

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

KATHIA REGINA CANTELLI

**EFEITOS DA DERIVAÇÃO DUODENO-JEJUNAL SOBRE O
METABOLISMO LIPÍDICO HEPÁTICO E MORFOLOGIA DAS
ILHOTAS PANCREÁTICAS EM RATOS COM OBESIDADE
HIPOTALÂMICA**

CASCAVEL-PR
(Julho/2015)

KATHIA REGINA CANTELLI

**EFEITOS DA DERIVAÇÃO DUODENO-JEJUNAL SOBRE O
METABOLISMO LIPÍDICO HEPÁTICO E MORFOLOGIA DAS
ILHOTAS PANCREÁTICAS EM RATOS COM OBESIDADE
HIPOTALÂMICA**

Dissertação apresentada ao Programa De Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Biociências e Saúde – Nível 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

ORIENTADORA: Maria Lúcia Bonfleur

CASCADEL-PR

(Julho/2015)

FOLHA DE APROVAÇÃO

KATHIA REGINA CANTELLI

**EFEITOS DA DERIVAÇÃO DUODENO-JEJUNAL SOBRE O METABOLISMO
LIPÍDICO HEPÁTICO E MORFOLOGIA DAS ILHOTAS PANCREÁTICAS EM
RATOS COM OBESIDADE HIPOTALÂMICA**

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.

Orientadora: Prof.^a Dra. Maria Lúcia Bonfleur
Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Prof.^a Dra. Sabrina Grassioli
Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Prof.^o Dr. Paulo Afonso Nunes Nassif
Faculdade Evangélica do Paraná

CASCADEL-PR
(Julho/2015)

***Dedico este trabalho com todo o carinho aos meus Pais,
à minha irmã, à minha afilhada, ao meu namorado e aos meus Pets,
por estarem sempre comigo, me fazendo bem, e fazendo
desta caminhada mais leve.***

AGRADECIMENTOS

As Professoras Maria Lúcia Bonfleur, minha orientadora, e Sandra Balbo, colaboradora número um desse projeto, por terem confiado em mim, acima de tudo, e por todos os ensinamentos profissionais e pessoais. Não tenho palavras pra agradecer!!!

À minha amiga e parceira de experimentos, Gabriela, por toda a parceria dentro e fora do laboratório, e pelo respeito e amizade que desenvolvemos ao longo desse tempo juntas.

À minha amiga Karine, que mesmo não fazendo parte desse experimento, me ajudou dentro e fora do laboratório, em todos os momentos que eu precisei. Obrigada amiga, jamais esquecerei...!

A todos os amigos do Laboratório de Fisiologia Endócrina e Metabolismo (LAFEM): Milara, Camila, Ana Cláudia, Ana Flávia, Iala, Rodrigo, Angélica, Mariana e as técnicas de laboratório Margaret e Odete, que de uma forma ou de outra sempre me ajudaram. Eu não teria conseguido sem vocês.

Ao técnico de laboratório Assim Escher por toda a ajuda dedicada a esse trabalho, do início ao fim, e por ser parte muito importante da família LAFEM.

Aos membros da banca do projeto, qualificação e defesa, por todas as sugestões e pelo aprimoramento deste trabalho.

Aos amigos da III Turma do Mestrado em Biociências e Saúde por toda a parceria que tivemos desde o início.

Ao meu namorado, Rodrigo, por todas as horas que passou em claro comigo; por todas as vezes que foi pra faculdade comigo de madrugada quando eu precisava deixar os animais em jejum; por me ajudar a lavar caixas; por me ajudar a mexer no Word, Excel, Power Point...!!!; por me aguentar sempre, sempre, sempre... quando eu estava chateada, triste, feliz, alegre, bipolar, “tripolar”, enfim, por sempre estar “ali” em todos os momentos. Você é muito importante pra mim, te amo!!!

Aos meus pais e irmã, pelo apoio e incentivo de sempre, por dividirem comigo as angústias e alegrias durante a execução desse projeto. Muito obrigada, eu amo vocês!!!

A todas as pessoas que de alguma forma, pessoal ou profissional, fizeram com que esse trabalho tenha dado certo. Agradeço a todos de coração!

RESUMO GERAL

Objetivo: Avaliar a expressão de genes e proteínas envolvidos com a via lipídica hepática e investigar se a melhoria na homeostase glicêmica está associada a alterações na morfologia das ilhotas em ratos MSG submetidos à derivação duodeno-jejunal (DDJ). *Métodos:* Durante os primeiros 5 dias de vida, ratos *Wistar* recém-nascidos receberam injeções subcutâneas de glutamato monossódico [4 g / kg de peso corporal (BW), grupo MSG], ou solução salina (grupo CTL). Aos 90 dias de idade, os animais MSG foram submetidos à DDJ ou a falsa operação, formando os grupos MSG-DDJ e MSG-FO, respectivamente. Dois após a cirurgia, foram avaliados os parâmetros séricos, a expressão de genes e proteínas do fígado e morfologia das ilhotas pancreáticas. *Resultados:* A cirurgia de DDJ normalizou as concentrações de triglicerídeos séricos (TG) e dos ácidos graxos não-esterificados em comparação aos animais MSG-FO, porém não alterou o conteúdo de TG no fígado, bem como, a expressão de genes e proteínas hepáticas envolvidas com o metabolismo lipídico. Além disso, a DDJ normalizou a insulinemia e a resistência à insulina, e restaurou a secreção de insulina pelas células- β na presença de 8,3 mM de glicose, independentemente da perda de peso. Ainda, ratos MSG-DDJ apresentaram redução nas áreas totais da ilhota e de células β (% área pâncreas) e na proliferação de células da ilhota (verificado pelo número de núcleos corados por Ki67). *Conclusões:* A cirurgia de DDJ não alterou o metabolismo lipídico no fígado, dois meses após a realização da cirurgia, sendo assim, a melhora na homeostase glicêmica nos animais pode estar associada a alterações na morfologia e proliferação das ilhotas pancreáticas.

Palavras-chave: derivação duodeno-jejunal; obesidade hipotalâmica; morfologia de células- β ; lipídios.

GENERAL ABSTRACT

Purpose: Herein we evaluated the expression of genes and protein involved with hepatic lipids pathway and investigate whether the improvement on glucose homeostasis is associated with modifications in the islets morphology in HyO rats submitted to duodenal-jejunal bypass (DJB). *Methods:* During the first 5 days of life, male newborn Wistar rats received a subcutaneous injection of monosodium glutamate [4 g/kg body weight (BW), hypothalamic obesity (HyO) group], or saline (CTL group). At 90 days of age, HyO rats were submitted to DJB or sham operations forming HyO DJB and HyO Sham group, respectively. Two months after DJB, serum parameters, expression of genes and protein in the liver and islets morphology were verified. *Results:* Although DJB operation normalized serum triglycerides (TG) and non-esterified fatty acids (NEFA) concentration compared to HyO Sham rats, HyO DJB rats did not alter TG liver content as well as, the expression of hepatic genes and protein involved with lipids metabolism. DJB operation normalized insulinemia and insulin resistance and restored β -cell secretion in the presence of 8.3 mM glucose independently of weight loss. In addition, HyO DJB rats presented a reduction in total islets and β -cell area (pancreas area percentage) and in islets cells proliferation (verified by the number of nucleus stained by Ki67 protein - a cellular marker for proliferation). *Conclusions:* Although DJB not affect liver lipids metabolism in HyO rats two months after surgery, the improvement on glucose homeostasis could be associated with modifications in islets morphology and proliferation.

Keywords: Duodenal-jejunal bypass; Hypothalamic obesity; β -cell morphology; Lipids.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	11
REVISÃO GERAL DE LITERATURA	14
Obesidade e doenças associadas	14
Metabolismo lipídico hepático e DHGNA	17
Homeostase glicêmica e diabetes	20
Cirurgia bariátrica e obesidade hipotalâmica	26
Modelos animais de obesidade hipotalâmica	30
REFERÊNCIAS	32
ARTIGO CIENTÍFICO	48
ANEXO A: Parecer do comitê de ética animal	81
ANEXO B: Normas da revista científica	83

LISTA DE ABREVIATURAS

ACC - acetil-CoA carboxilase	DMG - diabetes <i>Mellitus</i> gestacional
ACO - acil-CoA oxidase	DMN - núcleo dorsomedial
ACTH - hormônio adrenocorticotrófico	DNL - <i>De novo lipogenesis</i>
ADA - <i>American Diabetes Association</i>	EHNA - esteato-hepatite não-alcoólica
ADH - hormônio antidiurético	EM - eminência mediana
AG - ácidos graxos	FASN - ácido graxo sintetase
AGCL - ácidos graxos de cadeia longa	G1P - glicose-1-fosfato
AGL - ácidos graxos livres	G3P - gliceraldeído-3-fosfato
AGRP - proteínas relacionadas ao	G6P - glicose-6-fosfato
Agouti apoB - apolipoproteína B	GCK - glicoquinase
Akt/PKB - proteína quinase B	GH - hormônio do crescimento
AMPc - adenosina monofosfato cíclico	GHRH - hormônio liberador do
ARC - núcleo arqueado	hormônio do crescimento
ATP - adenosina trifosfato	GIP - polipeptídeo inibidor gástrico
BGAL - banda gástrica ajustável	GK - <i>Goto-Kakizaki</i>
laparoscópica	Gli - glicose
Ca²⁺ - íons cálcio	GLP-1 - peptídeo semelhante ao
CNA - comprimento naso-anal	glucagon tipo 1
COL - colesterol	GLUT2 - transportador de glicose tipo
CPT - carnitina palmitoil-transferase	2
CPT-1a - carnitina palmitoil-	GLUT4 - transportador de glicose tipo
transferase-1a	4
CPT-2 - carnitina palmitoil-transferase-	GV – gastrectomia vertical
2	HDL - lipoproteína de alta densidade
CREB - elemento de ligação da	HFD - <i>high-fat diet</i>
proteína de resposta ao cAMP	FCH - fator de crescimento do
DA - dopamina	hepatócito
DBP - derivação biliopancreática	IDF - <i>International Diabetes Federation</i>
DDJ - derivação duodeno jejunal	IGF-1 - fator de crescimento
DGYR - desvio gástrico em Y-de-Roux	semelhante à insulina
DHGNA - doença hepática gordurosa	IMC - índice de massa corporal
não alcóolica	IR - receptores de insulina
DJI - derivação jejunoileal	IRS-1 - substrato receptor de insulina-
DM - diabetes <i>Mellitus</i>	1
DM1 - diabetes <i>Mellitus</i> tipo 1	IRS-2 - substrato receptor de insulina-
DM2 - diabetes <i>Mellitus</i> tipo 2	2

IRSs - substratos receptores de insulina

K⁺ - íons potássio

K⁺-ATP - canais de potássio sensíveis a ATP

LAFEM - Laboratório de Fisiologia Endócrina e Metabolismo

LDL - lipoproteína de baixa densidade

LFD - *low-fat diet*

LH - hipotálamo lateral

LPK - piruvato quinase hepática

α-MSH - hormônio estimulador dos melanócitos

M3 - receptor muscarínico tipo 3

MSG - glutamato monossódico

MTTP - proteína de transferência de triglicerídeos microssomal

NADPH - fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

NPY - neuropeptídeo Y

NVM - núcleo ventromedial

OH - obesidade hipotalâmica

PC - piruvato carboxilase

PI3K - fosfatidilinositol-3-quinase

PIP₃ - fosfatidilinositol-3, 4, 5-trifosfato

PKA - proteína quinase A

PKC - proteína quinase C

PNAE - Programa Nacional de Alimentação Escolar

PNAN - Política Nacional de Alimentação e Nutrição

PO - pós operatório

PVN - núcleo paraventricular

RI - resistência à insulina

SBCBM - Sociedade Brasileira De Cirurgia Bariátrica

SBD - Sociedade Brasileira De Diabetes

SCD-1 - esteroil-CoA desaturase-1

SNA - sistema nervoso autonômico

SNC - sistema nervoso central

SNP - sistema nervoso parassimpático

SNS - sistema nervoso simpático

TCA - ciclo do ácido tricarboxílico

TG - triglicerídeos

TSH - hormônio estimulante da tireoide

VLDL - lipoproteínas de densidade muito baixa

VMH - hipotálamo ventro medial

WHO - *World Health Organization*

INTRODUÇÃO GERAL

No cenário mundial, o sobrepeso e a obesidade surgiram como consequência das modificações socioculturais e econômicas, ocorridas a partir do fim da Segunda Guerra Mundial. Observaram-se mudanças no consumo alimentar com aumento de calorias ingeridas assim como, redução na prática de atividades físicas (MENDONÇA; ANJOS, 2004). A diminuição da necessidade do esforço físico no trabalho, alterações nas opções de atividades de lazer, uso crescente de equipamentos eletrônicos, dentre outros aspectos, contribuíram para a redução da frequência e da intensidade de atividades físicas no dia-a-dia, com a adoção de estilos de vida sedentários (ABREU; CARDOSO, 2008). Por outro lado, o crescimento e a expansão do capitalismo trouxeram a criação de novos mercados, bem como o aumento na produtividade industrial (MENDONÇA; ANJOS, 2004). Além disso, a partir da década de 1980, o incremento da produção industrial e a diversificação da produção e do consumo levaram ao surgimento de alimentos mais especializados e destinados a segmentos específicos da população. Assim, o aumento da prevalência de sobrepeso e obesidade no Brasil se deve a diferentes fatores socioculturais que alteraram o padrão alimentar, tais como: migração interna, alimentação fora de casa, aumento da oferta de refeições rápidas e aumento da utilização de alimentos industrializados (SANTOS; ENUMO, 2010).

A obesidade pode ser caracterizada como acúmulo de gordura corporal, generalizada ou localizada, que acarreta prejuízos à saúde de um indivíduo (LUZ; ENCARNAÇÃO, 2008). Algumas desordens metabólicas que incluem intolerância à glicose (Gli), resistência à insulina (RI), hipertensão arterial, dislipidemia, doença hepática gordurosa não-alcóolica (DHGNA) e diabetes *Mellitus* tipo 2 (DM2) estão associadas à obesidade (SOWERS, 1998).

Fatores genéticos, metabólicos, endócrinos, ambientais, neurais entre outros, estão relacionados com a gênese da obesidade (MOLINATTI; LIMONE, 1992). Com

relação aos fatores neurais sabe-se que, alterações no hipotálamo, região do sistema nervoso central (SNC), que exerce um papel chave na homeostase energética e no controle do peso corporal (MULLER et al., 2001), podem levar a um tipo mais raro desta doença, conhecido como obesidade hipotalâmica (OH). Pacientes com OH apresentam deficiência na secreção de um ou mais hormônios hipofisários (KARAVITAKI et al., 2006; MULLER, 2008), desequilíbrio nos neurotransmissores orexígenos e anorexígenos hipotalâmicos (LEE; KORNER, 2009), acúmulo excessivo de gordura, hiperfagia, hiperleptinemia, redução do tônus simpático e aumento do parassimpático (HOCHBERG; HOCHBERG, 2010). A atividade desregulada do sistema nervoso parassimpático (SNP), na OH, envolve um aumento na estimulação vagal das células- β , levando a hipersecreção de insulina (LUSTIG, 2008; LUSTIG, 2011).

Farmacoterapias tradicionais e alterações no estilo de vida, como dietas e aumento da atividade física, não são efetivas para o tratamento da OH (HOCHBERG; HOCHBERG, 2010; LEE; KORNER, 2009). A cirurgia bariátrica é frequentemente utilizada para tratar pacientes com obesidade exógena severa ou obesidade mórbida (HOCHBERG; HOCHBERG, 2010) e pode ser uma alternativa para pacientes com OH (BINGHAM et al., 2012; MULLER et al., 2007; INGE et al., 2007; SCHULTES et al., 2009). Porém, existem poucos estudos na literatura demonstrando o efeito das cirurgias bariátricas neste tipo de obesidade, e há uma discussão acerca da eficácia das mesmas na OH (MULLER et al., 2007; WEISMANN et al., 2013; BRETAULT et al. 2013).

Com base no tipo de procedimento cirúrgico, as cirurgias bariátricas podem ser dividida em três categorias: restritivas, disabsortivas ou mistas. A derivação duodeno-jejunal (DDJ) é um tipo de procedimento bariátrico disabsortivo, que tem por objetivo desviar parte do intestino proximal a fim de diminuir a absorção dos alimentos (RUNKEL et al., 2011). Estudos demonstram que a DDJ realizada em ratos diabéticos não-obesos e obesos pré-diabéticos, melhora a homeostase glicêmica e alguns aspectos da homeostase lipídica (RUBINO et al., 2004; RUBINO et al. 2006; ARAUJO et al., 2012; EBERTZ et al., 2014, KASHIKARA et al., 2014; HAN, et al., 2014), porém os mecanismos ainda não foram elucidados.

