoS One**, v. 10, p.5, 2015.

LUZ, D. M. D; ENCARNAÇÃO, J. N. Vantagens e desvantagens da cirurgia bariátrica para o tratamento da obesidade mórbida. **Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento**, v. 2, p. 376-383, 2008.

MALONE, J. I.; HANSEN, B. C. Does obesity cause type 2 diabetes mellitus (T2DM)? Or is it the opposite?. **Review Pediatr Diabetes**, v. 20, p. 5-9, 2019.

MANOLOPOULOU, M.; GUO, Q.; MALITO, E.; SCHILLING, A. B.; TANG, W. J. Molecular basis of catalytic chamber-assisted unfolding and cleavage of human insulin by human insulin-degrading enzyme. **J Biol Chem**, v. 284, n. 21, p.14177-88, 2009.

MINGRONE, G.; PANUNZI, S.; DE GAETANO, A.; GUIDONE, C.; IACONELLI, A.; NANNI, G.; CASTAGNETO, M.; BORNSTEIN, S.; RUBINO, F. Bariatric-metabolic surgery versus conventional medical treatment in obese patients with type 2 diabetes: 5 year follow-up of an open-label, single-centre, randomised controlled trial. **Lancet**, v. 386, p. 964-73, 2015.

NAJJAR, S. M. Regulation of insulin action by CEACAM1. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 13, p. 240-5, 2002.

NAJJAR, S. M.; PERDOMO, G. Hepatic Insulin Clearance: Mechanism and Physiology. **Physiology Bethesda**, v. 34, p. 198-215, 2019.

NICOLADIS, S. Environment and obesity. **Metabolism Clinical and Experimental**, v. 100, 2019.

OKWECHIME, I. O.; ROBERSON, S.; ODOI, A. Prevalence and Predictors of Pre-Diabetes and Diabetes among Adults 18 Years or Older in Florida: A Multinomial Logistic Modeling Approach. **Plos One**, v. 10, n. 12, p 1-17, 2015.

PAN, F.; HONG, L. Insulin promotes proliferation and migration of breast cancer cells through the extracellular regulated kinase pathway. **Asian Pacific Journal of Cancer prevention**, v. 15, p. 6349-52, 2014.

PIVOVAROVA, A.; VON LOEFFELHOLZ, C.; ILKAVETS, I.; STICHT, C.; ZHUK, S.; MURAHOVSKI, V.; LUKOWSKI, S.; DÖCKE, S.; KRIEBE, J.; GALA, T. H.; MALASHICHEVA, A.; KOSTAREVA, A.; LOCK, J. F.; STOCKMANN, M.; GRALLERT, H.; GRETZ, N.; DOOLEY, S.; PFEIFFER, A. F. H.; RUDOVICH, N. Modulation of insulin degrading enzyme activity and liver cell proliferation. **Cell Cycle**, v. 15, p. 2293-2300, 2015.

PIVOVAROVA, O.; HÖHN, A.; GRUNE, T.; PFEIFFER, A. F. H.; RUDOVICH, N. Insulin-degrading enzyme: new therapeutic target for diabetes and Alzheimer's disease? **Annals of Medicine**, p. 114-116, 2016.

PRENTKI, M.; NOLAN, C. J. Islet β cell failure in type 2 diabetes. **The Journal of Clinical Investigation**, v.116, n.7, p.1802-1812, 2006.

REIS, L. D. O.; NASSIF, P. A. N.; TABUSHI, F. I.; MILLÉO, F. Q.; FAVERO, G. M.; ARIEDE, B. L.; REIS, C. F. D.; DALABONA, B. F. Preliminary Analysis Of Interleukin-6 Changes In Pre- And Postoperative In Diabetic Patients With BMI <35 Submitted

To Partial Duodenal Switch. **Arquivo Brasileiro de Cirurgia Digestiva**, v. 29, p. 252-256, 2016.

ROSIEK, A., MACIEJEWSKA, F., LEKSOWSKI, K., ROSIEK-KRYSZEWSKA, A., LEKSOWSKI, L. Effect of Television on Obesity and Excess of Weight and Consequences of Health. **International Journal of Environmental**, v.12, v.8, p.9408-9426, 2015.

ROSINI, T. C.; da SILVA, A. S. R.; de MORAES, C.; Obesidade induzida por consumo de dieta: modelo em roedores para o estudo dos distúrbios relacionados com a obesidade. **Revista Associação Médica Brasileira**, v. 58, p. 383-387, 2012

RUTTER, G. A., PULLEN, T. J., HODSON, D. J., MARTINEZ-SANCHEZ, A., MCLUSKEY, K., MOTTRAM, J., VAN DIJCK, P. Pancreatic β -cell identity, glucose sensing and the control of insulin secretion. **Biochemical Journal**, v. 466, n. 2, p. 203-218, 2015.

SBCBM. **Sociedade Brasileira de Cirurgia Bariátrica e metabólica**. Número de cirurgias bariátricas no Brasil aumenta 46,7%, 2018. Disponível em: <https://www.sbcm.org.br/numero-de-cirurgias-bariatricas-no-brasil-aumenta-467/11>. Acesso em: 03 de novembro, 2019.

SBCBM. **Sociedade Brasileira de Cirurgia Bariátrica e metabólica**. SBCBM divulga números e pede participação popular para cobertura da cirurgia metabólica pelos planos de saúde, 2020. Disponível em: <https://www.sbcm.org.br/sbcm-divulga-numeros-e-pede-participacao-popular-para-cobertura-da-cirurgia-metabolica-pelos-planos-de-saude/>. Acesso em: 05 de junho, 2021.

SBEM. **Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia**, 2008. Disponível em: <https://www.endocrino.org.br/obesidade/>. Acesso em: 20 de julho, 2019.

SCHAUER, P. R.; KASHYAP, S. R.; WOLSKI, K.; BRETHAUER, S. A.; KIRWAN, J. P.; POTHIER, C. E.; THOMAS, S.; ABOOD, B.; NISSEN, S. E.; BHATT, D. L. Bariatric Surgery versus Intensive Medical Therapy in Obese Patients with Diabetes. **N Engl J Med**, v. 366(17), p. 1567–1576, 2012.

SIEBER, P.; GASS, M.; KERN, B.; PETERS, T.; SLAWIK, M.; PETERLI, R. Five-year results of laparoscopic sleeve gastrectomy. **Surg Obes Relat Dis**, v10, n.2, p. 243-9, 2014.

SMEU, B.; BALESU, I.; SARBU, A.; FICA, S.; COPAESCU, C. Early Improvement in Glycemic Metabolism after Laparoscopic Sleeve Gastrectomy in Obese Patients - A Prospective Study. **Chirurgia**, v.110, n.5, p430-9, 2015.

SOWERS, J. R. Obesity and cardiovascular disease. **Clinical Chemistry**, v. 44, p. 1821-1825, 1998.

STOLAR, M. W. Atherosclerosis in diabetes: The role of hyperinsulinemia. **Metabolism**, v. 37, p. 1-9, 1988.

STRATMANN, B; KREPAK, Y; SCHIFFER, E; JARICK, I; HAUBER, M; LEE - BARKEY, Y. H; FISCHER, M; TSCHOEPE, D. Beneficial Metabolic Effects of Duodenal Jejunal Bypass Liner for the Treatment of Adipose Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: Analysis of Responders and Non-Responders. **Hormone and Metabolic Research**, 48 (10), 630-637, 2016.

TACK, J.; DELOOSE, E. Complications of bariatric surgery: dumping syndrome, reflux and vitamin deficiencies. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 28, n. 4, p. 741–749, 2014.

TANG, W. Targeting insulin-degrading enzyme to treat type 2 diabetes. **Trends Endocrinol Metab**, v. 27, n.1, p. 24–34, 2016.

TAVARES, T. B.; NUNES, S. M.; SANTOS, M. O. Obesidade e qualidade de vida: revisão de literatura. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 20, n. 3, p. 359-366, 2010.

UCLA. Bariatric Surgery. Gastric Sleeve, 2019. Disponível em: <http://surgery.ucla.edu/bariatrics-gastric-sleeve>. Acesso em: 9 de setembro, 2019.

VAKILIAN, M.; TAHAMTANI, Y.; GHAEDI, K. A review on insulin trafficking and exocytosis. **Gene**, v. 706, p. 52-61, 2019.

VALERA MORA, M. E.; SCARFONE, A.; CALVANI, M.; GRECO, A. V.; MINGRONE, G. Insulin clearance in obesity. **J Am Coll Nutr**, v. 22 n.6, p.487-93, 2003.