Nosso grupo de pesquisa vem realizando estudos com o objetivo de elucidar os efeitos da DDJ sobre o metabolismo lipídico e glicêmico na OH. Para mimetizar a OH em humanos, utilizamos o modelo de obesidade animal induzido por glutamato

monossódico (MSG). Para isso, o MSG é administrado aos roedores no período neonatal, através de injeções subcutâneas, o que provoca lesões químicas principalmente no núcleo arqueado (ARC) e na eminência mediana (EM) do hipotálamo, levando à obesidade, na vida adulta (OLNEY; SHARPE, 1969). Esses roedores são caracterizados por apresentarem excessivo acúmulo de gordura (SOUZA et al., 2001), redução na concentração do hormônio do crescimento (GH), normofagia (MAITER et al., 1991), normoglicemia, intolerância à Gli, hiperinsulinemia (LUCINEI BALBO et al., 2000; BALBO et al., 2007), RI (BALBO et al., 2007), hiperleptinemia (DAWSON et al., 1997), dislipidemia (NARDELLI et al., 2010) e alterações no sistema nervoso autonômico (SNA) (NEMEROFF et al., 1978; TAKASAKI, 1978; OLNEY, 1969; OLNEY; SHARPE, 1969).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que ratos com OH induzido pelo MSG e submetidos ao procedimento cirúrgico de DDJ, apresentaram melhora na insulinemia, secreção de insulina estimulada pela Gli e na resistência periférica à insulina no fígado. Com relação ao metabolismo lipídico foi observado que a cirurgia melhorou a concentração de triglicerídeos (TG) plasmáticos sem alteração no conteúdo hepático deste lipídio (BONFLEUR et al. 2014). Desta forma, propomos o presente trabalho para responder os seguintes questionamentos: a melhora na RI, observada dois meses após realização da DDJ, pode estar influenciando a expressão gênica e proteica de enzimas envolvidas com a homeostase lipídica no fígado? Será que a melhora na homeostase glicêmica, observada dois meses após o procedimento cirúrgico de DDJ em ratos com OH, pode ser decorrente de alterações na morfologia das ilhotas pancreáticas (hipertrofia e/ou hiperplasia)?

REVISÃO GERAL DE LITERATURA

Obesidade e doenças associadas

Na pré-história a luta árdua para conseguir alimentos, a maior exposição ao frio e a necessidade de movimentação constante para encontrar condições ambientais que permitissem a sobrevivência em situações infinitamente menos confortáveis que as atuais, exigiam de nossos antepassados uma grande capacidade de estocar energia e de obter proteção térmica. É natural que houvesse em seu organismo mecanismos (genes para promover adipogênese, processos enzimáticos, etc.) que facilitassem a obtenção desta reserva e desta proteção térmica - e o resultado final era a produção constante de gordura, que também era rapidamente metabolizada para prover as grandes queimas calóricas diárias. Esta capacidade de armazenar gordura, essencial para nossos antepassados, tornou-se prejudicial com os padrões de vida atuais, podendo-se afirmar que obesidade é uma doença resultante do conflito entre genes antigos e vida moderna (HALPERN, 1999).

Atualmente a obesidade vem alcançando proporções alarmantes, atingindo indivíduos de todas as idades tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento (BRASIL, 2011). De acordo com a *World Health Organization* (WHO), em 2008, 35% dos adultos com 20 anos ou mais apresentavam sobrepeso e 11% estavam obesos em todo o mundo. Já no Brasil, nesse mesmo período, a porcentagem de pessoas que eram alvo do sobrepeso e obesidade girava em torno de 39% (TARASTCHUK et al., 2008). Já em 2013, 17,5% da população brasileira apresentavam obesidade e 50,8% estavam acima do peso (BRASIL, 2013). Dos indivíduos obesos mais de 200 milhões são homens e quase 300 milhões são mulheres (WHO, 2013). Além disso, cerca de 2,8 milhões de pessoas morrem a cada ano como resultado das comorbidades relacionadas a condição obesa ou excesso de peso (WHO, 2013). Dentre as doenças associadas à obesidade destacam-se: asma, problemas com sono (GUH et al., 2009); hipertensão arterial; dislipidemia; acidentes vasculares cerebrais (HALPERN, 1999); diversos tipos de câncer (BERGSTRÖM et al., 2001); esteatose hepática (STEMMER et al., 2012);

doenças vasculares (MONTEIRO; ANGELIS, 2007) e DM2 (HOSSAIN; KAWAR; EL NAHAS, 2007).

O aumento exacerbado na incidência do sobrepeso e da obesidade tem causado grandes preocupações as entidades governamentais devido ao elevado custo que esta doença e suas comorbidades geram aos cofres públicos (HALPERN, 1999). Desta forma, compreendendo-se que a obesidade é um problema de saúde pública e por isso requer políticas públicas voltadas a esta demanda, “A Estratégia Global em Alimentação, Atividade Física e Saúde”, aprovada em 2004 pela Assembleia Mundial da Saúde, com o firme apoio do governo brasileiro, chama atenção para a relação da obesidade com a incidência de várias doenças crônicas, com a expectativa de vida da população e com os custos dos serviços de saúde. O enfrentamento do problema pelo governo nacional requer políticas públicas e ações intersetoriais, que vão além de informar e educar os indivíduos. Tais políticas devem, essencialmente, propiciar um ambiente que estimule, apoie e proteja padrões saudáveis de alimentação e atividade física. Desta forma, a Política Nacional de Alimentação e Nutrição (PNAN, portaria n.º 710/1999), surgiu para formular os requisitos básicos para a promoção e a proteção à saúde, atestando o compromisso do Ministério da Saúde em controlar os males relacionados à alimentação e nutrição já configurados no Brasil (BRASIL, 1999 Apud REIS; VASCONCELOS; BARROS, 2011). No âmbito intersetorial, destaca-se a adoção de políticas de segurança alimentar e nutricional, bem como a integração do Programa Nacional de Alimentação Escolar (PNAE) com a produção local de alimentos e a agricultura familiar, favorecendo a oferta de frutas e hortaliças nas escolas e comunidades (VIANA; FAUSTO; LIMA, 2003).

A causa fundamental da obesidade e do excesso de peso é um desequilíbrio energético entre as calorias consumidas e as calorias gastas (WHO, 2013). Esse desequilíbrio resulta de uma combinação de fatores que podem ser genéticos, endócrinos, metabólicos, ambientais, neurais, entre outros (HETHERINGTON; RANSON, 1940). O SNC, através do hipotálamo, desempenha um papel de extrema importância nos mecanismos que controlam o apetite e o peso corporal (HETHERINGTON; RANSON, 1940). Várias áreas hipotalâmicas, tais como o hipotálamo ventro medial (VMH), hipotálamo lateral (LH), ARC, núcleo paraventricular (PVN) e núcleo dorsomedial (DMN) participam desta regulação (DOLNIKOFF et al., 1988). Moléculas sinalizadoras localizadas em neurônios

hipotalâmicos bem como, provenientes da periferia, também participam do balanço energético. Dentre estas moléculas encontramos o neuropeptídeo Y (NPY), o hormônio estimulador dos melanócitos (α -MSH), proteínas relacionadas ao Agouti (AGRP), galanina, insulina, leptina, grelina etc (KORNER, 2003). Desta forma, lesões nestas áreas hipotalâmicas podem provocar alterações no controle do peso corporal, levando à obesidade.

Tumores na região do hipotálamo (craniofaringioma), doenças inflamatórias, ferimentos na cabeça, radioterapia cranial, aneurisma e síndromes genéticas (*Prader-Willi* e *Bardet-Biedl*) podem levar a um tipo de obesidade denominada de OH (HOCHBERG; HOCHBERG, 2010). O conceito de OH surgiu a partir da virada do século 20, onde dois casos de OH foram reportados, um deles por Babinski e outro por Frohlich (HOCHBERG; HOCHBERG, 2010). Isto levou a meio século de trabalho de identificação básica e clínica identificando o VMH como sendo uma região crítica, e formulando-se a hipótese que a hiperfagia resultante de problemas hipotalâmicos pode levar a obesidade (SMITH, 1927; HETHERINGTON; RANSON, 1940). Imediatamente após lesão hipotalâmica, pacientes podem desenvolver hiperfagia voraz difícil de ser controlada. Eles consomem alimentos em quantidades acima de suas necessidades calóricas e exibem comportamentos de busca de alimentos incomuns, incluindo forrageamento de comida, roubo de comida, e até mesmo roubo de dinheiro para comprar comida (BRAY; GALLAGHER, 1975; SKORZEWSKA, et al., 1989). Pacientes podem ser considerados portadores desse tipo de obesidade se os seguintes critérios forem satisfeitos: evidência de um processo patológico de lesão do hipotálamo com obesidade que se desenvolve subsequentemente ou em associação à referida lesão (BRAY; GALLAGHER, 1975).

A OH tem efeitos adversos significativos sobre a morbidade e mortalidade (LEE; KORNER, 2009). Pacientes com OH apresentam deficiência na secreção de um ou mais hormônios hipofisários, incluindo redução do GH, gonadotrofinas, hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), hormônio estimulante da tireoide (TSH) e hormônio antidiurético (ADH) (MULLER, 2008; KARAVITAKI et al., 2006). Estes indivíduos apresentam hiperfagia (LEE; KORNER, 2009) seguida de acúmulo excessivo de gordura, além de redução do tônus simpático e aumento do parassimpático (HOCHBERG; HOCHBERG, 2010). A atividade desregulada do SNP na OH envolve aumento na estimulação vagal das células- β , levando a hipersecreção de insulina (BRAY; INOUE; NISHIZAWA, 1981; LUSTIG, 2001). A

hiperinsulinemia tem sido aceita como um dos principais fatores relacionados à OH, pois aumenta a lipogênese no fígado e no tecido adiposo e reduz a lipólise, além de aumentar a atividade da lipase lipoproteica, acelerando a deposição, endógena e exógena, de lipídios no tecido adiposo (BRAY; INOUE; NISHIZAWA, 1981). Hiperleptinemia, baixas concentrações de grelina e RI podem ser ainda observados em pacientes com OH (INGE et al., 2007).

A RI, é caracterizada por uma resposta anormal dos tecidos periféricos à ação deste hormônio circulante (VASQUES et al., 2009). Pode ser estabelecida no estado obeso devido a fatores que são liberados pelo tecido adiposo (ácidos graxos livres-AGL, fator de necrose tumoral- α , resistina entre outros) e que podem inibir a sinalização normal da insulina (WHITE, 2003), levando a um estado patológico que está associado a desordens do metabolismo glicêmico e lipídico (STUMVOLL; GOLDSTEIN; VAN HAEFTEN, 2005). Em relação ao metabolismo lipídico, de forma direta ou indireta, a RI contribui para o aparecimento de três principais anormalidades: hipertrigliceridemia, altas concentrações de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e baixas concentrações de lipoproteínas de alta densidade (HDL) (Sociedade Brasileira de Cardiologia - SBC, 2007). Além disso, na RI associada à obesidade, além dos TG serem armazenados no tecido adiposo, ele pode ser depositado em outros órgãos, como por exemplo, o fígado (GUILHERME et al., 2008). Quando isso acontece leva ao desenvolvimento da DHGNA (ÂNGULO, 2002).

Metabolismo lipídico hepático e DHGNA

O fígado é considerado um órgão chave no controle do metabolismo lipídico, atua no direcionamento das gorduras com base nas condições hormonais e metabólicas dos indivíduos, fornecendo para os tecidos periféricos o substrato energético necessário (SPASSIANI; KUK, 2008). Dessa forma, as gorduras podem ser armazenadas (GIBBONS; ISLAM; PEASE, 2000), oxidadas para a produção de adenosina trifosfato (ATP) (NGUYEN et al., 2008) ou encaminhadas para os tecidos periféricos pelas lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), podendo ser utilizadas pelo músculo esquelético e armazenadas pelo tecido adiposo (DURSTINE et al., 2002).

Após a digestão dos alimentos, os metabólitos chegam até o fígado através do sistema porta-hepático. A Gli é captada pelos hepatócitos através dos

transportadores de Gli tipo 2 (GLUT2), e fosforilada pela enzima glicoquinase (GCK) gerando Gli-6-fosfato (G6P). A G6P pode ser convertida em Gli-1-fosfato (G1P) que é adicionada às cadeias de glicogênio através da enzima glicogênio sintase (RUI, 2014). Uma vez que a quantidade de armazenamento de glicogênio é alcançada, o excesso de Gli é redirecionado para síntese de ácidos graxos (AG), em um processo denominado de lipogênese *de novo* hepática.

Na lipogênese *de novo*, a Gli entra no fluxo glicolítico gerando gliceraldeído-3-fosfato (G3P), fosfoenolpiruvato e piruvato. A piruvato quinase hepática (LPK) é considerada uma enzima glicolítica chave nesse processo (YAMASHITA et al., 2001). O piruvato é oxidado e gera acetil-CoA o qual entra no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) na mitocôndria gerando citrato. A alta concentração de ATP e fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADPH) no estado alimentado inibe a progressão do citrato no TCA, promovendo acúmulo intramitocondrial desse metabólito. O citrato é então transportado para o citoplasma onde é convertido a Acetil-CoA. A enzima acetil-CoA carboxilase (ACC) transforma acetil-CoA em malonil-CoA, que por sua vez é transformado em ácido palmítico, através da enzima ácido graxo sintetase (FASN). O ácido palmítico pode ser desaturado pela enzima estearoil-CoA desaturase-1 (SCD-1), formando AG insaturados (FABBRINI; SULLIVAN; KLEIN, 2010; BECHMANN et al., 2012; KAWANO; COHEN, 2013). O ácido palmítico e os AG insaturados são esterificados com o G3P para formação de TG. Em condições fisiológicas normais os TG não são armazenados no fígado em grandes quantidades, são transportados para o tecido adiposo.

Os TG hepáticos provenientes da síntese *de novo* ou da dieta, são transportados ao tecido adiposo pelas VLDL. Essas partículas são ricas em uma apoproteína denominada de apolipoproteína B (apoB) (HUSSAIN; NIJSTAD; FRANCESCHINI, 2011). No retículo endoplasmático a proteína de transferência de TG microsomal (MTTP) realiza a transferência de fosfolípidios, TG, colesterol (COL) livre e ésteres de COL para a apo B dando origem a partícula de VLDL (SPARKS; SPARKS, 2008). A MTTP pode ser regulada por hormônios e macronutrientes, ocorrendo em níveis transcricionais, pós-transcricionais e pós-translacionais (HUSSAIN; NIJSTAD; FRANCESCHINI, 2011).

O fígado utiliza ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) para manutenção das quantidades de ATP necessárias (MURTHY; PANDE, 1994). A beta-oxidação é a via de oxidação de AGCL mais importante no fígado, podendo ocorrer via mitocondrial

ou peroxissomal (LIMA et al., 2005). Os mecanismos de oxidação em ambas as estruturas são semelhantes, diferindo apenas no tipo de AG que será oxidado pela mitocôndria (AG derivados dieta) ou pelo peroxissomo (conjunto diferente de AG e seus derivados). Na beta-oxidação peroxissômica a enzima acil-CoA oxidase (ACO) catalisa os primeiros e determinantes passos desse processo (WANDERS, 2004). Já na oxidação mitocondrial, para que os AG permeiem a membrana da mitocôndria se faz necessário à ativação de um complexo enzimático denominado de carnitina palmitoil-transferase (CPT). O complexo CPT é formado por duas proteínas (CPT-1a e CPT-2) e de maneira geral conduz os AGCL pelas membranas da mitocôndria a fim de serem encaminhados à beta-oxidação (LIRA et al., 2010). A proteína CPT-1a se localiza na membrana externa da mitocôndria e é uma proteína integral de membrana responsável pela conversão de acil-CoA em acil-carnitina. Já a CPT-2 é uma proteína periférica presente no lado interno da mitocôndria e realiza o processo inverso ao da CPT-1a (KERNER; HOPPEL, 2000). Dessa forma, os AGCL conseguem ser transferidos de forma efetiva para a matriz mitocondrial para sofrerem o processo de beta-oxidação. Durante a formação de AG através da ação da ACC ocorre à geração de um produto denominado de malonil-CoA que pode inibir o sítio de ligação da CPT-1a impedindo a beta-oxidação (WITTERS et al., 1988).

No estado de RI podem ocorrer alterações nos processos descritos acima, levando ao acúmulo de TG no citoplasma dos hepatócitos. De forma geral, a deposição de TG no fígado pode ocorrer devido as seguintes situações: 1) aumento da absorção de AG da circulação, que são provenientes de uma dieta altamente calórica ou da lipólise do tecido adiposo; 2) síntese *de novo* de AG pela ativação da via lipogênica; 3) diminuição da beta-oxidação de AG e 4) diminuição da secreção hepática de VLDL (BERLANGA et al., 2014).