VECCHIÉA, A. DALLEGRI, F.; CARBONE, F.; BONAVENTURA, A.; LIBERALE, L.; PORTINCASA, P.; FRÜHBECKE, G.; MONTECUCCO, F. Obesity phenotypes and their paradoxical association with cardiovascular diseases. **European Journal of Internal Medicine**, 2017.

von der HEIJDEN, R. A.; SHEEDFAR, F.; MORRISON, M. C.; HOMMELBERG, P. P.; KOR, D.; KLOOSTERHUIS, N. J.; GRUBEN, N.; YOUSSEF, S. A.; de BRUIN, A.; HOFKER, M. H.; KLEEMANN, R.; KOONEN, D. P.; HEERINGA, P. High-fat diet induced obesity primes inflammation in adipose tissue prior to liver in C57BL/6j mice. **Aging**, v. 7, p. 256-68, 2015.

VIGITEL. Brasil 2019 : vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico : estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2019 [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Análise em Saúde e Vigilância de Doenças não Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2020.

VEDANA, E.; DE ANSELMO PERES, M.; DAS NEVES, J.; DA ROCHA, G.; LONGO, G. Prevalência de obesidade e fatores potencialmente causais em adultos em região do sul do Brasil. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, 52, 1156-1162, 2008.

WANG, Y.; BEYDOUN, M. A. The obesity epidemic in the United States--gender, age, socioeconomic, racial/ethnic, and geographic characteristics: a systematic review and meta-regression analysis. **Epidemiologic Reviews**, v. 29, p. 6-28, 2007.

WHO. **World Health Organization**. Obesity and overweight, 2018a. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> Acesso: 18 de julho, 2019.

WHO. **World Health Organization**. Diabetes. 2018b. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>. Acesso em: 5 de outubro, 2019.

WILLIAMS, K. J.; WU, X. Imbalanced insulin action in chronic over nutrition: Clinical harm, molecular mechanisms, and a way forward. **Atherosclerosis**, v. 247, p. 225-82, 2016.

ZECCHIN, H. G., CARVALHEIRA, J. B. C., SAAD, M. J. A. Mecanismos moleculares de resistência à insulina na síndrome metabólica. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, v. 14, n. 4, p. 574-589, 2004.

ZETU, C.; POPA, S.G.; POPA, A.; MUNTEANU, R.; MOTA, M. Long-Term Improvement Of Glucose Homeostasis And Body Composition Inpatients Undergoing Laparoscopic Sleeve Gastrectomy. **Endocrine Care**, v. 14, n. 4, p. 477-482, 2018.

ZIMMET, P.; ALBERTI, KG.; RUBINO, F.; DIXON, JB. IDF's view of bariatric surgery in type 2 diabetes. **The Lancet**, v. 378, p. 108-10, 2011.

ANEXO I – PARECER COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada Papel do crosstalk Intestino-Pâncreas na manutenção da homeostase glicêmica de camundongos obesos submetidos à gastrectomia vertical: Uma abordagem molecular e funcional, registrada com o nº 5242-1/2019, sob a responsabilidade de Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro e Gabriela Moreira Soares, Jean Fracisco Vettorazzi, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata - subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em reunião de 09/05/2019.

Finalidade:	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/07/2019 a 30/06/2021
Vigência da autorização para manipulação animal:	09/05/2019 a 30/06/2021
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib
No. de animais:	15
Idade/Peso:	1,00 Meses / 15,00 Gramas
Sexo:	15 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib
No. de animais:	15
Idade/Peso:	1,00 Meses / 15,00 Gramas
Sexo:	15 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib
No. de animais:	15
Idade/Peso:	1,00 Meses / 15,00 Gramas
Sexo:	15 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6JUnib
No. de animais:	15
Idade/Peso:	1,00 Meses / 15,00 Gramas
Sexo:	15 Machos
Origem:	CEMIB
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério 1 - Área de Fisiologia e Biofísica, DBEF/IB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização a junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBIO** e é restrita a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 31 de maio de 2019.

ANEXO II – NORMAS PARA SUBMISSÃO REVISTA DIABETES, OBESITY AND METABOLISM

21/06/2021

Diabetes, Obesity and Metabolism

Sections

- [1. Aims and Scope](#)
- [2. Submission](#)
- [3. Manuscript Categories and Requirements](#)
- [4. Preparing Your Submission](#)
- [5. Editorial Policies and Ethical Considerations](#)
- [6. Author Licensing](#)
- [7. Publication Process After Acceptance](#)
- [8. Post Publication](#)
- [9. Editorial Office Contact Details](#)

1. AIMS AND SCOPE

Authors are reminded that *Diabetes, Obesity and Metabolism* is primarily a journal of pharmacology and therapeutics, focused mainly on human research relevant to patient care.

The scope of the journal includes studies of pharmacokinetics and pharmacodynamics, cost-effectiveness, real world evidence of drug utilisation, safety and effectiveness, as well as conventional randomised controlled trials (phase I-IV studies). High-quality meta-analyses and systematic reviews that provide original information on treatment effects and safety are considered as original research papers. DOM also welcomes manuscripts which report clinical data relating to novel devices, Apps, glucose sensors and insulin pumps used to improve glycaemic control.

2. SUBMISSION

Authors should note that submission of a manuscript implies that the content has not been published previously (except in abstract form, e.g. as part of conference proceedings), and is not under consideration by any other journal.

By submitting a manuscript to, or reviewing for, this journal, your name, email address, and affiliation, and other contact details the journal might require, will be used for the regular operations of the publication, including, when necessary, sharing with the publisher (Wiley) and partners for production and publication.

The journal and the publisher recognise the importance of protecting the personal information collected from users in the operation of these services, and have practices in place to ensure that steps are taken to maintain the security, integrity, and privacy of the personal data collected and processed. You can learn more at <https://authorservices.wiley.com/statements/data-protection-policy.html>.

Once the submission materials have been prepared in accordance with the Author Guidelines, manuscripts should be submitted online at: <http://mc.manuscriptcentral.com/dom>

Transparent Peer Review

Diabetes Obesity and Metabolism is participating in a scheme to improve Peer Review Transparency. We encourage all authors to opt in to transparent peer review (TPR) at the time of manuscript submission. If authors opt into TPR, and their paper is eventually accepted for publication in DOM, the (anonymised) peer

review reports, editorial correspondence and author responses during revision will be publically accessible via a link to [Publons](#), once the article is published in the journal. It is pleasing that >90% of authors are currently opting in to TPR.

Data Protection and Privacy

By submitting a manuscript to, or reviewing for, this publication, your name, email address, institutional affiliation, and other contact details the publication might require, will be used for the regular operations of the publication, including, when necessary, sharing with the publisher (Wiley) and partners for production and publication. The publication and the publisher recognize the importance of protecting the personal information collected from users in the operation of these services, and have practices in place to ensure that steps are taken to maintain the security, integrity, and privacy of the personal data collected and processed. You can learn more at <https://authorservices.wiley.com/statements/data-protection-policy.html>.

Preprint Policy

Diabetes, Obesity and Metabolism will consider for review articles previously available as preprints. Authors may also post the [submitted version](#) of a manuscript to a preprint server at any time. Authors are requested to update any pre-publication versions with a link to the final published article.

3. MANUSCRIPT CATEGORIES AND REQUIREMENTS

(I) Original Research Papers

Original papers should be structured as follows:

Title page: Author names, affiliations, and a short running title. The word counts for the abstract and the main body of the text (excluding references and legends) should be clearly stated, along with the number of references, tables and figures. Please conform to the guidance on manuscript size below

Structured abstract: Subheadings - aims, materials and methods, results, and conclusions (maximum 250 words);

Main manuscript: Should be typed double-spaced and structured as follows: introduction; materials and methods (including appropriate subsections, e.g. statistical methods); results; discussion; acknowledgements; references (normally 40); legends to figures; tables; and figures.

Original manuscripts should be 3,500 words (not including references, tables and figures). Manuscripts should include a maximum of 5 Figures and/or tables. Additional tables or figures and/or extra methodological detail can be included in a separate Supplementary Appendix. The production and handling Editors may relocate tables or figures into a Supplementary Appendix prior to the production of page proofs if the manuscript exceeds these specifications at the time of final acceptance.