Esse excesso de gordura hepática em indivíduos que não apresentam histórico de consumo abusivo de álcool caracteriza a DHGNA (ÂNGULO, 2002). A DHGNA inclui desde uma simples esteatose hepática, onde o indivíduo apresenta acúmulo de gordura, até uma esteato-hepatite não alcoólica (EHNA), onde além do acúmulo citado anteriormente há a presença de inflamação e degeneração hepatocelular, muitas vezes podendo ser acompanhada do aparecimento de fibrose, podendo evoluir para a cirrose hepática e carcinoma hepatocelular (COHEN; HORTON; HOBBS, 2011). A patogênese da DHGNA/EHNA é explicada pela

hipótese de *two-hit* onde em um primeiro momento (primeiro *hit*) há o acúmulo de gordura nos hepatócitos devido a alguns mecanismos que levam a maior importação ou síntese de AG quando comparado com a exportação ou degradação dos mesmos (ANSTEE; GOLDIN, 2006). O segundo *hit* é caracterizado pela presença de inflamação e fibrose que pode ocorrer no fígado sensibilizado pela esteatose por diversos estímulos que envolvem a ação de citocinas pró-inflamatórias, estresse oxidativo, e outros mecanismos relacionados com o excesso de lipídios nesse órgão (DAY; JAMES, 2008).

Homeostase glicêmica e diabetes

A Gli é um substrato metabólico essencial de todas as células de mamíferos, é transportada através da parede intestinal para a veia porta hepática e, em seguida, para as células do fígado e de outros tecidos. Já nos tecidos, a Gli é convertida a AG, aminoácidos, e glicogênio, ou é oxidada através de vias catabólicas dentro das células. A maior parte dos tecidos e órgãos, tais como o cérebro, necessita de Gli constantemente como fonte de energia. Em concentrações sanguíneas baixas de Gli, podem ocorrer convulsões, perda de consciência e morte. Por outro lado, elevações duradouras nessas concentrações podem resultar em cegueira, insuficiência renal, doença vascular, e neuropatia. As concentrações de Gli no sangue devem ser mantidas dentro de limites estreitos. A homeostase glicêmica ocorre através de uma fina regulação hormonal que promove a captação de Gli periférica, produção hepática de Gli e captação de Gli durante a ingestão de carboidratos (SZABLEWSKI, 2011). Os fatores mais importantes que influenciam o fluxo imediato de Gli são os hormônios insulina e glucagon, as catecolaminas, a atividade do sistema nervoso simpático (SNS), bem como a concentração de AGL. Em um período mais prolongado (horas/dias), outros hormônios (cortisol e GH), fatores nutricionais (composição da dieta), exercício e aptidão física, juntamente com mudanças na sensibilidade a hormônios, também tornam-se fatores importantes. O cortisol, o GH e as catecolaminas afetam a homeostase glicêmica pois alteram a sensibilidade à insulina, e a disponibilidade por substratos alternativos de Gli (SHRAYYEF; GERICH, 2010).

O hormônio insulina secretado pelas células- β do pâncreas, facilita a absorção da Gli principalmente no músculo e tecido adiposo (CERF, 2013), nos estados pós-prandiais. As células- β pancreáticas formam a parte endócrina do

pâncreas, juntamente com as células alfa (α), responsáveis pela secreção de glucagon, e as células delta (δ), secretoras de somatostatina. Todas as células pancreáticas endócrinas juntas dão origem às ilhotas pancreáticas. Existem entre um e dois milhões de ilhotas no pâncreas humano, e as células- β constituem aproximadamente 60% de todas as células da ilhota. O pâncreas é considerado uma glândula mista, também formada por uma parte exócrina: os ácinos pancreáticos. Estes são responsáveis pelas secreções digestivas, enquanto que as ilhotas secretam, principalmente, os hormônios insulina e glucagon (GUYTON; HALL, 2011).

A secreção de insulina depende de uma fina regulação na maquinaria secretória das células- β , sendo ajustada, continuamente, de acordo com as flutuações das concentrações de nutrientes circulantes, em especial, a Gli (BOSCHERO, 1996). A Gli é transportada para o líquido intracelular da célula β pelo transportador de Gli, GLUT2; em sequência é fosforilada à Gli-6-fosfato através da ação da enzima GCK e metabolizada, elevando a concentração de ATP que age fechando os canais de potássio sensíveis a ATP (K^+ -ATP). A redução no efluxo de íons potássio (K^+), recorrente do fechamento dos canais de K^+ -ATP, tem como consequência a despolarização da membrana e abertura dos canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem. O influxo de íons cálcio (Ca^{2+}) ativa a maquinaria de exocitose, resultando na secreção dos grânulos de insulina (MATSCHINSKY, 1996). Além do aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} , a ativação da proteína quinase A e proteína quinase C pela metabolização da Gli, também culminam com a exocitose dos grânulos de insulina (NESHER et al., 2002; TENGHOLM; GYLFE, 2009). Hormônios, agentes farmacológicos e neurotransmissores, entre outros fatores, também modulam, direta ou indiretamente, a secreção da insulina (PÉNICAUD et al., 1996).

Uma vez secretada a insulina age em seus receptores de membrana específicos, denominados receptores de insulina (IR), os quais estão presentes principalmente no músculo, tecido adiposo e fígado. A ligação da insulina ao IR induz a autofosforilação do mesmo, ativando uma atividade tirosina quinase intrínseca, o que fosforila os substratos receptores de insulina (IRSs) (KAHN, 1998). Dentre esses IRSs, os mais importantes são o IRS-1 e IRS-2, pois se associam a proteínas que tem domínios SH2 e SH3, que reconhecem especificamente a fosfotirosina (HABER et al., 2001). Desse modo, os IRS-1 e 2 se ligam ao domínio

SH2 da enzima fosfatidilinositol 3-quinase (PI3-K), ativando-a (BACKER et al., 1992). A PI3-K é imprescindível para o transporte de Gli (CZECH; CORVERA, 1999). Sua fosforilação promove a ativação de serinas quinases, PKC e da proteína quinase B (Akt/PKB) (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002). A Akt interage com o fosfatidilinositol-3, 4, 5-trifosfato (PIP₃), um produto da fosforilação da PI3-K, e provoca o direcionamento do transportador de Gli tipo 4 (GLUT-4) para a membrana celular, participando diretamente no transporte de Gli dependente de insulina (ZECCHIN; CARVALHEIRA; SAAD, 2004).

A hiperglicemia resultante de defeitos na secreção e/ou ação da insulina levam ao desenvolvimento do diabetes *Mellitus* (DM) (*American Diabetes Association - ADA*, 2002). O DM é uma das disfunções relacionadas à obesidade que mais se destaca na sociedade. Estudos recentes apontam que em 2011 o número de pessoas que apresentavam algum tipo de diabetes em todo o mundo era de 366 milhões, com uma estimativa de esse número aumentar para 552 milhões em 2030. Em comparativo, no Brasil, a população nacional que apresentava algum tipo de diabetes era de 12,4 milhões em 2011, com expectativa de 19,6 milhões em 2030 (WHITING et al., 2011).

De acordo com a *International Diabetes Federation* (IDF) (2013), existem três tipos principais de diabetes: o DM tipo 1 (DM1), o DM gestacional (DMG) e o DM2. O DM1 é caracterizado pela destruição das células- β do pâncreas desencadeada por um processo auto-imune (IMAGAWA et al., 2000). Os sintomas geralmente aparecem rapidamente e de forma abrupta, e tem como consequência a deficiência total da secreção de insulina (GROSS et al., 2002). O DMG é a manifestação de quadros sintomáticos de diabetes durante a gravidez (HOSEINI; HANTOUSHZADEH; SHOAR, 2011). Mulheres que desenvolveram o DMG tem maior chance de desencadear outro tipo de DM durante os próximos anos de vida (ODAR; WANDABWA; KIONDO, 2004). O DM2 é o mais comum entre todos os tipos de diabetes existente (GROSS et al., 2002) e representa de 90 a 95% das pessoas com diabetes em todo o mundo (ADA, 2006). Do total de portadores do DM2, cerca de 80% estão acima do peso ou são obesos (BRAY, 1990).

Antes do aparecimento do DM2, existe uma fase denominada de pré-diabetes (SUCUPIRA et al., 2000) onde os pacientes apresentam intolerância à Gli (MAZZINI et al., 2013). A melhor maneira de identificar o pré-diabetes é através da dosagem da glicemia. Sua definição laboratorial ocorre quando a taxa de glicemia de jejum

(mínimo de oito horas) encontra-se entre 100 e 125 mg/dL e/ou quando o valor da glicemia na segunda hora do teste de sobrecarga oral à Gli está entre 140 e 199 mg/dL (Sociedade Brasileira de Diabetes - SBD, 2009). A maioria dos pacientes, se não todos, apresentam inicialmente uma tolerância à Gli prejudicada, o que é caracterizada por uma fase intermédia na progressão para o DM2 (POLONSKY; STURIS; BELL, 1996). Quando realizadas alterações apropriadas no estilo de vida ou através de intervenções farmacológicas, esta progressão para o DM2 pode ser atrasada ou, até mesmo, impedida (KNOWLER et al., 2002; TUOMILEHTO et al., 2001). Além disso, se realizados estudos com indivíduos ainda na fase de pré-diabetes, observa-se uma redução de mais de 50% na taxa de novos casos de DM2 em um período de dois a cinco anos de acompanhamento (SBD, 2009).

Além de alterações na secreção de insulina observada na fase de pré diabetes, observa-se alterações na morfologia das ilhotas pancreáticas (PICK et al., 1998). Para compensar a RI o pâncreas de roedores bem como de seres humanos possui a capacidade de aumentar a massa de células- β e a secreção de insulina. De fato, a massa de células- β é dinâmica e capaz de se adaptar a condições fisiológicas e patológicas para manter a normoglicemia (MEZZA et al., 2014). A capacidade de proliferação das células- β em resposta a RI é tida como fator crítico para a homeostase glicêmica e para a prevenção da progressão do DM2 (BLANDINO-ROSANO et al., 2012). Num primeiro momento, fatores como a obesidade, aumento na ingestão calórica e diminuição na atividade física, podem estimular o aumento da massa de células- β , o que é caracterizada como uma fase de compensação, para manutenção da euglicemia nestes indivíduos. No entanto, um aumento substancial na demanda por insulina pode causar redução das células- β , através de toxicidade causada pela Gli e/ou por lipídios, ou pelo estado de inflamação crônica e aumento no estresse oxidativo, entre outros fatores. Este processo induz a uma fase de descompensação, com redução na massa de células- β e hiperglicemia. A fase de descompensação pode progredir para uma fase de aceleração, com perda severa na massa células- β ao longo do tempo, devido à redução cada vez mais acentuada destas células, associada com aumento de fibrose e amiloidose celulares (CHO et al., 2011). No DM2 tem sido reportado um decréscimo de 60% na massa de células- β , devido à grande demanda de secreção de insulina no estado de hiperglicemia persistente, que leva à exaustão destas células, causando a morte celular das mesmas (CERF, 2013).

O aumento na massa das células- β ocorre por aumento no tamanho da célula (hipertrofia) e/ou no número de células (hiperplasia) (CERF, 2013). Na hiperplasia e hipertrofia estão envolvidos processos de reposição da massa das células- β , que podem ocorrer na forma de proliferação (replicação das células) e neogênese (diferenciação a partir de células precursoras não β) (CERF, 2013). Fatores como o fator de crescimento do hepatócito (FCH), lactogênio placentário, insulina, fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), Gli e muitas outras moléculas têm sido relacionadas com o aumento da proliferação de células- β em ratos e camundongos, porém com efeitos limitados em humanos (KULKARNI et al., 2012). A proliferação das células- β pancreáticas, assim como em outros tipos celulares, é regulada por uma série de sinais extras e intracelulares que afetam a maquinaria do ciclo celular. Estudos demonstram que a hipertonia vagal em ratos VMH-lesados e em camundongos geneticamente obesos (ob/ob) estimula a proliferação das células- β pancreáticas (KIBA et al., 1996; EDVELL; LINDSTRÖM, 1998). Recentemente, Lubaczeuski et al. (2015), mostraram em seus estudos que animais obesos-MSG apresentam aumento no número de células- β em suas ilhotas.

Hormônios incretinas como o peptídeo semelhante ao glucagon-1 (GLP-1) e o polipeptídeo inibidor gástrico (GIP) também estão envolvidos com o controle da proliferação celular e sobrevivência das células- β pancreáticas (YABE; SEINO, 2011). O GLP-1 é liberado pelas células L do intestino delgado em resposta à ingestão alimentar (WILSON-PÉREZ et al., 2013), e potencializa a secreção de insulina dependente de Gli. Também suprime a secreção de glucagon (BAGGIO; DRUCKER, 2007) e, em roedores, aumenta a massa de células- β pela estimulação da neogênese e proliferação celular e inibição da apoptose (PERFETTI; HUI, 2004). Além disso, retarda o esvaziamento gástrico e promove saciedade precoce. O GLP1 exerce esse efeito pleiotrópico agindo em receptores específicos encontrado nas células- β pancreáticas e fibras vagais periféricas aferentes (BAGGIO; DRUCKER, 2007). Ele está entre os principais hormônios incretinas e é amplamente utilizado no tratamento de pacientes com DM2, justamente por ser eficaz na melhoria do efeito diabético (NAUCK et al., 1993). Os aspectos cinéticos envolvidos na cascata de reação durante a estimulação do GLP1, em células- β do pâncreas, ainda não foram claramente determinados. O que se sabe é que o GLP1 ativa adenilato ciclase (AC) através da ligação ao seu receptor de proteína G acoplado e aumenta a concentração de adenosina monofosfato cíclico (AMPc), dando início aos efeitos

insulínótropicos (TAKEDA et al., 2011). O GIP é secretado pelas células K do duodeno e jejuno proximal, em resposta à ingestão de alimentos ou Gli (VOLLMER et al., 2008). Foi demonstrado que o GIP tem ação anti-apoptótica em células- β do pâncreas, e esse efeito ocorre pela ativação das vias do elemento de ligação da proteína de resposta ao cAMP (CREB) e à Akt/PKB (YABE; SEINO, 2011). Recentemente, em estudo realizado com cultura de células- β (INS-1E), foi observado que a dopamina (DA) possui atividade antiproliferativa nestas células, mesmo na presença de GLP-1 e GIP, que são considerados agentes estimuladores de proliferação celular. Este efeito da DA pode ter ocorrido pois a síntese ativa de DNA foi aumentada em culturas INS-1E tratadas com as respectivas incretinas, em relação ao meio isolado, e a DA reduziu a incorporação de timidina tritiada induzida por incretina, para concentrações abaixo das observadas em culturas controle (MAFFEI et al., 2015).

Mecanismos de apoptose, necrose e autofagia podem levar à hipoplasia e hipotrofia, ocorrendo redução no número e/ou tamanho das células- β . Vários mecanismos têm sido relatados como responsáveis por aumentar a morte programada (apoptose) de células- β (CHO et al., 2011). Um dos mecanismos é a ativação do estresse oxidativo, como resultado do aumento na formação mitocondrial de espécies reativas de oxigênio (ROS), que ocorre devido ao metabolismo excessivo de Gli (ROBERTSON et al., 2003). Um segundo mecanismo está relacionado com sobrecarga do ER e a regulação positiva do ciclo do piruvato, que afeta o desempenho das mitocôndrias e a sensibilidade à Gli. Supernutrição e aumento no fornecimento de lipídeos induzem enzimas envolvidas na beta-oxidação, tal como a CPT-1, resultando em aumento na concentração de acetil-CoA, ativação alostérica da enzima piruvato carboxilase (PC) e desregulação do ciclo do piruvato. Isto leva a hipersecreção de insulina basal, acompanhada pela secreção de amilina, que em humanos pode formar fibrilas amilóides que se acumulam na superfície das células- β para induzir disfunção e morte apoptótica (MARTINEZ-MORENO; GARCACABALLERO, 2013).

A apoptose de células- β está aumentada em humanos obesos com intolerância à Gli ou diabetes, sendo que fatores genéticos tem um papel importante na susceptibilidade destas células à descompensação e progressão para o DM2 (STOEHR et al., 2000). Genes responsáveis pela obesidade e RI podem interagir com fatores ambientais (aumento da gordura e/ou ingestão calórica e diminuição da

atividade física), resultando no desenvolvimento de obesidade e RI. Estes fatores aumentam a demanda por insulina, que é secretada pelas células- β pancreáticas. Se as células- β são normais, o aumento na função e na massa, em resposta a esta demanda, leva a hiperinsulinemia compensatória, com consequente manutenção na tolerância a Gli. Por outro lado, células- β susceptíveis possuem um risco geneticamente determinado, e o aumento na demanda por secreção de insulina juntamente com um meio ambiente prejudicial, pode resultar na disfunção das células- β e diminuição da massa das mesmas, levando a diminuição na tolerância à Gli, seguida, em último momento, pelo desenvolvimento do DM2 (MARTINEZ-MORENO; GARCACABALLERO, 2013).

Cirurgia bariátrica e obesidade hipotalâmica

Na tentativa de promover perda de peso e melhorar as comorbidades associadas à obesidade, quatro estratégias podem ser utilizadas: 1) controle da ingestão calórica da dieta; 2) aumento do gasto energético, através da realização de exercícios físicos; 3) utilização de medicamentos controlados, ou a combinação destes três e 4) controle da absorção dos nutrientes nos diversos segmentos do trato gastrointestinal através de procedimentos cirúrgicos de redução do tamanho do estômago e/ou de desvio do trânsito alimentar. Este último, também denominado de cirurgia bariátrica, está classicamente indicada para indivíduos com índice de massa corporal (IMC) igual ou maior de 40 Kg/m² ou entre 35 e 40 Kg/m² com comorbidades relacionadas à obesidade, e pode ser realizada em indivíduos de 16 a 110 anos de idade (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIRURGIA BARIÁTRICA E METABÓLICA - SBCBM, 2011).

Os procedimentos cirúrgicos são comumente divididos em três categorias: restritivo, disabsortivo e misto (FANDIÑO et al., 2004). Procedimentos restritivos, como a banda gástrica ajustável laparoscópica (BGAL), visam reduzir o volume do estômago resultando em rápida saciedade e consumo de refeições menores. O curso natural que os nutrientes seguem não é alterado, de qualquer modo. Procedimento disabsortivos puros, incluindo a derivação jejunoileal (DJI), bem como a derivação biliopancreática (DBP), envolvem o desvio de uma ou mais porções do intestino (ORGAN et al., 1984). Um procedimento híbrido, que associa a restrição do estômago com o desvio de parte do intestino, conhecido como desvio gástrico em Y de Roux (DGYR), tornou-se o “*gold standard*” dentre as cirurgias bariátricas, sendo o

procedimento mais comumente realizado para perda de peso (KARRA; YOUSSEIF; BATTERHAM, 2010). Outro procedimento de cirurgia bariátrica experimental que vêm se destacando é a DDJ. Nessa cirurgia não há alterações restritivas no estômago, somente alterações na absorção de nutrientes visto que ocorre uma exclusão do duodeno e de parte inicial do jejuno (RUBINO; MARESCAUX, 2004; RUBINO et al., 2006; KINDEL et al., 2010).

Geloneze et al. (2009), relataram que pacientes diabéticos, não obesos, submetidos à DDJ, tiveram redução na glicemia de jejum sem alterar o peso corporal, vinte e quatro semanas após o procedimento cirúrgico. Rubino e Marescaux (2004) demonstraram em ratos diabéticos não obesos Goto-Kakizaki (GK) que a DDJ diminuiu a glicemia de jejum ainda na terceira semana de pós-cirúrgico, além de melhorar a sensibilidade à insulina e a tolerância à Gli, em vinte e em trinta e seis semanas após a cirurgia, respectivamente. A cirurgia de DDJ também se mostrou eficiente na melhoria da tolerância à Gli e na sensibilidade à insulina, duas semanas após a cirurgia, em ratos GK, alimentados tanto com *high-fat diet* (HFD) quanto com *low-fat diet* (LFD) no período de pós-operatório (PO). Esta melhora na tolerância à Gli foi ainda mais proeminente com o passar do tempo, sendo mais evidente na décima sexta semana após a DDJ (LIU et al., 2012). Pacheco et al. (2007), realizaram testes uma semana e um mês após a DDJ, em ratos GK, e verificaram que houve diminuição na glicemia de jejum e consequente melhora na tolerância à Gli em ambos os tempos. Resultados semelhantes foram observados por Luis et al. (2012), onde ratos GK submetidos à DDJ demonstraram melhora na tolerância a Gli ainda na primeira semana de pós-cirúrgico, sendo que as ilhotas destes animais aumentaram a secreção de insulina em concentrações de 16,7 mmol/L de Gli.

Camundongos C57BL/6, normais e diabéticos, submetidos à DDJ obtiveram redução da glicemia de jejum já na primeira semana de pós-cirúrgico e melhoraram a tolerância à Gli quatro semanas após a cirurgia (WOODS et al., 2011). Em estudo realizado com um modelo de roedor obeso e diabético, a cirurgia de DDJ melhorou o perfil glicêmico nestes animais a partir da segunda semana de pós-cirúrgico, ocorrendo diminuição nas concentrações de Gli sanguínea, melhora na tolerância a Gli e na sensibilidade à insulina, sem alteração no peso corporal. A partir da sexta semana houve diminuição da glicemia de jejum, sendo que na décima segunda semana estes animais apresentaram diminuição nas concentrações de leptina e

interleucina-6 (IL-6) séricos, além de aumento nas concentrações de adiponectina (HU et al., 2013). Um estudo recente demonstrou ainda que ratos *Wistar*, obesos e diabéticos, submetidos à DDJ melhoram a tolerância à Gli, dois, quatro, oito e doze semanas após realização da cirurgia, além de melhorar a sensibilidade à insulina já na segunda semana de PO (WUBULIKASIMU et al., 2014). Com relação a animais pré-diabéticos, Araujo et al. (2012), mostraram em seus estudos que ratos *Wistar* obesos por dieta de cafeteria, submetidos à DDJ, apresentaram melhora na tolerância à Gli uma semana após o procedimento cirúrgico e melhora na sensibilidade à insulina um mês após a cirurgia. Além disso, estes animais mostraram aumento na secreção de insulina estimulada por Gli, nas concentrações de 5,6; 11,1; 22,2 mM de Gli, um mês após a cirurgia.

Apesar de muitos achados comprovarem o efeito positivo da DDJ na melhora do perfil glicêmico em animais e humanos, ainda há estudos que dizem o contrário. Gavin et al. (2011), em estudo realizado com animais GK, demonstraram que a cirurgia de DDJ não melhorou a tolerância a Gli nos animais, bem como não melhorou as concentrações de Gli e insulina plasmática de jejum, duas semanas após realização do procedimento cirúrgico. Speck et al. (2011), também mostraram que a DDJ, realizada em animais GK, não melhorou a tolerância à Gli nas semanas um, três, cinco, dez e dezoito de PO, nem a RI na primeira e na décima oitava semana após a realização da cirurgia.

O efeito da DDJ sobre a morfologia de ilhotas pancreáticas também tem sido relatado, porém através de poucos estudos, e geralmente está associado à secreção do hormônio GLP-1 no período de PO (SPECK et al., 2011; WOODS et al., 2011). No entanto esse efeito, a curto e a longo prazo, não está bem estabelecido na literatura, podendo ocorrer de formas diferentes, de acordo com o tempo de PO e com o modelo estudado. Woods et al. (2011), demonstraram que a cirurgia de DDJ não modificou a massa de células- β e células- α , em camundongos C57BL/6 magros não diabéticos e obesos diabéticos, vinte e oito dias após realização da cirurgia. Estudos realizados em animais GK são controversos, mostrando que a DDJ pode aumentar a área de células- β um ano após realização da cirurgia (SPECK et al., 2011), bem como diminuir a área de células- β , na décima terceira semana de PO (INABNET et al., 2010).

Estudos também demonstram que a DDJ apresenta efeitos sobre o metabolismo lipídico. Em ratos *Wistar* obesos e pré-diabéticos a DDJ normalizou o

conteúdo de gordura hepático (ARAUJO et al., 2012; EBERTZ et al., 2014) e a concentração de TG sérico (EBERTZ et al., 2014), dois meses após o procedimento cirúrgico. Em ratos diabéticos não obesos, a DDJ promoveu redução da concentração de TG, COL total e AGL de jejum oito semanas após a cirurgia (KASHIHARA et al., 2015), bem como, diminuiu TG e AGL na 12^a semana de PO (HU et al., 2013). Em um período de oito semanas após realização da cirurgia, a DDJ melhorou o perfil lipídico em ratos diabéticos, o que foi caracterizado pela diminuição de TG sérico e hepático, bem como redução da expressão proteica de fatores de transcrição e enzimas reguladoras da lipogênese (HAN et al., 2014).

Existem poucos estudos na literatura demonstrando o efeito das cirurgias bariátricas na OH. Bretault et al. (2013), em uma meta análise, demonstraram que diferentes técnicas de cirurgia bariátrica (BGAL; gastrectomia vertical (GV); DGYR; BPD) utilizadas em pacientes com OH, após retirada de craniofaringioma, são realmente eficientes na redução de peso após 12 meses de PO, sendo a cirurgia de DGYR a mais efetiva neste parâmetro. Gatta et al. (2013) observaram perda de peso significativa em 3 pacientes submetidos à cirurgia bariátrica, sendo que dois deles apresentaram diminuição do IMC ainda doze meses após o procedimento cirúrgico de GV, sendo que o terceiro paciente, que foi submetido à DGYR, apresentou significativa perda de peso trinta e seis meses após ser submetido à cirurgia. Em estudo realizado com apenas um paciente, que desenvolveu OH após remover um craniofaringioma na infância, dados mostraram que dezoito meses após realização de *bypass* gástrico distal o paciente apresentou perda de peso significativa (52 Kg) e teve resolução do quadro diabético (SCHULTES et al., 2009). Inge et al. (2007) demonstraram em um paciente com OH, submetido à DGYR em associação à vagotomia, redução no peso corporal, diminuição de TG sérico e normalização da hiperinsulinemia de jejum, que se manteve durante os dois anos e meio de acompanhamento pós-cirúrgico.

Rottembourg et al. (2009), avaliaram o efeito da cirurgia em adolescentes portadores de OH de ambos os sexos. Pode-se verificar perda de peso e normalização do quadro de dislipidemia, após quatro anos na adolescente do sexo feminino submetida ao procedimento de DGYR. No jovem do sexo masculino, submetido ao desvio biliopancreático com bolsa duodenal, foi observado diminuição no IMC dois anos após a cirurgia. Além disso, em estudo de caso realizado com uma paciente do sexo feminino, observou-se redução do peso corporal nove meses após

a realização da DGYR que se manteve até os dezenove meses de PO (PAGE-WILSON et al., 2012).

Muller et al. (2007) descreveram em seus estudos que quatro pacientes, com história de craniofaringioma na infância e obesidade mórbida posterior, que foram submetidos à BGAL, tiveram IMC diminuído ou inalterado, durante um tempo de seguimento de um ano e meio a quatro anos e meio após a cirurgia. Por outro lado, Weismann et al. (2013), em estudo retrospectivo, demonstrou que pacientes submetidos à BGAL e gastrectomia vertical (*Sleeve* gástrico) não tiveram o IMC alterado após 5 e 2 anos de cirurgia, respectivamente. Porém, mostrou que 2 pacientes submetidos ao procedimento de DGYR obtiveram redução do peso corporal após três anos de realização do procedimento cirúrgico.

Modelos animais de obesidade hipotalâmica

Modelos animais são utilizados com a finalidade de mimetizar a OH em humanos, e dentre entre eles podemos citar os animais VMH-lesados e os animais com obesidade induzida por MSG. Neste primeiro modelo, ratos e camundongos são submetidos a lesões eletrolíticas em regiões hipotalâmicas, mais propriamente no VMH (BRAY; YORK, 1979). Sabendo-se que o hipotálamo é o principal centro regulador do apetite e do peso (HETHERINGTON; RANSON, 1940), e que o VMH é considerado o centro da saciedade (RAO, 2012), tem-se que lesões nestes locais específicos levam a uma desordem no SNC, desenvolvendo-se um quadro de obesidade.

O tratamento neonatal com MSG provoca lesões químicas em regiões hipotalâmicas, promovendo a destruição de cerca de 90% das células nervosas no SNC, especialmente no ARC (NEMEROFF et al., 1978; TAKASAKI, 1978) e na EM do hipotálamo (OLNEY; SHARPE, 1969). O MSG é administrado através de injeções subcutâneas na prole recém-nascida, que induzem necrose aguda em várias regiões do cérebro em desenvolvimento, incluindo o hipotálamo (OLNEY, 1969). Animais MSG são caracterizados por apresentarem redução da secreção do hormônio liberador do hormônio do crescimento (GHRH) (BLOCH et al., 1984; SASAKI; KAWAI; OHTA, 1994) e conseqüente redução da concentração de GH circulante (MAITER et al., 1991), além de redução do peso, da massa muscular e da maioria dos órgãos (HAMAOKA; KUSUNOKI, 1986), bem como, redução no comprimento naso-anal (CNA) e desenvolvimento impróprio do esqueleto (DAWSON, 1983;

IWASE et al., 2000). Ratos obesos-MSG apresentam diminuição na concentração de NPY em várias áreas hipotalâmicas (MORRIS et al., 1998) e, em contrapartida, uma alta concentração de leptina circulante (DAWSON et al., 1997).

A ineficiência na mobilização de gordura nesses animais contribui para a obesidade (SOUZA et al., 2001) que se desenvolve apresentando normo ou hipofagia (HIRATA et al., 1997). Além disso, são caracterizados por apresentarem intolerância à Gli, hiperinsulinemia e RI (BALBO et al., 2007), entretanto, estes animais são considerados pré-diabéticos, visto que são normoglicêmicos frente à hiperinsulinemia (LUCINEI BALBO et al., 2000). As ilhotas pancreáticas nestes animais secretam altos níveis de insulina em resposta à Gli (LUCINEI BALBO et al., 2000), e apresentam uma diminuição da quantidade de receptores muscarínicos do tipo 3 (M3), e da expressão da proteína quinase C alfa e da proteína quinase A alfa. Sendo assim, uma vez que estes receptores e quinases são cruciais para a preservação da massa das ilhotas, sugere-se que ilhotas de ratos MSG podem desenvolver disfunção em suas células- β , além de falhas durante a manutenção do tecido do pâncreas endócrino, podendo levar ao desenvolvimento do diabetes (RIBEIRO et al., 2013). Alterações no SNA, com redução do tônus simpático e aumento do parassimpático, também tem um papel importante na instalação da obesidade neste modelo. Áreas cerebrais de ratos obesos-MSG, especificamente o hipotálamo tem maior atividade colinérgica (BONFLEUR et al., 2000).

Foi demonstrado recentemente que a cirurgia de DDJ realizada no modelo animal de OH melhora a insulinemia, a secreção de insulina estimulada pela Gli e a resistência periférica à insulina no fígado, além de melhorar o perfil lipídico com normalização de TG e COL total de jejum dois meses após o procedimento cirúrgico (BONFLEUR et al. 2015).

REFERÊNCIAS

- ABREU, P. R.; CARDOSO, L. R. D. Multideterminação do comportamento alimentar em humanos: um estudo de caso. **Psicologia: Teoria e Pesquisa**, v. 24, n. 3, p. 355-360, 2008.
- ADA, American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, v. 29, s/n, p. S43-S48, 2006. Suplemento 1.
- ADA, American Diabetes Association. The prevention or delay of type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 25, n. 4, p. 742-749, 2002.
- ÂNGULO, P. Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 346, n. 16, p. 1221-1231, 2002.
- ANSTEE, Q. M.; GOLDIN, R. D. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 87, n. 1, p. 1-16, 2006.
- ARAUJO, A. C. et al. Duodenal-jejunal bypass surgery enhances glucose tolerance and beta-cell function in Western diet obese rats. **Obesity Surgery**, v. 22, n. 5, p. 819-26, 2012.
- BACKER, J. M. et al. Phosphatidylinositol 3'-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. **The EMBO Journal**, v. 11, n. 9, p. 3469-3479, 1992.
- BAGGIO, L. L.; DRUCKER, D. J. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. **Gastroenterology**, v. 132, n. 6, p. 2131-2157, 2007.
- BALBO, S. L. et al. Fat storage is partially dependent on vagal activity and insulin secretion of hypothalamic obese rat. **Endocrine**, v. 31, n. 2, p. 142-8, 2007.
- BECHMANN, L. P. et al. The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. **Journal of Hepatology**, v. 56, n. 4, p. 952-964, 2012.

BERGSTRÖM, A. et al. Overweight as an avoidable cause of cancer in Europe. **International Journal of Cancer**, v. 91, n. 3, p. 421–430, 2001.

BERLANGA, A. et al. Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease. **Clinical and Experimental Gastroenterology**, v. 7, p. 221-239, 2014.

BINGHAM, N. C; ROSE, S. R.; INGE, T. H. Bariatric surgery in hypothalamic obesity. **Frontiers in Endocrinology (Lausanne)**, s.v, s.n, p. 3-23, 2013.

BLANDINO-ROSANO, M. et al. mTORC1 signaling and regulation of pancreatic β -cell mass. **Cell cycle**, v. 11, n. 10, p. 1892-1902, 2012.

BLOCH, B. et al. Specific depletion of immunoreactive growth hormone-releasing factor by monosodium glutamate in rat median eminence. **Nature**, v. 307, n. 5948, p. 272-273, 1984.

BONFLEUR, M. L. et al. Duodenal-jejunal Bypass Restores Insulin Action and Beta-Cell Function in Hypothalamic-Obese Rats. **Obesity Surgery**, v. 25, n. 4, p. 656-65, 2015.