(II) Brief Reports

These are short communications of original research which are fully cited references. They provide a concise report of a research analysis with a clear conclusion. Manuscripts should include a short non-structured abstract (180 words maximum) and be sub-divided into sections (Introduction, Methods, Results and conclusions). The total manuscript length should not exceed 1800 words, excluding references and abstract. Brief Reports can include a maximum of 15 references (+ any number of references to work published in *Diab. Obes. Metab.*) and 2 figures OR tables. Additional information (e.g Tables or Figures) can be provided as a Supplementary Appendix.

(III) Review Articles

We welcome unsolicited narrative reviews on important topics of therapeutics and pharmacology. Good review articles should provide novel insights, analysis and interpretation of the published literature and offer a balanced critical appraisal of established or emerging therapies. Formal Systematic reviews and meta-analyses should be formatted and submitted as original research papers. Review articles should not exceed

5000 words and 100 references. Additional data (eg Tables) can be provided as a Supplementary Appendix. The handling Editor may relocate tables or figures into a supplementary Appendix if the manuscript exceeds these specifications and/or 10 printed pages.

(iv) Letters to the Editor

Correspondence relating to work that has been published in the journal, and/or other brief comments, case reports or observations, may be submitted as a succinct letter to the editor.

Video abstracts

After submitting a manuscript to the journal, authors have the option to purchase an accompanying video abstract version of the article, following the steps below:

1. Once the original manuscript is accepted, visit the Wiley Editing Services website (<https://www.wileyeditingservices.com/en/>) and go to the video options section (<https://www.wileyeditingservices.com/en/article-promotion/video-creation>). Select 'Video abstract' and follow the online booking instructions.
2. Once the video abstract has been created, please upload it as a link in Scholar One, selecting the article type 'Digital Enhancement'. Please do not upload the video file itself.
3. The video abstract will be reviewed by the editorial team but it will not be peer reviewed by the original article peer reviewers (this is only available for video abstracts submitted by corporate sponsors).
4. If the video abstract is accepted for publication the author will be notified and it will be published alongside the finished article in the online journal.

4. PREPARING YOUR SUBMISSION

Authorship

Please refer to the journal's Authorship policy in the Editorial Policies and Ethical Considerations section for details on author listing eligibility.

Acknowledgments

Contributions from anyone who does not meet the criteria for authorship should be listed, with permission from the contributor, in an Acknowledgments section. Financial and material support should also be mentioned. Thanks to anonymous reviewers are not appropriate.

Conflict of Interest Statement

Authors will be asked to provide a conflict of interest statement during the submission process. For details on what to include in this section, see the 'Conflict of Interest' section in the Editorial Policies and Ethical Considerations section below. Submitting authors should ensure they liaise with all co-authors to confirm agreement with the final statement.

References

All references should be numbered consecutively in order of appearance and should be as complete as possible. In text citations should cite references in consecutive order using Arabic superscript numerals.

For more information about this reference style, please see the AMA Manual of Style.

Reference examples follow:

Journal article

1. King VM, Armstrong DM, Apps R, Trott JR. Numerical aspects of pontine, lateral reticular, and inferior olivary projections to two paravermal cortical zones of the cat cerebellum. *J Comp Neurol* 1998;390:537-551.

Book

the Front page & the Abstract page to the Editorial office (susan.jane@nottingham.ac.uk). A Journal Editor will advise within 48 hours on whether the full manuscript is suitable for Fast-track consideration.

For manuscripts we agree to evaluate under a Fast-Track pathway, a submission fee of US \$2,000 (plus VAT in the UK) is payable. Authors will upload the full submission and select 'fast-track' as the manuscript type. The Editorial office will expedite full peer-review and a decision will be made. There is no guarantee of final acceptance for papers that are reviewed as 'Fast-Track'.

If a 'Fast-Track' manuscript is accepted, usually after revision and re-evaluation, the paper will be prioritised in production with early proofs. The 'Fast-Track' system expedites production and placement into an issue, assuming the paper has been accepted. We aim to publish the final article as an EarlyView paper (edited, typeset and as corrected final proofs) within 20 to 28 days, and place it into the next monthly issue about one month later.

Authors planning to submit a Fast Track paper are encouraged to contact the Editorial Office in advance of submission, so that peer-review can be planned in advance. An invoice will be issued by Wiley for the submission fee on submission of the manuscript via our "Fast Track" process – please provide full details to whom this invoice should be sent (including an email address).