BONFLEUR, M. L. et al. Altered brain acetylcholinesterase activity in MSG-induced obese rat. **Diabetes Research**, v. 35, n. 1, p. 27-32, 2000.

BOSCHERO, A. C. Acoplamento da estimulação-secreção de insulina pelas células beta pancreáticas. **ABE&M**, v. 40, n. 3, p. 149-155, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigitel Brasil 2013**: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília: Ministério da Saúde, 2013. <<http://www.brasil.gov.br/saude/2014/04/brasil-estabiliza-taxas-de-sobrepeso-e-obesidade>>. Acesso em: 12 set. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigitel Brasil 2011**: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico, Brasília, 2011. Disponível em: <http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel_brasil_2011.pdf>. Acesso em: 12 maio. 2013.

BRAY, G. A.; GALLAGHER, T. F. Jr. Manifestations of hypothalamic obesity in man: a comprehensive investigation of eight patients and a review of the literature. **Medicine**, v. 54, n. 4, p. 301–330, 1975.

BRAY, G. A. Obesity: historical development of scientific and cultural ideas. **International Journal of Obesity**, v. 14, n. 11, p. 909-926, 1990.

BRAY, G. A.; INOUE, S.; NISHIZAWA, Y. Hypothalamic obesity. The autonomic hypothesis and the lateral hypothalamus. **Diabetologia**, v, 20, s.n, p. 366-377, 1981.

BRAY, G. A.; YORK, D. A. Hypothalamic and genetic obesity in experimental animals: an autonomic and endocrine hypothesis. **Physiological Reviews**, v. 59, s.n, p. 719-809, 1979.

BRETAULT, M. et al. Clinical review: Bariatric surgery following treatment for craniopharyngioma: a systematic review and individual-level data meta-analysis. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 98, n. 6, p. 2239-46, 2013.

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.

CERF, M. E. Beta cell dysfunction and insulin resistance. **Frontiers in Endocrinology**, v. 4, n. 37, p. 1-12, 2013.

CHO, J. H. et al. β -cell mass in people with type 2 diabetes. **Journal of Diabetes Investigation**, v. 2, n. 1, p. 6-17, 2011.

COHEN, J. C.; HORTON, J. D.; HOBBS, H. H. Human fatty liver disease: old questions and new insights. **Science**, v. 332, n. 6037, p. 1519-1523, 2011.

CZECH, M. P; CORVERA, S. Signaling mechanisms that regulate glucose transport. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 4, p. 1865-1868, 1999.

DAWSON, R.; et al. Attenuation of leptin-mediated effects by monosodium glutamate-induced arcuate nucleus damage. **The American Journal of Physiology**, v. 273, n.1 Pt 1, p. E202-E206, 1997.

DAWSON, R. J. Acute and long lasting neurochemical effects of monosodium glutamate administration to mice. **Neuropharmacology**, v.22, n.12, p.1417-1419. 1983.

DAY, C. P.; JAMES, O. F. Steatohepatitis: a tale of two "hits"?. **Gastroenterology**, v. 114, n. 4, p. 842-845, 1998.

DOLNIKOFF, M. S. et al. Neonatal treatment with monosodium glutamate increases plasma corticosterone in the rat. **Neuroendocrinology**, v. 48, n. 6, p. 645-649, 1988.

DURSTINE, J. L. et al. Lipids, lipoproteins, and exercise. **Journal of Cardiopulmonary Rehabilitation**, v. 22, n. 6, p. 385-398, 2002.

EBERTZ, C. E. et al. Duodenal jejunal bypass attenuates non-alcoholic fatty liver disease in western diet-obese rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 29, n. 9, p. 609-614, 2014.

EDVELL, A.; LINDSTROM, P. Vagotomy in young obese hyperglycemic mice: effects on syndrome development and islet proliferation. **American Journal of Physiology**, v. 274, n. 6 Pt 1, p. E1034-1039, 1998.

FABBRINI, E.; SULLIVAN, S.; KLEIN S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications. **Hepatology**, v. 51, n. 2, p. 679-689, 2010.

FANDIÑO, J. et al. Cirurgia bariátrica: aspectos clínico-cirúrgicos e psiquiátricos. **Revista de Psiquiatria**, v. 26, n. 1, p. 47-51, 2004.

GATTA, B. et al. Is bariatric surgery really inefficient in hypothalamic obesity?. **Clinical Endocrinology (Oxford)**, v. 78, n. 4, p. 636-638, 2013.

GAVIN, T. P. et al. Duodenal-jejunal bypass surgery does not increase skeletal muscle insulin signal transduction or glucose disposal in Goto-Kakizaki type 2 diabetic rats. **Obesity Surgery**, v. 21, n. 2, p. 231-237, 2011.

GELONEZE, B. et al. Surgery for nonobese type 2 diabetic patients: an interventional study with duodenal-jejunal exclusion. **Obesity Surgery**, v. 19, n. 8, p. 1077-1083, 2009.

GIBBONS, G. F.; ISLAM, K.; PEASE, R. J. Mobilisation of triacylglycerol stores. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1483, n. 1, p. 37-57, 2000.

GROSS, J. L. et al. Diabetes Mellito: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 1, p. 16-26, 2002.

GUH, D. P. et al. The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: A systematic review and meta-analysis. **BMC Public Health**, v. 9, n. 88, p. 1-20, 2009.

GUILHERME, A. et al. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 5, p. 367-377, 2008.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. p, 961.

HABER, E. P. et al. Secreção da Insulina: Efeito Autócrino da Insulina e Modulação por Ácidos Graxos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 45, n. 3, p. 219-227, 2001.

HALPERN, A. A. Epidemia de Obesidade. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 43, n. 3, p. 175-176, 1999.

HAMAOKA, K.; KUSUNOKI, T. Morphological and cell proliferative study on the growth of visceral organs in monosodium L-glutamate-treated obese mice. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology (Tokyo)**, v. 32, n. 4, p. 395-411, 1986.

HAN, H. et al. Duodenal-jejunal bypass surgery suppresses hepatic de novo lipogenesis and alleviates liver fat accumulation in a diabetic rat model. **Obesity Surgery**, v. 24, n. 12, p. 2152-2160, 2014.

HETHERINGTON, A.; RANSON, S. Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. **Anatomical Record**, v. 78, n. 2, p. 149-172, 1940.

HIRATA, A. E. et al. Monosodium glutamate (MSG)-obese rats develop glucose intolerance and insulin resistance to peripheral glucose uptake. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, n. 5, p. 671-674, 1997.

HOCHBERG, I.; HOCHBERG, Z. Expanding the definition of hypothalamic obesity. **Obesity Reviews**, v. 11, n. 10, p. 709-721, 2010.

HOSEINI, S. S.; HANTOUSHZADEH, S.; SHOAR, S. Evaluating the Extent of Pregravid Risk Factors of Gestational Diabetes Mellitus in Women in Tehran. **Iranian Red Crescent Medical Journal**, v. 13, n. 6, p. 407-414, 2011.

HOSSAIN, P.; KAWAR, B.; EL NAHAS, M. Obesity and Diabetes in the Developing World: A Growing Challenge. **New England Journal of Medicine**, v. 356, n. 3, p. 213-215, 2007.

HU, C. et al. Duodenal-jejunal by-pass improves glucose metabolism and adipokine expression independently of weight loss in a diabetic rat model. **Obesity surgery**, v. 23, n. 9, p. 1436-1444, 2013.

HUSSAIN, M. M.; NIJSTAD, N.; FRANCESCHINI, L. Regulation of microsomal triglyceride transfer protein. **Journal of Clinical Lipidology**, v. 6, n. 3, p. 293-303, 2011.

IDF. **Diabetes Atlas**. 6. ed. International Diabetes Federation, 2013, p. 11-22.

IMAGAWA, A. et al. A novel subtype of type 1 diabetes mellitus characterized by a rapid onset and an absence of diabetes-related antibodies. **New England Journal of Medicine**, v. 342, n. 5, p. 301-307, 2000.

INABNET, W. B. The utility of [(11)C] dihydrotetrabenazine positron emission tomography scanning in assessing beta-cell performance after sleeve gastrectomy and duodenal-jejunal bypass. **Surgery**, v. 147, n. 2, p. 303-309, 2010.

INGE, T. H. et al. Gastric bypass surgery for treatment of hypothalamic obesity after craniopharyngioma therapy. **Nature clinical practice. Endocrinology & metabolism**, v. 3, n. 8, p. 606-609, 2007.

IWASE, M. et al. Effects of Monosodium Glutamate-Induced Obesity in Spontaneously Hypertensive Rats vs. Wistar Kyoto Rats: Serum Leptin and Blood Flow to Brown Adipose Tissue. **Hypertension Research**, v. 23, n. 5, p. 503-510, 2000.

KAHN, B. B. Type 2 Diabetes: When Insulin Secretion Fails to Compensate for Insulin Resistance. **Cell**, v. 92, n. 5, p. 593-596, 1998.

KARAVITAKI, N. et al. Craniopharyngiomas. **Endocrine Reviews**, v. 27, n. 4, p. 371-397, 2006.

KARRA, E.; YOUSSEIF, A.; BATTERHAM, R. L. Mechanisms facilitating weight loss and resolution of type 2 diabetes following bariatric surgery. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 21, n.6, p. 337–344, 2010.

KASHIHARA, H. et al. Duodenal-jejunal bypass improves diabetes and liver steatosis via enhanced glucagon-like peptide-1 elicited by bile acids. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 30, n. 2, p. 308-315, 2015.

KAWANO, Y.; COHEN, D. E. Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. **Journal of Gastroenterology**, v. 48, n. 4, p. 434-441, 2013.

KERNER, J.; HOPPEL, C. Fatty acid import into mitochondria. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1486, n. 1, p. 1-17, 2000.

KIBA, T. et al. Ventromedial hypothalamic lesion-induced vagal hyperactivity stimulates rat pancreatic cell proliferation. **Gastroenterology**, v. 110, n. 3, p. 885-893, 1996.

KINDEL, T.L. et al. The Effect of Duodenal–Jejunal Bypass on Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide Secretion in Wistar Rats. **Obesity Surgery**, v. 20, n. 6, p. 768-775, 2010.

KNOWLER, W. C. et al. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. **The New England Journal of Medicine**, v. 346, n. 6, p. 393-403, 2002.

KULKARNI, R. N. et al. Human β - cell proliferation and intracellular signaling: driving in the dark without a road map. **Diabetes**, v. 61, n. 9, p. 2205-2213, 2012.

LEE, M.; KORNER, J. Review of physiology, clinical manifestations, and management of hypothalamic obesity in humans. **Pituitary**, v. 12, n. 2, p. 87-95, 2009.

LIMA, W. P. et al. Lipid metabolism in trained rats: effect of guarana (*Paullinia cupana* Mart.). **Clinical Nutrition**, v. 24, n. 6, p. 1019-1028, 2005.

LIRA F.S. et al. Exercise training reduces PGE2 levels and induces recovery from steatosis in tumorbearing rats. **Hormone and Metabolic Research**, v. 42, n. 13, p. 944-949, 2010.

LIU, S. Z. et al. A high-fat diet reverses improvement in glucose tolerance induced by duodenal-jejunal bypass in type 2 diabetic rats. **Chinese Medical Journal**, v. 126, n.5, p. 912-919, 2012.

LUBACZEUSKI, C. et al. Vagotomy ameliorates islet morphofunction and body metabolic homeostasis in MSG-obese rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 5, p. 447-457, 2015.

LUCINEI BALBO, S. et al. Insulin secretion and acetylcholinesterase activity in monosodium l-glutamate-induced obese mice. **Hormone Research**, v. 54, s.n, p. 186-91, 2000.

LUIS, D. et al. Effects of duodenal-jejunal exclusion on beta cell Function and hormonal regulation in goto-kakizaki rats. **The American Journal of Surgery**, v. 204, n. 2, p. 242-247, 2012.

LUSTIG, R. H. Hypothalamic obesity: causes, consequences, treatment. **Pediatric Endocrinology Review**, v. 6, n. 2, p. 220-227, 2008.

LUSTIG, R. H. Hypothalamic obesity after craniopharyngioma: mechanisms, diagnosis, and treatment. **Frontiers in Endocrinology (Lausanne)**, s.v, s.n, p. 2-60, 2011.

LUSTIG, R. H. The neuroendocrinology of obesity. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 30, n. 3, p. 765-785, 2001.

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, n. 10, p. 376-383, 2008.

MAFFEI, A. et al. Anti-incretin, Anti-proliferative action of dopamine on β -Cells. **Molecular Endocrinology**, v. 29, n. 4, p. 542-557, 2015.

MAITER, D. et al. Neonatal treatment with monosodium glutamate: effects of prolonged growth hormone (GH)-releasing hormone deficiency on pulsatile e GH

secretion and growth in female rats. **Endocrinology**, v. 128, n. 2, p. 1100-1106, 1991.

MARTÍNEZ-MORENO, J. M.; GARCACABALLERO, M. Influences of the diabetes surgery on pancreatic β -cells mass. **Nutrición Hospitalaria**, v. 28, s.n, p. 88-94, 2013. Suplemento 2.

MATSCHINSKY, F. M. Banting Lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. **Diabetes**, v. 45, n. 2, p. 223-41, fev. 1996.

MAZZINI, M. C. et al. Diabetes mellitus risk screening of parents of private school students in the city of Jundiaí, São Paulo, Brazil. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 59, n. 2, p. 136-142, 2013.

MENDONÇA, C. P.; ANJOS, L. A. Aspectos das práticas alimentares e da atividade física como determinantes do crescimento do sobrepeso/obesidade no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 20, n. 3, p. 698-709, 2004.

MEZZA, T. et al. Insulin resistance alters islet morphology in nondiabetic humans. **Diabetes**, v. 63, n. 3, p. 944-1007, 2014.

MOLINATTI, G. M.; LIMONE, P. Obesity: a challenge for the clinician. **Frontiers in Diabetes**, v. 11, s.n, p. 7-16, 1992.

MONTEIRO, A.; ANGELIS, I. Cirurgia bariátrica: uma opção de tratamento para a obesidade mórbida. **Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento**, v. 1, n. 3, p. 19-26, 2007.

MORRIS, M. J.; et al. Reduced BAT function as a mechanism for obesity in the hypophagic, neuropeptide Y deficient monosodium glutamate-treated rat. **Regulatory Peptides**, v. 25, n. 75-76, p. 441-447, 1998.

MULLER, H. L. Childhood craniopharyngioma. Recent advances in diagnosis, treatment and follow-up. **Hormone Research**, v. 69, n. 4, p. 193-202, 2008.

MULLER, H. L. et al. First experiences with laparoscopic adjustable gastric banding (LAGB) in the treatment of patients with childhood craniopharyngioma and morbid obesity. **Klinische Pädiatrie**, v. 219, n. 6, p. 323-325, 2007.

MULLER, H. L. et al. Obesity after childhood craniopharyngioma—German multicenter study on pre-operative risk factors and quality of life. **Klinische Pädiatrie**, v. 213, n. 4, p. 244–249, 2001.

MURTHY, M. S. R.; PANDE, S. V. Malonyl-CoA-sensitive and insensitive carnitine palmitoyltransferase activities of microsomes are due to different proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 28, p. 18283-18286, 1994.

NARDELLI, T. R. et al. Taurine prevents fat deposition and ameliorates plasma lipid profile in monosodium glutamate-obese rats. **Amino Acids**, v. 41, n. 4, p. 901-908, 2011.

NAUCK, M. A. et al. Preserved incretin activity of glucagon-like peptide 1 [7–36 amide] but not of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with type-2 diabetes mellitus. *Journal of Clinical Investigation*, v. 91, n. 1, p. 301–307, 1993.

NEMEROFF, C. B. et al. Effects of acute administration of monosodium-L-glutamate (MSG), atropine or haloperidol on anterior pituitary hormone secretion in the rat. **Brain Research**, v. 156, n. 1, p. 198-201, 1978.

NESHER, R. et al. Beta-cell protein kinases and the dynamics of the insulin response to glucose. **Diabetes**, v. 51, s/n, p. S68-S73, 2002. Suplemento 1.

NGUYEN, P. et al. Liver lipid metabolism. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 92, n. 3, p. 272-283, 2008.

ODAR, E.; WANDABWA, J.; KIONDO, P. Maternal and fetal outcome of gestational diabetes mellitus in Mulago Hospital, Uganda. **African Health Sciences**, v. 4, n. 1, p. 9-14, 2004.

OLNEY, J. W. Brain Lesions, Obesity, and Other Disturbances in Mice Treated with Monosodium Glutamate. **Science**, v. 164, n. 3880, p. 719-721, 1969.

OLNEY, J. W.; SHARPE, L.G. Brain lesions in an infant rhesus monkey treated with monosodium glutamate. **Science**, v. 166, n. 903, p. 386-388, 1969.

ORGAN, C. H. JR.; KESSLER, E.; LANE, M. Long-term results of jejunoileal bypass in the young. **American Journal of Surgery**, v. 50, n. 11, p. 589–593, 1984.

PACHECO, D. et al. The effects of duodenal-jejunal exclusion on hormonal regulation of glucose metabolism in Goto-Kakizaki rats. **American Journal of Surgery**, v. 194, n. 2, p. 221-224, 2007.

PAGE-WILSON, G. et al. Hypothalamic obesity in patients with craniopharyngioma: treatment approaches and the emerging role of gastric bypass surgery. **Pituitary**, v. 15, n.1, p. 84-92, 2012.

PÉNICAUD, L. et al. Changes in autonomic nervous system activity and consecutive hyperinsulinaemia: respective roles in the development of obesity in rodents. **Diabetes & Metabolism**, v. 22, n. 1, p. 15-24, 1996.

PERFETTI, R.; HUI, H. The role of GLP-1 in the life and death of pancreatic beta cells. **Hormone and Metabolic Research**, v. 36, n. 11-12, p. 804-810, 2004.

PICK, A. et al. Role of apoptosis in failure of beta-cell mass compensation for insulin resistance and beta-cell defects in the male Zucker diabetic fatty rat. **Diabetes**, v. 47, n. 3, p. 358-364, 1998.

POLONSKY, K. S.; STURIS, J.; BELL, G. I. Seminars in medicine of the beth Israel Hospital, Boston. Noninsulin-dependent diabetes mellitus: a genetically programmed failure of the beta cell to compensate for insulin resistance. **The New England Journal of Medicine**, v. 334, n. 12, p 777–783, 1996.

RAO, R. S. Bariatric Surgery and the Central Nervous System. **Obesity Surgery**, v. 12, n. 6, p. 967-978, 2012.

REIS, C. E.; VASCONCELOS, I. L.; BARROS, J. F. N. Políticas públicas de nutrição para o controle da obesidade infantil. **Revista Pauista de Pediatria**, v. 29, n. 4, p. 625-633, 2011.

RIBEIRO, R. A. et al. Impaired muscarinic type 3 (M3) receptor/PKC and PKA pathways in islets from MSG-obese rats. **Molecular Biology Reports**, v. 40, n. 7, p. 4521-4528, 2013.

ROBERTSON, R. P. et al. Glucose toxicity in beta-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. **Diabetes**, v. 52, n. 3, p. 581-587, 2003.

ROTTEMBOURG, D. et al. Out come after bariatric surgery in two adolescents with hypothalamic obesity following treatment of craniopharyngioma. **The Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism**, v. 22, n. 9, p. 867-872, 2009.

RUBINO, F. et al. The Mechanism of Diabetes Control After Gastrointestinal Bypass Surgery Reveals a Role of the Proximal Small Intestine in the Pathophysiology of Type 2 Diabetes. **Annals of Surgery**, v. 244, n. 5, p. 741-749, 2006.

RUBINO, F.; MARESCAUX, J. Effect of Duodenal–Jejunal Exclusion in a Non-obese Animal Model of Type 2 Diabetes: A New Perspective for an Old Disease. **Annals of Surgery**, v. 239, n. 1, p. 1-11, 2004.

RUI, L. Energy metabolism in the liver. **Comprehensive Physiology**, v. 4, n. 1, p. 177-197, 2014.

SANTOS, J. R.; ENUMO, S. R. F. Adolescentes com diabetes mellitus tipo 1: seu cotidiano e enfrentamento da doença. **Psicologia: Reflexão e Crítica**, v. 16, n. 2, p. 411-425, 2003.

SASAKI, F.; KAWAI, T.; OHTA, M. Immunohistochemical evidence of neurons with GHRH or LHRH in the arcuate nucleus of male mice and their possible role in the postnatal development of adenohypophysial cells. **The Anatomical Record**, v. 240, n. 2, p. 255-260, 1994.

SBC. Sociedade Brasileira de Cardiologia. **IV Diretriz Brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia**. 2007.

SBCBM, SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIRURGIA BARIÁTRICA E METABÓLICA. **Cirurgia Bariátrica e Metabólica**, São Paulo, 2011. Disponível em: <<http://www.sbcb.org.br/cbariatrica.php?menu=0>>. Acesso em: 05 maio. 2014.

SBD, SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes SBD**. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2009. Disponível em: <http://www.diabetes.org.br/attachments/diretrizes09_final.pdf>. Acesso em: 07 out. 2013.

SCHULTES, B. et al. Distal gastric bypass surgery for the treatment of hypothalamic obesity after childhood craniopharyngioma. **European Journal of Endocrinology**, v. 161, n. 1, p. 201-206, 2009.

SHRAYYEF, M. Z.; GERICH, J. E. **Principles of Diabetes Mellitus - Normal Glucose Homeostasis**. 2. ed. New York: L. Poretsky, 2010, p. 1-32.

SKORZEWSKA, A. et al. Abnormal food-seeking behavior after surgery for craniopharyngioma. **Neuropsychobiology**, v. 21, n. 1, p. 17–20, 1989.

SMITH, P. The disabilities caused by hypophysectomy and their repair. The tuberal (hypothalamic) syndrome in the rat. **JAMA**, v. 88, n. 3, p. 158–161, 1927.

SOUZA, F. et al. Efeito da vagotomia troncular em ratos injetados na fase neonatal com glutamato monossódico: estudo biométrico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 16, n. 1, p. 32-45, 2001.

SOWERS, J. R. Obesity and cardiovascular disease. **Clinical Chemistry**, v. 44, n. 8B, p. 1821-1825, 1998.

SPARKS, J. D.; SPARKS, C. E. Overindulgence and metabolic syndrome: is FoxO1 a missing link?. **Journal of Clinical Investigation**, n. 118, p. 2012-2015, 2008.

SPASSIANI, N. A.; KUK, J. L. Exercise and the fatty liver. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, v. 33, n. 4, p. 802-807, 2008.

SPECK, M. et al. Duodenal-jejunal bypass protects GK rats from {beta}-cell loss and aggravation of hyperglycemia and increases enteroendocrine cells coexpressing GIP and GLP-1. **The American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 300, n. 5, p. E 923-932, 2011.

STEMMER, K. et al. High-fat-diet-induced obesity causes an inflammatory and tumor-promoting microenvironment in the rat kidney. **Disease Models & Mechanisms**, v.5, n. 5, p. 627-635, 2012.

STOEHR, J. P. Genetic obesity unmasks nonlinear interactions between murine type 2 diabetes susceptibility loci. **Diabetes**, v. 49, n. 11, p.1946-1954, 2000.

STUMVOLL, M.; GOLDSTEIN, B. J.; VAN HAEFTEN, T.W. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. **The Lancet**, v. 365, n. 9467, p. 1333-1346, 2005.

SUCUPIRA, M. J. al. Diabetes Mellitus: prevalência e grupos de risco na população de servidores da Secretaria Especial de Editoração e Publicações do Senado Federal. **Diabetes Clínica**, v. 4, s/n, p. 40–49, 2000.

SZABLEWSKI, L. **Glucose Homeostasis – Mechanism and Defects, Diabetes - Damages and Treatments**. Croácia: Prof. Everlon Rigobelo, 2011, p. 227-253.

TAKASAKI, Y. Studies on brain lesion by administration of monosodium L-glutamate to mice. I. Brain lesions in infants caused by administration of monosodium L-glutamate. **Toxicology**, v. 9, n. 4, p. 293-305, 1978.

TAKEDA, Y. et al. Systems analysis of GLP-1 receptor signaling in pancreatic β -cells. **The American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 301, n. 4, p. C792-C803, 2011.

TARASTCHUK, J. C. E. et al. Obesidade e Intervenção Coronariana: Devemos Continuar Valorizando o Índice de Massa Corpórea?. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 90, n. 5, p. 311-316, 2008.

TENGHOLM, A.; GYLFE, E. Oscillatory control of insulin secretion. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 297, n. 1-2, p. 58-72, 2009.

TUOMILEHTO, J. et al. Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. **The New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 18, p. 1343–1350, 2001.

VASQUES, A. C. J. et al. Indicadores do perfil lipídico plasmático relacionados à resistência à insulina. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 55, n. 3, p. 342-346, 2009.

VIANA, A. L.; FAUSTO, M. C.; LIMA, L.D. Política de saúde e equidade. **São Paulo em Perspectiva**, v. 17, s/n, p. 58-68, 2003.

VOLLMER, K. et al. Predictors of incretin concentrations in subjects with normal, impaired, and diabetic glucose tolerance. **Diabetes**, v. 57, n. 3, p. 678-687, 2008.

WANDERS, R. J. A. Peroxisomes, lipid metabolism, and peroxisomal disorders. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 83, p. 16-27, 2004.

WEISMANN, D. et al. Bariatric surgery for morbid obesity in craniopharyngioma. **Clinical Endocrinology (Oxford)**, v. 78, n. 3, p. 385-390, 2013.

WHITE, M. F. Insulin signaling in health and disease. **Diabetes**, v. 302 n. 5651, p. 1710-1711, 2003.

WHITING, D. R. et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. **Diabetes research and clinical practice**, v. 94, n. 6, p. 311-321, 2011.

WHO. **10 facts on obesity**. World Health Organization, 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/features/factfiles/obesity/en/>>. Acesso em: 16 jul. 2013.

WILSON-PÉREZ, H. E. et al. Vertical sleeve gastrectomy is effective in two genetic mouse models of glucagon-like Peptide 1 receptor deficiency. **Diabetes**, v. 62, n. 7, p. 2380-2385, 2013.

WITTERS, L. A. et al. Insulin stimulates the dephosphorylation and activation of acetyl-CoA carboxylase. Proceedings of the **National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 15, p. 5473-5477, 1988.

WOODS, M. et al. Antidiabetic effects of duodenojejunal bypass in an experimental model of diabetes induced by a high-fat diet. **British Journal of Surgery**, v. 98, n. 5, p. 686-696, 2011.

WUBULIKASIMU, M. et al. Duodenal-jejunal bypass surgery on type 2 diabetic rats reduces the expression of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in the thoracic aorta. **Chinese Medical Journal**, v. 127, n. 3, p. 1423-2428, 2014.

YABE, D.; SEINO, Y. Two incretin hormones GLP-1 and GIP: comparison of their actions in insulin secretion and β cell preservation. **Progress in Biophysics & Molecular Biology**, v. 107, n. 2, p. 248-256, 2011.

YAMASHITA, H. et al. A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 16, p. 9116-9121, 2001.

ZECCHIN, H. G.; CARVALHEIRA, J.B. C.; SAAD, M. J. A. Molecular mechanisms for insulin resistance in the metabolic syndrome. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, v. 14, n. 4, p. 574-589, 2004.

**DUODENO-JEJUNAL BYPASS NORMALIZES PANCREATIC ISLET
PROLIFERATION RATE AND FUNCTION BUT NOT HEPATIC
STEATOSIS IN HYPOTHALAMIC OBESE RATS**

**DUODENO-JEJUNAL BYPASS NORMALIZES PANCREATIC ISLET
PROLIFERATION RATE AND FUNCTION BUT NOT HEPATIC STEATOSIS
IN HYPOTHALAMIC OBESE RATS**

Manuscript type: Original article

Kathia Regina Cantelli¹, Gabriela Moreira Soares¹, Rosane Aparecida Ribeiro², Sandra Lucinei Balbo¹, Camila Lubaczeuski³, Antonio Carlos Boschero³, Allan Cezar Faria Araújo⁴, Maria Lúcia Bonfleur^{1*}

¹Laboratório de Fisiologia Endócrina e Metabolismo (LAFEM), Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Cascavel, PR, Brazil.

²Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Campus UFRJ-Macaé, Macaé, RJ, Brazil.

³Laboratório de Pâncreas Endócrino e Metabolismo, Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

⁴Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, UNIOESTE, Cascavel, PR, Brazil.

Correspondence to Maria Lúcia Bonfleur

Laboratório de Fisiologia Endócrina e Metabolismo, Cascavel, PR, Brazil CEP: 858119-110

E-mail: mlbonfleur@hotmail.com; maria.bonfleur@unioeste.br

Fone: +55 45 3220 3257

Short running head: Effects of DJB in HyO rats

Funding: This study was supported by grants from Fundação Araucária (155/2013 and 393/2013); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Acknowledgments: We are grateful to Assis Roberto Escher for animal care and Nicola Conran for editing English.

Abstract

Purpose: Modifications in life-style and/or pharmacotherapies contribute to weight loss and ameliorate the metabolic profile of diet-induced obese humans and rodents. Since these strategies fail to treat hypothalamic obesity, we have assessed herein the possible mechanisms by which the duodeno-jejunal bypass (DJB) operation regulates hepatic lipid metabolism and the morphophysiology of pancreatic islets, in hypothalamic obese (HyO) rats. *Methods:* During the first 5 days of life, male Wistar rats received subcutaneous injections of MSG [4 g/kg body weight, HyO group], or saline (CTL). At 90 days of age, HyO rats were randomly subjected to DJB (HyO DJB) or sham operations (HyO Sham group). *Results:* HyO Sham rats were morbidly obese, insulin resistant, hypertriglyceridemic and displayed higher serum concentrations of nonesterified fatty acids (NEFA) and hepatic triglyceride (TG). These effects were associated with higher expressions of the lipogenic genes and FASN protein content in the liver. Furthermore, hepatic genes, involved in β -oxidation and TG export, were down-regulated in HyO rats. In addition, these rats exhibited hyperinsulinemia, β -cell hypersecretion, a higher percentage of islets and β -cell area/pancreas section, and enhanced nuclear content of Ki67 protein in islet-cells. At 2 months after the DJB operation, the serum concentrations of TG and NEFA, but not hepatic TG accumulation and gene and protein expressions, were normalized in HyO rats. Insulin release and Ki67 positive cells were also normalized in HyO DJB islets. *Conclusions:* DJB decreases islet-cell proliferation, normalizes insulinemia, ameliorates insulin sensitivity and plasma lipid profile, independently of changes in hepatic metabolism.

Keywords: Duodenal-jejunal bypass, Hepatic fatty acid metabolism, Hypothalamic obesity, Ki67, Insulin secretion.

Introduction

Obesity predisposes to insulin resistance and contributes to the pathogenesis of type 2 diabetes (T2D) [1]. Insulin resistance also disrupts whole body lipid metabolism, leading to hypertriglyceridemia and accumulation of triglycerides (TG) in the liver, promoting nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) [2]. Insulin resistance is counteracted by an increase in insulin secretion, due to morphological and functional alterations in pancreatic β -cells. However, when β -cell compensatory modifications cannot be sustained, T2D is established [3, 4].

The hypothalamus is a key regulator of body mass, controlling food intake, energy expenditure, and body fat stores. Hypothalamic damage, promoted by genetic defects, radiotherapy or the resection of a brain tumor can lead to neuroendocrine dysfunctions resulting in morbid obesity [5]. Hypothalamic obese (HyO) patients display hyperinsulinemia, insulin resistance, hypertriglyceridemia, hyperleptinemia and NAFLD [6-9]. Life-style modifications, physical activity and/or pharmacotherapy are used for weight loss in genetically and diet-induced obesity [10], but often fails in HyO patients [12]. An alternative for these patients may be bariatric operations, but the effects of this procedure in HyO individuals are controversial [5, 11, 12].

The duodenal-jejunal bypass (DJB) operation seems to be a good strategy to improve glucose homeostasis and NAFLD in obese rodents, induced by hyper caloric diet or genetic alterations [13-16]. However, information about the effects of DJB upon hypothalamic obesity is scarce, possibly due to a lack of experimental models that mimic the features of this syndrome. The treatment of neonatal rodents with monosodium glutamate (MSG) leads to

hypothalamic lesions that promote neuroendocrine dysfunctions and metabolic disruptions, similar to those observed in HyO humans. MSG-obese rats presented morbid obesity, NAFLD, glucose intolerance, insulin resistance, hyperinsulinemia, hyperleptinemia, and pancreatic islet hyperfunction [17-21]. The DJB operation does not decrease adiposity and hepatic steatosis, but ameliorates body glucose control and hepatic insulin action [22]. As such, we herein aimed to better understand the mechanism of action by which the DJB operation regulates hepatic lipid metabolism and pancreatic islet morphophysiology in HyO rats.

Materials and Methods

Induction of hypothalamic obesity and DJB operation protocol

Male newborn Wistar rats received a daily subcutaneous injection of MSG [4 g/kg body weight (BW), HyO group], or hyperosmotic saline (1.25 g/kg BW, CTL group) during the first 5 days of life. All rats were maintained on a 12h light/dark cycle (lights on 06:00–18:00h) and controlled temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), with free access to standard rodent chow (Biobase®, Águas Frias, SC, BRA) and water.