5. EDITORIAL POLICIES AND ETHICAL CONSIDERATIONS

Peer Review and Acceptance

The acceptance criteria for all papers is the quality and originality of the research and its significance to our readership. Papers will only be sent to review if the Editor-in-Chief determines that the paper meets the appropriate quality and relevance requirements. Wiley's policy on confidentiality of the review process is [available here](#).

Data Sharing and Data Accessibility

The journal encourages authors to share the data and other artefacts supporting the results in the paper by archiving it in an appropriate public repository. Authors should include a data accessibility statement, including a link to the repository they have used, in order that this statement can be published alongside their paper.

Human Studies and Subjects

For manuscripts reporting medical studies that involve human participants, a statement identifying the ethics committee that approved the study and confirmation that the study conforms to recognized standards is required, for example: [Declaration of Helsinki](#); [US Federal Policy for the Protection of Human Subjects](#); or [European Medicines Agency Guidelines for Good Clinical Practice](#). It should also state clearly in the text that all persons gave their informed consent prior to their inclusion in the study.

Patient anonymity should be preserved. Photographs need to be cropped sufficiently to prevent human subjects being recognized (or an eye bar should be used). Images and information from individual participants will only be published where the authors have obtained the individual's free prior informed consent. Authors do not need to provide a copy of the consent form to the publisher; however, in signing the author license to publish, authors are required to confirm that consent has been obtained. Wiley has a [standard patient consent form available](#) for use.

Clinical Trial Registration

The journal requires that clinical trials are prospectively registered in a publicly accessible database and clinical trial registration numbers should be included in all papers that report their results. Authors are asked to include the name of the trial register and the clinical trial registration number at the end of the abstract. If the trial is not registered, or was registered retrospectively, the reasons for this should be explained.

Research Reporting Guidelines

Accurate and complete reporting enables readers to fully appraise research, replicate it, and use it. Authors are expected to adhere to recognised research reporting standards. The EQUATOR Network collects more than 370 reporting guidelines for many study types, including for:

- **Randomised trials:** [CONSORT](#)
- **Observational studies:** [STROBE](#)
- **Systematic reviews:** [PRISMA](#)
- **Case reports:** [CARE](#)
- **Qualitative research:** [SRQR](#)
- **Diagnostic / prognostic studies:** [STARD](#)
- **Quality improvement studies:** [SQUIRE](#)
- **Economic evaluations:** [CHEERS](#)
- **Animal pre-clinical studies:** [ARRIVE](#)
- **Study protocols:** [SPIRIT](#)
- **Clinical practice guidelines:** [AGREE](#)

We also encourage authors to refer to and follow guidelines from:

- [Future of Research Communications and e-Scholarship \(FORCE11\)](#)
- [National Research Council's Institute for Laboratory Animal Research guidelines](#)
- [The Gold Standard Publication Checklist from Hooijmans and colleagues](#)
- [Minimum Information Guidelines from Diverse Bioscience Communities \(MIBBI\) website](#)
- [FAIRsharing website](#)

Species Names

Upon its first use in the title, abstract, and text, the common name of a species should be followed by the scientific name (genus, species, and authority) in parentheses. For well-known species, however, scientific names may be omitted from article titles. If no common name exists in English, only the scientific name should be used.

Genetic Nomenclature

Sequence variants should be described in the text and tables using both DNA and protein designations whenever appropriate. Sequence variant nomenclature must follow the current HGVS guidelines; see <http://varnomen.hgvs.org/>, where examples of acceptable nomenclature are provided.

Sequence Data

Nucleotide sequence data can be submitted in electronic form to any of the three major collaborative databases: DDBJ, EMBL, or GenBank. It is only necessary to submit to one database as data are exchanged between DDBJ, EMBL, and GenBank on a daily basis. The suggested wording for referring to accession-number information is: 'These sequence data have been submitted to the DDBJ/EMBL/GenBank databases under accession number U12345'. Addresses are as follows:

- DNA Data Bank of Japan (DDBJ): <http://www.ddbj.nig.ac.jp>
- EMBL Nucleotide Archive: ebi.ac.uk/ena
- GenBank: www.ncbi.nlm.nih.gov

Proteins sequence data should be submitted to either of the following repositories:

- Protein Information Resource (PIR): pir.georgetown.edu
- SWISS-PROT: expasy.ch/sprot/sprot-top