At 90 days of age, HyO rats were randomly submitted to DJB (HyO DJB group) or sham operations (HyO Sham). Preoperative procedures were performed as previously described by Meguid et al. [23]. Rats were deprived of food for 12 h and were anesthetized with isoflurane (Isoforine®, Cristália, SP, BRA). For the DJB operation, HyO rats were laparotomized and a postpyloric transection was made to separate the stomach from the duodenum. The reconstruction of the intestinal passage was performed in the terminolateral duodenojejunostomy 5 cm aboral of the flexura duodenojejunalis. In HyO Sham rats, after the laparotomy, the stomach, duodenum and intestines were massaged, and the incision was closed. The UNIOESTE's Committee on Ethics in Animal Experimentation approved all

experiments.

Evaluation of obesity and biochemical parameters

Body weight (BW) was measured monthly during the entire experimental period. At 2 months after the DJB and sham operations, the final BW and nasoanal length were measured to calculate the Lee Index $[BW (g)^{1/3}/\text{nasoanal length (cm)} \times 1000]$ [24]. Blood was obtained by a cut in the tail tip from 8h-fasted rats, and glucose was measured using a glucose analyzer (Abbott®, Optium Xceed, Alameda, CA). Subsequently, the rats were euthanized by decapitation and total blood was collected to obtain the serum, which was used to measure TG, total cholesterol (CHOL) and nonesterified fatty acids (NEFA) with standard commercial kits, according to the manufacturers' instructions (Laborclin®, Bioliqoid, Pinhas, PR, BR and Wako®, Germany, respectively). Serum insulin was measured by radioimmunoassay (RIA).

Liver TG content

Fragments from the liver were collected and lipids were extracted by the Folch's method [25]. The extract was evaporated and then diluted in isopropanol, and TG was measured as described above.

HOMA-IR

Tissue insulin sensitivity was evaluated by the previously validated homeostasis model assessment (HOMA) using the HOMA index of insulin resistance $[(\text{HOMA-IR}) = \text{fasting insulin } (\mu\text{U/mL}) \times \text{fasting glucose (mM)} / 22.5]$ [26].

Static insulin secretion

Pancreatic islets were isolated by the collagenase digestion of pancreases. For static

incubation, groups of four islets from each group were firstly incubated for 30 min in Krebs-Ringer bicarbonate (KRB) solution containing: 115 mM NaCl, 5 mM KCl, 2.56 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM NaHCO₃, 15 mM HEPES, supplemented with 5.6 mM glucose, 3 g of BSA/L, and equilibrated with a mixture of 95% O₂/5% CO₂ to give pH 7.4. This medium was then replaced with fresh KRB buffer and the islets were incubated for a further 1 h in the presence of 5.6 or 8.3 mM glucose. At the end of the incubation period, aliquots of the supernatant were collected and maintained at -20°C for posterior insulin measurement by RIA.

Pancreas morphometry and immunohistochemistry

Pancreases from all groups of rats were removed, weighed and fixed for 24h in 4% formaldehyde solution (Sigma Aldrich Chemicals, St Louis, MO, USA). The tissue was then embedded in Paraplast® (Sigma Aldrich Chemicals, St Louis, MO, USA). From each pancreas, five consecutive 7-µm serial sections were selected; and after an interval of 140 µm in thickness, five more consecutive sections were obtained. Three sections were randomly selected for insulin, two sections for glucagon and one for the Ki67 immunoperoxidase reaction. For immunohistochemistry, Paraplast® was removed, the sections were rehydrated and washed with 0.05 M tris-saline buffer (TBS) pH 7.4, and incubated with TBS containing 0.3% H₂O₂ for endogenous peroxidase activity blockade and permeabilized for 1 h with TTBS (0.1 % Tween 20 and 5 g/% of fat free milk in TBS). The sections were incubated with a polyclonal guinea pig antiinsulin (1:150; Dako North America, Inc., CA, USA), or rabbit anti-glucagon (1:50; Dako North America, Inc., CA, USA), or rabbit monoclonal anti Ki67 (1:20; Spring Bioscience, CA, USA) antibody at 4°C overnight. Subsequently, the sections were incubated with rabbit anti-guinea pig IgG or goat anti-rabbit conjugated antibody with HRP for 1 h and 30 min. The positive insulin, glucagon or Ki67 cells were detected with

diaminobenzidine (DAB; Sigma- Aldrich Chemicals, St Louis, MO, USA) solution (10% DAB and 0.2% H₂O₂ in TBS). Finally, the sections were quickly stained with Ehrlich's hematoxylin and mounted for microscopic observation. All islets present in the sections were covered systematically by capturing images with a digital camera coupled to a microscope (Olympus DP71; Olympus BX60). Pancreatic islet, β -cell and α -cell areas were measured using the Image-Pro-Plus Media, Cybernetics Software (Rockville, MD, USA). The islet, β -cell and α -cell masses were calculated by the total islets, β -cell and α -cell areas (% pancreas area) multiplied by pancreas weight (mg) [27]. The proliferation of islet cells was expressed as the percentage of nuclei in islets stained for Ki67 protein.

RNA isolation and qPCR

Total liver RNA was isolated using the PuriLink® RNA minikit (Life Technologies, CA, USA). Quantification of mRNAs were performed using the 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), and the expression concentration of each amplified gene was normalized to that of the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene. The absolute amount of gene expression was calculated by the use of standard curves (10⁸-10³ copies /2 μ L DNA molecules), produced from the gene amplification products on 2% agarose gels. Primer sequences used for rat genes were: liver-type pyruvate kinase (LPK, 5', GACCCGAAGTTCCAGACAAGG and 3', ATGAGCCCGTCGTCAATGTAG); acetyl-CoA carboxylase 1 (ACC-1, 5', AGGAAGATGGTGTCCCGCTCTG and 3', GGGGAGATGTGCTGGGTCAT); fatty acid synthase (FASN, 5', AGGTGCTAGAGGCCCTGCTA and 3', GTGCACAGACACCTTCCCAT); stearoylcoenzyme A desaturase 1 (SCD-1, 5', CAGTTCCTACACGACCACCACTA and 3', GGACGGATGTCTTCTTCCAGAT); acyl-CoA oxidase (ACO, 5', CCCAAGACCCAAGAGTTCATTC and 3',

TCACGGATAGGGACAACAAAGG); carnitine palmitoyltransferase 1a (CPT-1a, 5', CTCCTGAGCAGTTACCAATGC and 3', GAACCTTGGCTGCGGTAAGAC); microsomal triglyceride transfer protein (MTTP, 5', CTTCTGCCTTACTGGCTACG and 3', GTTCTCCTCTCCCTCATCTGG0) and GAPDH (5', GAACGGGAAGCTCACTGGC and 3', GCATGTCAGATCCACAACGG).

Western Blot

For protein expression experiments, fragments of liver were solubilized in homogenization buffer (100 mM Tris pH 7.5, 10 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium fluoride, 10 mM EDTA, 10 mM sodium vanadate, 2 mM PMSF and 1% TritonX 100) at 4°C using a Polytron MA 102/mini homogenizer (Marconi®, Piracicaba, São Paulo, BRA). The protein concentration in the supernatants was assayed using a commercial Bradford reagent (Bio-Agency Lab., São Paulo, SP, BRA) and BSA for the standard curve. For SDS gel electrophoresis, the protein samples were homogenized with a loading buffer containing dithiothreitol and heated at 95°C for 5 min. Subsequently the proteins were separated by electrophoresis (100 µg protein/lane in 6.5% gels) and transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were blotted with specific primary antibodies against ACC (1:1000, cat. # 3662S, Cell Signaling Technology, Boston, MA, USA), phospho- pACCSer79 (1:1000, cat. #3661, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), FASN (1:1000, cat. sc-20140, Santa Cruz, CA, USA), and CPT-1a (1:1000; cat n° ab128568, Abcam, Inc., Cambridge, MA). Visualization of specific protein bands was carried out by incubating the membranes with secondary antibodies (Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA), and images were captured using a photodocumentor (L-Pix Chemi Express, Loccus Biotecnology, SP, BRA). LabImage 1D software was used to analyze the density of the bands (Loccus Biotecnology, SP, BRA). The α -tubulin protein (1:1,000, cat. T5168, Sigma-Aldrich

Chemicals, St Louis, MO, USA) was used as a control of protein expression.

Statistical analysis

Results are presented as means \pm SEM. Data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey post-test ($P < 0.05$) with the GraphPad Prism® Software version 5.00 (San Diego, CA, USA).

Results

General rat parameters

HyO rats showed a significantly lower BW at 2 months of age; this weight remained lower, compared to CTL rats, until the end of the experimental period ($P < 0.05$) (Fig. 1A). The total BW, as judged by the area under the growth curve (AUC), was lower in HyO Sham rats than that observed for CTL rats ($P < 0.01$; Fig. 1B). The DJB operation did not modify BW in HyO DJB rats, when compared with HyO Sham rats (Fig. 1A and B, respectively).

At the end of the experimental period, the final BW and nasoanal length were lower in the HyO Sham rats, compared with CTL ($P < 0.0001$ and $P < 0.0001$; Tab. 1). However, the HyO Sham group displayed an enhanced Lee index and increases of 63% and 92% in the retroperitoneal and perigonadal fat stores, when compared with CTL rats ($P < 0.01$, $P < 0.001$ and $P < 0.001$, respectively; Tab. 1). At 2 months after the DJB operation, all these parameters were similar to those found in the HyO Sham group (Tab. 1).

Serum and hepatic lipid profiles

We investigated the effects of HyO and DJB on body lipid homeostasis. HyO Sham rats presented higher NEFA serum concentrations, hypertriglyceridemia and higher TG content in

the liver ($P < 0.0001$; Tab. 2). At 2 months after the operation, serum NEFA and TG were reduced by 42% and 26%, respectively, in HyO DJB rats, compared with HyO Sham rats ($P < 0.001$ and $P < 0.01$; Tab. 2). However, the hepatic TG content in HyO DJB rats was similar to that of the HyO Sham rats and higher than that of the CTL group. No modifications in total serum CHOL values were observed in the experimental groups (Tab. 2).

To better characterize hepatic lipid metabolism in HyO rats, the expression of several genes and proteins involved in de novo lipogenesis and fatty acid (FA) β -oxidation were investigated. When compared to the CTL rats, HyO Sham rats showed a higher expression of the hepatic lipogenic mRNAs, LPK, ACC-1, FASN and SCD-1 ($P < 0.05$, $P < 0.05$, $P < 0.001$ and $P < 0.01$, respectively; Fig. 2), but reduced CPT-1a and MTP gene expressions, key factors involved in β -oxidation and in assembling of the TG-rich ApoB-containing lipoproteins, respectively ($P < 0.05$ and $P < 0.001$; Fig. 2). However, only the hepatic protein content of FASN, an enzyme that catalyzes the synthesis of long-chain FA from acetyl-CoA and malonyl-CoA, was significantly higher in the liver of HyO Sham rats, compared with CTL animals ($P < 0.05$; Fig. 3C). In addition, pACC/ACC protein expression was significantly reduced in the liver of HyO Sham rats ($P < 0.04$; Fig. 3B), indicating an increased ACC activity and, therefore, higher FA synthesis. The DJB operation failed to normalize hepatic gene and protein expressions of the enzymes involved in de novo lipogenesis and β -oxidation (Fig. 2 and 3).

Glucose homeostasis

HyO Sham rats presented normal fasting glycemia (Fig. 4A), but higher insulinemia ($P < 0.02$; Fig. 4B), indicating an impaired insulin action in peripheral tissues, as indicated by the higher HOMA-IR index in HyO Sham rats, compared with CTL ($P < 0.003$; Fig. 4C). The DJB operation reduced the insulinemia to values similar to those observed for the CTL (Fig.

4B); however, the HyO DJB rats showed only a partial reduction in HOMA-IR (Fig. 4C).

The higher insulinemia, observed in the HyO Sham group, was associated with enhanced pancreatic β -cell responsiveness to glucose, since insulin secretion at 8.3 mM glucose in islets from HyO Sham rats was 1.9-fold greater, than in CTL islets ($P < 0.05$, Fig. 4D). The reduction in insulinemia in HyO rats, observed at 2 months after the DJB operation, was accompanied by a decrease in insulin release, in response to 8.3 mM glucose in HyO DJB islets, compared with HyO Sham rats ($P < 0.01$; Fig. 4D).

Pancreatic islet morphology and morphometry

We analyzed whether the islet function modifications induced by the DJB operation in HyO rats were due to alterations in endocrine pancreas morphology. HyO Sham rats presented 33% lower pancreas relative weight per BW, compared to the CTL rats ($P < 0.01$; Tab. 3). At 2 months after the DJB operation, HyO DJB rats displayed a 1.6-fold increase in pancreas relative weight, compared with HyO Sham rats ($P < 0.01$; Tab. 3). Histological analysis of the pancreas of CTL, HyO Sham and HyO DJB groups did not reveal any significant difference in the islet architecture. The islets from these groups were approximately spherical or oval in shape, displaying a typical β -cell arrangement within the islet core and α -cells at the periphery (Fig. 5A). However, the size of the islets, as well as the areas of α - and β -cells, were smaller in HyO Sham rats, than that observed in the CTL pancreas ($P < 0.001$ and $P < 0.001$, respectively; Tab. 3). In contrast, the pancreas of HyO Sham pancreas presented a greater percentage of total islet and β -cell areas per pancreas section than the CTL pancreas ($P < 0.001$; Tab. 3). However, islets, β -cell and α -cell masses did not differ between the HyO Sham and CTL groups (Fig. 5B, C and D). In contrast, HyO Sham pancreatic islets presented a higher percentage of nuclei stained for Ki67 protein, in comparison to CTL islets ($P < 0.001$; Fig 6A and B). At 2 months after the DJB operation,

HyO DJB pancreatic islets, β and α -cell areas did not differ from those of the HyO Sham group (Tab. 3), although significant reductions in the total percentage of islet and β -cell areas per pancreas section were evidenced in HyO DJB, when compared with the HyO Sham group ($P < 0.001$; Tab. 3). In addition, HyO DJB pancreatic islets presented a reduced percentage of Ki67-positive nuclei, compared to that of HyO sham rats ($P < 0.0001$; Fig. 6B).

Discussion

Hypothalamic obesity is a major and unsolved problem in patients with medial hypothalamic lesions and has a major negative impact on survival and quality of life [28]. We, herein, report data that provide evidence about the mechanism by which the DJB operation may regulate hepatic lipid metabolism and endocrine pancreatic morphofunction in HyO rats.

In accordance with our previous observations [18, 20], and similarly to observations in HyO patients [6-9], HyO Sham rats were hypertriglyceridemic with higher serum NEFA and hepatic TG concentrations. These alterations may be associated with enhanced expression of de novo lipogenic genes (LPK, ACC-1, FASN and SCD-1) and FASN protein, and ACC activation in the liver of HyO rats. In addition, the higher concentrations of NEFA in the serum of HyO Sham rats may enhance the accumulation of TG in the liver. Circulating NEFAs are derived from three sources, the diet, de novo synthesis and circulating FA [29], and the consumption of high-fat or western diet lead to the development of hepatic steatosis [16, 30]. Conversely, it has been suggested that, approximately, 60% of liver fat is derived from circulating NEFA in individuals who eat a normal fat-containing diet [29]. Since MSG hypothalamic lesions did not enhance food consumption [18], but lead to obesity and insulin resistance in skeletal muscle and adipose tissue [31], this effect contributes to increase plasma NEFA levels, due to increased lipid release from adipose tissue, which enhances the FA

source to the liver.

Furthermore, reductions in hepatic FA β -oxidation also account for NAFLD [32]. Although CPT-1a mRNA was down-regulated in the liver of HyO rats, the hepatic CPT-1a protein was not changed indicating that a post-transcriptional modification occurs in the liver of these rodents. However, MTP mRNA, which encodes a protein that participates in the TG transfer to nascent apolipoprotein B to form very low-density lipoproteins [33], was down-regulated in HyO Sham rats, indicating possible impairment in hepatic TG export.

Previous observations, using diet-induced obesity in rodents, demonstrated that the DJB intervention is beneficial against liver fat deposition. At 8 weeks after the DJB operation, high-fat diet rats treated with streptozotocin presented reductions in ACC and FASN protein levels, which lowered hepatic TG accumulation [30]. In rats that consumed a western diet, DJB also decreased circulating and hepatic TG concentrations [16]. Although HyO rats displayed normal circulating TG and NEFA concentrations, the expression of hepatic lipogenic genes was not decreased, nor was the expression of β -oxidation mRNAs improved at 2 months after the DJB operation. Furthermore, FASN protein and ACC activation were higher in HyO DJB rats. This FA hepatic metabolic profile may contribute to maintain the higher TG deposition in the liver of HyO DJB rats. Conversely, the normalization of NEFA serum concentrations in HyO DJB rats may be due to the partial restoration of insulin action, as demonstrated by HOMA-IR values in these rodents, suggesting that the improved insulin action in adipose tissue can contribute to decrease lipolysis and improve FA utilization by peripheral tissues. Therefore, these data indicate that HyO pathophysiology differs from other types of obesity. As such, it is plausible that therapeutic strategies frequently used against to obesity, related to nutrition, do not provide full metabolic benefits in HyO patients.