Conflict of Interest

The journal requires that all authors disclose any potential sources of conflict of interest. Any interest or relationship, financial or otherwise that might be perceived as influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of interest. These must be disclosed when directly relevant or

directly related to the work that the authors describe in their manuscript. Potential sources of conflict of interest include, but are not limited to: patent or stock ownership, membership of a company board of directors, membership of an advisory board or committee for a company, and consultancy for or receipt of speaker's fees from a company. The existence of a conflict of interest does not preclude publication. If the authors have no conflict of interest to declare, they must also state this at submission. It is the responsibility of the corresponding author to review this policy with all authors and collectively to disclose with the submission ALL pertinent commercial and other relationships.

Funding

Authors should list all funding sources in the Acknowledgments section. Authors are responsible for the accuracy of their funder designation. If in doubt, please check the Open Funder Registry for the correct nomenclature: <https://www.crossref.org/services/funder-registry/>

Authorship

The list of authors should accurately illustrate who contributed to the work and how. All those listed as authors should qualify for authorship according to the following criteria:

1. Have made substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data;
2. Been involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content;
3. Given final approval of the version to be published. Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content; and
4. Agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Contributions from anyone who does not meet the criteria for authorship should be listed, with permission from the contributor, in an Acknowledgments section (for example, to recognize contributions from people who provided technical help, collation of data, writing assistance, acquisition of funding, or a department chairperson who provided general support). Prior to submitting the article all authors should agree on the order in which their names will be listed in the manuscript.

Additional Authorship Options

Joint first or senior authorship: In the case of joint first authorship, a footnote should be added to the author listing, e.g. 'X and Y should be considered joint first author' or 'X and Y should be considered joint senior author.'

Correction to authorship

In accordance with Wiley's [Best Practice Guidelines on Research Integrity and Publishing Ethics](#) and the [Committee on Publication Ethics](#)' guidance, *Diabetes, Obesity and Metabolism* will allow authors to correct authorship on a submitted, accepted, or published article if a valid reason exists to do so. All authors – including those to be added or removed – must agree to any proposed change. To request a change to the author list, please complete the [Request for Changes to a Journal Article Author List Form](#) and contact either the journal's editorial or production office, depending on the status of the article. Authorship changes will not be considered without a fully completed Author Change form. Correcting the authorship is different from changing an author's name; the relevant policy for that can be found in [Wiley's Best Practice Guidelines](#) under "Author name changes after publication."

Publication Ethics

This journal is a member of the [Committee on Publication Ethics \(COPE\)](#). Note this journal uses iThenticate's CrossCheck software to detect instances of overlapping and similar text in submitted manuscripts. Read Wiley's Top 10 Publishing Ethics Tips for Authors [here](#). Wiley's Publication Ethics Guidelines can be found [here](#).

Transparent Peer Review

Diabetes Obesity and Metabolism is participating in a pilot on Peer Review Transparency, where the reviewer reports, author responses, and the editor's decision letters will be hosted on [Publons](#) and linked to from the published article in the case that the article is accepted. Authors have the opportunity to opt out during submission, and reviewers can choose to remain anonymous unless they would like to sign their report.

6. AUTHOR LICENSING

If a paper is accepted for publication, the author identified as the formal corresponding author will receive an email prompting them to log in to Author Services, where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be required to complete a copyright license agreement on behalf of all authors of the paper.

You may choose to publish under the terms of the journal's standard copyright agreement, or Open Access under the terms of a Creative Commons License.

Standard [re-use and licensing rights](#) vary by journal. Note that [certain funders](#) mandate a particular type of CC license be used. This journal uses the CC-BY/CC-BY-NC/CC-BY-NC-ND [Creative Commons License](#).

Self-Archiving Definitions and Policies: Note that the journal's standard copyright agreement allows for [self-archiving](#) of different versions of the article under specific conditions.

Open Access fees: If you choose to publish using open access you will be charged a fee. A list of Article Publication Charges for Wiley journals is available [here](#).

Funder Open Access: Please click [here](#) for more information on Wiley's compliance with specific Funder Open Access Policies.

7. PUBLICATION PROCESS AFTER ACCEPTANCE

Accepted Articles

'Accepted Articles' have been accepted for publication and undergone full peer review but have not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process. Accepted Articles are published online a few days after final acceptance, appear in PDF format only (without the accompanying full-text HTML) and are given a Digital Object Identifier (DOI), which allows them to be cited and tracked. The DOI remains unique to a given article in perpetuity. More information about DOIs can be found online at <http://www.doi.org/faq.html>. Given that Accepted Articles are not considered to be final, please note that changes will be made to an article after Accepted Article online publication, which may lead to differences between this version and the Version of Record.

The Accepted Articles service has been designed to ensure the earliest possible circulation of research papers after acceptance.

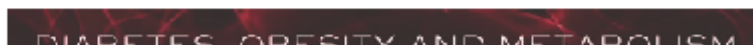
Accepted articles will be indexed by PubMed; therefore the submitting author must carefully check the names and affiliations of all authors provided in the cover page of the manuscript, as it will not be possible to alter these once a paper is made available online in Accepted Article format. Subsequently the final copyedited and proofed articles will appear either as Early View articles in a matter of weeks or in an issue on Wiley Online Library; the link to the article in PubMed will automatically be updated.

Proofs

Once the paper is typeset, the author will receive an email notification with full instructions on how to provide proof corrections.

Please note that the author is responsible for all statements made in their work, including changes made during the editorial process – authors should check proofs carefully. Note that proofs should be returned within 48 hours from receipt of first proof.

8. POST PUBLICATION



When the article is published online:

- The author receives an email alert (if requested).
- The link to the published article can be shared through social media.
- The author will have free access to the paper (after accepting the Terms & Conditions of use, they can view the article).
- The corresponding author and co-authors can nominate up to ten colleagues to receive a publication alert and free online access to the article.

Print copies of an article can now be ordered (instructions are sent at proofing stage) by emailing offprint@cosprinters.com

Article Promotion Support

[Wiley Editing Services](#) offers professional video, design, and writing services to create shareable video abstracts, infographics, conference posters, lay summaries, and research news stories to help support your research.

If you would like to produce a video abstract and are being supported by a pharmaceutical or medical device company, you might want to explore the options offered by [Wiley's Corporate Solutions](#) team. As well as peer review, the Corporate Solutions team will also organise for a sponsor logo and/or disclaimer to accompany your video abstract.

Measuring the Impact of an Article

Wiley also helps you measure the impact of your research through our specialist partnerships with [Kudos](#) and [Altmetric](#).

9. EDITORIAL OFFICE CONTACT DETAILS

Editorial Office: Susan.Lane@nottingham.ac.uk

Author Guidelines updated 25th November 2019



April 2021 Trending Article

[HbA1c and brain health across the entire glycaemic spectrum](#)

More From This Journal

- Volume 22, Issue S1: Diabetes and Chronic Kidney Disease
- Volume 22, Issue S2: ADVANCE Twenty Years On
- Volume 22, Issue S3: Understanding Real World Evidence in Diabetes
- Special collection: SGLTIs, DPPIVs and Biosimilar Insulins
- Most Accessed
- Most Cited
- Video Abstracts
- Journal Information
- COVID-19 and Diabetes

ANEXO III – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO



Susan Lane <onbehalf@manuscriptcentral.com>

Qua, 16/06/2021 10:04

Para: moreirasoaresg@gmail.com

Cc: Você; moreirasoaresg@gmail.com; slbalbo@hotmail.com; carinemtn@gmail.com; gabrielabronczek@gmail.com +6 pessoas



Dear Dr. Gabriela Soares

Thank you very much for submitting your manuscript to this journal. Diabetes, Obesity and Metabolism is primarily a journal of pharmacology and therapeutics, and the impact factor is now 6.715.

We have assigned a reference number to the manuscript, shown above, which you should cite in all future correspondence with the Editorial Office and the Publishing Department.

Your manuscript has been sent to an Editor who will make an initial assessment of whether the paper falls within the scope of the journal and whether the paper is likely to be competitive. Currently DOM can only accept 15-20% of submissions.

The editor will invite two or more independent reviewers to provide detailed peer review comments, and to provide the editor with their assessment of the quality, originality and impact of your research. You will be contacted again as soon as their reports have been received.

We are trying very hard to ensure timely completion of the peer review process. We endeavour to contact our authors with an initial editorial decision, enclosing referees' comments, within 40 days of submission (for 75% of papers we are currently making first decisions within 30 days).