In contrast, HyO rats were normoglycemic, despite the presence of a severe insulin resistance. Normoglycaemia in these rats was supported by hyperinsulinemia, provided by

insulin hypersecretion from the pancreatic β -cells. Similar features have been observed in HyO patients [6]. Hyperinsulinemia in hypothalamic lesions is frequently associated with the disruption of the autonomic nervous system (ANS) in HyO humans and experimental rodents [7, 9, 34-36]. The ANS dysfunction is characterized by a lower inhibitory sympathetic tone, associated with an augmented vagal parasympathetic signaling to the pancreatic β -cells. The acetylcholine released by the vagus nerve acts through muscarinic type 3 receptors increasing $[Ca^{2+}]_i$ and protein kinase C activation, which potentiate β -cell secretion [37]. Furthermore, higher parasympathetic activity enhances β -cell mass and secretion under normal and pathological conditions [38-40]. Accordingly, we recently demonstrated that HyO pancreatic islets present a higher β -cell number per islet, indicating that compensatory morphofunction alterations in the HyO pancreas are associated with enhanced islet-cell replication, induced by vagal hypertonia, since truncal vagotomy in HyO rats normalized β -cell amount per islet [21]. In addition, we also observed a higher number of Ki67-positive cells in the HyO endocrine pancreas, a marker of islet-cell proliferation, which accounted for the insulin hypersecretion from HyO islets. C57Bl/6 mice, submitted to a high-fat diet, are reported to show an expansion of their β -cell mass due to an increased β -cell proliferation rate during the first week of the diet and before the appearance of insulin resistance [4]. This early β -cell replication may occur due to increased parasympathetic activity, since the vagus nerve controls cellular proliferation. In VMH-lesioned rats, which developed hyperphagia and obesity, an increase in DNA synthesis in hepatocytes was observed at 1 day after the lesion, reaching maximum levels at 3 days after lesion [41]. VMH-lesioned rodents also showed hyperproliferation of cells in the gastrointestinal mucosa [42], and in the β and acinar cells of the pancreas [38]. This increased proliferation was inhibited by truncal vagotomy or by the administration of the cholinergic blocker, atropine [38, 41]. In fact, at 1 week after bilateral transection of the celiac branch of the vagus nerve, control Sprague-Dawley rats have been shown to present a 50%

reduction in β -cells [43].

The DJB operation, independently of changes in body adiposity, seems to be a good strategy to improve glucose homeostasis in pre-diabetic and diabetic experimental rodents and patients [15, 22]. However, the effects of DJB intervention upon the morphofunction of the endocrine pancreas are largely unknown. At 28 days after the DJB operation, high-fat diet mice did not present modifications in β -cell mass or β -cell proliferation [13]. The DJB operation increased the β -cell area and reduced islet fibrosis after 12 months, in nonobese diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats [14]. Our study is the first to demonstrate that DJB normalizes islet-cell proliferation rate in HyO DJB rats. This effect may contribute to the normalization of islet and β -cell percentage per pancreas section, and the β -cell number per islet in the HyO pancreas, restoring the β -cell secretory capacity.

The modifications in body glucose control and β -cell function that occur following bariatric operations are frequently associated with the secretion of gut hormones such as glucagon-like peptide (GLP)-1 and glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP) [14, 44]. These hormones potentiate glucose-induced insulin release (the so-called incretin effect) and regulate islet-cell survival [45, 46]. However, in GK rats, the improved glycemic control, seen at 1 month after the DJB surgery, was not accompanied by an increase in GLP-1, GIP and insulin plasma concentrations, after glucose intake [47]. As such, our results suggest that the benefits of bariatric surgeries upon endocrine pancreatic morphofunction may be linked to alterations in ANS function, normalizing sympathetic/parasympathetic actions upon pancreatic islets that restore islet-cell morphology and insulin secretion, improving the hyperinsulinism that caused the desensitization of the action of insulin in its target tissues [48].

Alterations in ANS function have been poorly investigated in bariatric surgeries. A reduced vagal innervation close to the proximal and distal stomach of high-fat diet mice,

submitted to Roux-en-Y gastric bypass (RYGB), was observed, without alterations in the density of vagal fiber innervation to the pancreas [49]. In accordance, lean Sprague-Dawley rats, submitted to RYGB, presented reduced activation of afferent and efferent fibers of the gastric vagal branches, which disconnects the vagal signaling from the stomach to the hindbrain [50]. Although alterations in gut-brain communication have been reported for procedures that differ from the DJB operation (as, for the RYGB, the stomach is transected transversely and both the ventral and the dorsal branches of the gastric vagus are transected), we speculate that the exclusion of the duodenum and jejunum from the nutrient transit might alter parasympathetic actions, resulting in a better parasympathetic/sympathetic communication to the pancreas and normalizing pancreatic islet morphofunction in HyO DJB rats.

In summary, our study is the first to show that, at 2 months after the DJB operation, HyO rats did not reduce hepatic TG accumulation due to the higher gene and protein expression of de novo lipogenic enzymes, together with reduced MTP mRNA, which probably impairs lipopolipoprotein assembly. However, the DJB operation presented benefits on endocrine pancreatic morphology in HyO rats, decreasing islet cell hyperplasia by reducing the cellular proliferation rate, which contributes to normalize insulin release, insulinemia and, partly, the action of insulin.

Conflicts of interest

All contributing authors declare that they have no conflicts of interest.

Statement of informed consent

This article does not contain any studies with human participants.

Statement of human and animal rights

All experiments were approved by the University's Committee on Ethics in Animal

Experimentation and all applicable institutional and/or national guidelines for the care and use of animals were followed.

References

1. Spellman CW. Islet cell dysfunction in progression to diabetes mellitus. *J Am Osteopath Assoc.* 2007;107 Suppl:S1-5.
2. Cassader M, Gambino R, Musso G, et al. Postprandial triglyceride-rich lipoprotein metabolism and insulin sensitivity in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Lipids,* 2001;36:1117-1124.
3. Seino S, Shibasaki T, Minami K. Dynamics of insulin secretion and the clinical implications for obesity and diabetes. *J Clin Invest.* 2011;121:2118-2125.
4. Stamateris RE, Sharma RB, Hollern DA, et al. Adaptive β -cell proliferation increases early in high-fat feeding in mice, concurrent with metabolic changes, with induction of islet cyclin D2 expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2013;305:E149-159.
5. Bingham NC, Rose SR, Inge TH. Bariatric surgery in hypothalamic obesity. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2012; 3:23.
6. Lustig RH, Rose SR, Burghen GA, et al. Hypothalamic obesity caused by cranial insult in children: altered glucose and insulin dynamics and reversal by a somatostatin agonist. *J Pediatr.* 1999;135:162-168.
7. Schöfl C, Schleth A, Berger D, et al. Sympathoadrenal counterregulation in patients with hypothalamic craniopharyngioma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87:624-629.
8. Adams LA, Feldstein A, Lindor KD, et al. Nonalcoholic fatty liver disease among patients with hypothalamic and pituitary dysfunction. *Hepatology.* 2004;39:909-914.
9. Roth CL, Hunneman DH, Gebhardt U, et al. Reduced sympathetic metabolites in urine of obese patients with craniopharyngioma. *Pediatr Res.* 2007;61:496-501.

10. Rabl C, Campos GM: The impact of bariatric surgery on nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis.* 2012;32:80-91.
11. Gatta B, Nunes ML, Bailacq-Auder C, et al. Is bariatric surgery really inefficient in hypothalamic obesity? *Clin Endocrinol (Oxf).* 2013;78:636-638.
12. Weismann D, Pelka T, Bender G, et al. Bariatric surgery for morbid obesity in craniopharyngioma. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2013;78:385-390.
13. Woods M, Lan Z, Li J, et al. Antidiabetic effects of duodenojejunal bypass in an experimental model of diabetes induced by a high-fat diet. *Br J Surg.* 2011;98:686-696.
14. Speck M, Cho YM, Asadi A, et al. Duodenal-jejunal bypass protects GK rats from β -cell loss and aggravation of hyperglycemia and increases enteroendocrine cells coexpressing GIP and GLP-1. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2011;300:E923-932.
15. Araujo AC, Bonfleur ML, Balbo SL, et al. Duodenal-jejunal bypass surgery enhances glucose tolerance and beta-cell function in Western diet obese rats. *Obes Surg.* 2012;22:819-826.
16. Ebertz CE, Bonfleur ML, Bertasso IM, et al. Duodenal jejunal bypass attenuates non-alcoholic fatty liver disease in western diet-obese rats. *Acta Cir Bras.* 2014;29:609-614.
17. Balbo SL, Bonfleur ML, Carneiro EM, et al. Parasympathetic activity changes insulin response to glucose and neurotransmitters. *Diabetes Metab.* 2002;28:3S13-17; discussion 13S108-112.
18. Nardelli TR, Ribeiro RA, Balbo SL, et al. Taurine prevents fat deposition and ameliorates plasma lipid profile in monosodium glutamate-obese rats. *Amino Acids.* 2011;41:901-908.
19. Ribeiro RA, Balbo SL, Roma LP, et al. Impaired muscarinic type 3 (M3) receptor/PKC and PKA pathways in islets from MSG-obese rats. *Mol Biol Rep.* 2013;40:4521-4528.
20. Bonfleur ML, Borck PC, Ribeiro RA, et al. Improvement in the expression of hepatic genes involved in fatty acid metabolism in obese rats supplemented with taurine. *Life Sci.*

2015;135:15-21.

21. Lubaczeuski C, Balbo SL, Ribeiro RA, et al. Vagotomy ameliorates islet morphofunction and body metabolic homeostasis in MSG-obese rats. *Braz J Med Biol Res.* 2015;48:447-457.

22. Bonfleur ML, Ribeiro RA, Pavanello A, et al. Duodenal-jejunal bypass restores insulin action and β -cell function in hypothalamic-obese rats. *Obes Surg.* 2015; 25:656-665.

23. Meguid MM, Ramos EJ, Suzuki S, et al. A surgical rat model of human Rouxen-Y gastric bypass. *J Gastrointest Surg.* 2004;8:621-630.

24. Bernardis LL, Patterson BD: Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *J Endocrinol.* 1968;40:527-528.

25. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem.* 1957;226:497-509.

26. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia.* 1985;28:412-419.

27. Ribeiro RA, Batista TM, Coelho FM, et al. Decreased β -cell insulin secretory function in aged rats due to impaired Ca^{2+} handling. *Exp Physiol.* 2012;97:1065-1073.

28. Hochberg I, Hochberg Z: Expanding the definition of hypothalamic obesity. *Obes Rev.* 2010;11:709-721.

29. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, et al. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest.* 2005;115:1343-1351.

30. Han H, Hu C, Wang L, et al. Duodenal-jejunal bypass surgery suppresses hepatic de novo lipogenesis and alleviates liver fat accumulation in a diabetic rat model. *Obes Surg.* 2014;24:2152-2160.

31. Hirata AE, Alvarez-Rojas F, Carvalheira JB, et al. Modulation of IR/PTP1B interaction

- and downstream signaling in insulin sensitive tissues of MSG-rats. *Life Sci.* 2003;73:1369-1381.
32. Xiao W, Ren M, Zhang C, et al. Amelioration of nonalcoholic fatty liver disease by hepatic stimulator substance via preservation of carnitine palmitoyl transferase-1 activity. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2015;309:C215-227.
33. Hussain MM, Nijstad N, Franceschini L. Regulation of microsomal triglyceride transfer protein. *Clin Lipidol.* 2011;6:293-303.
34. Lucinei Balbo S, Gravena C, Bonfleur ML, et al. Insulin secretion and acetylcholinesterase activity in monosodium l-glutamate-induced obese mice. *Horm Res.* 2000;54:186-191.
35. Paes AM, Carniatto SR, Francisco FA, et al. Acetylcholinesterase activity changes on visceral organs of VMH lesion-induced obese rats. *Int J Neurosci.* 2006;116:1295-1302.
36. Mitrani P, Srinivasan M, Dodds C, et al. Role of the autonomic nervous system in the development of hyperinsulinemia by high-carbohydrate formula feeding to neonatal rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007;292:E1069-1078.
37. Gilon P, Henquin JC. Mechanisms and physiological significance of the cholinergic control of pancreatic beta-cell function. *Endocr Rev.* 2001;22:565-604.
38. Kiba T, Tanaka K, Numata K, et al. Ventromedial hypothalamic lesion-induced vagal hyperactivity stimulates rat pancreatic cell proliferation. *Gastroenterology.* 1996;110:885-893.
39. Edvell A, Lindström P. Vagotomy in young obese hyperglycemic mice: effects on syndrome development and islet proliferation. *Am J Physiol.* 1998;274:E1034-1039.
40. Medina A, Yamada S, Hara A, et al. Involvement of the parasympathetic nervous system in the initiation of regeneration of pancreatic β -cells. *Endocr J.* 2013; 60:687-696.
41. Kiba T, Tanaka K, Endo O, et al. Role of vagus nerve in increased DNA synthesis after hypothalamic ventromedial lesions in rat liver. *Am J Physiol.* 1992;262:G483-487.

42. Kiba T, Tanaka K, Hoshino M, et al. Ventromedial hypothalamic lesions induce the proliferation of gastrointestinal mucosal cells in the rat. *Life Sci.* 1995;57:827-832.
43. Lausier J, Diaz WC, Roskens V, et al. Vagal control of pancreatic β -cell proliferation. *Am J Physiol Endocrinol Meta.* 2010;299:E786-793.
44. Strader AD, Vahl TP, Jandacek RJ, et al. Weight loss through ileal transposition is accompanied by increased ileal hormone secretion and synthesis in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005;288:E447-453.
45. Jhala US, Canettieri G, Sreaton RA, et al. cAMP promotes pancreatic beta-cell survival via CREB-mediated induction of IRS2. *Genes Dev.* 2003;17:1575-1580.
46. Todd JF, Bloom SR. Incretins and other peptides in the treatment of diabetes. *Diabet Med.* 2007;24:223-232.
47. Pacheco D, de Luis DA, Romero A, et al. The effects of duodenal-jejunal exclusion on hormonal regulation of glucose metabolism in Goto-Kakizaki rats. *Am J Surg.* 2007;194:221-224.
48. Cigolini M, Zancanaro C, Benati D, et al. Metformin enhances insulin binding to "in vitro" down regulated human fat cells. *Diabete Meta.* 1987;13:20-22.
49. Gautron L, Zechner JF, Aguirre V. Vagal innervation patterns following Rouxen-Y gastric bypass in the mouse. *Int J Obes (Lond).* 2013;37:1603-1607.
50. Ballsmider LA, Vaughn AC, David M, et al. Sleeve gastrectomy and Roux-en-Y gastric bypass alter the gut-brain communication. *Neural Plast.* 2015;2015:601985.

Figure legend

Figure 1: mean \pm sem (n = 13-16) of body weight in CTL, HYO sham and HYO DJB rats, recorded during 5 months. *HyO Sham and HyO DJB groups are different from CTL (One-way ANOVA followed by the Tukey post-test, $P < 0.05$).

Figure 2: LPK, ACC-1, FASN, SCD-1, ACO, CPT-1a and MTP mRNA contents in the livers of CTL, HyO Sham and HyO DJB rats. Mean \pm SEM, n= 5-8. Different letters over the bars indicate significant difference (One-way ANOVA followed by the Tukey post-test, $P < 0.05$).

Figure 3: Hepatic protein expressions of ACC (A), pACC^{Ser79}/ACC (B), FASN (C) and CPT-1a (D) in CTL, HyO Sham and HyO DJB rats. Data are means \pm SEM, n=5-8 rats. Different letters over the bars indicate significant difference (One-way ANOVA followed by the Tukey post-test, $P < 0.05$).

Figure 4: (A) Mean \pm SEM (n=8-14) of serum glucose, (B) insulin concentration, and (C) insulin sensitivity, measured by the HOMA-IR in fasted CTL, HyO Sham and HyO DJB rats. (D) Glucose-induced insulin secretion in islets isolated from CTL, HyO Sham and HyO DJB rats. Groups of 4 islets were incubated for 1 h in the presence of 5.6 or 8.3 mM glucose. Data are means \pm SEM obtained from 8-12 groups of islets in two independent experiments with 4 rats per group. Different letters over the bars indicate significant differences (One-way ANOVA followed by the Tukey post-test, $P < 0.05$).

Figure 5: (A) Representative images of pancreas sections stained for insulin or glucagon. (B) Islet, (C) β and (D) α -cell masses in the CTL, HyO Sham and HyO DJB pancreases. Data are means \pm SEM (n = 3-4). Different letters indicate significant difference (One-way ANOVA followed by the Tukey post-test, $P < 0.05$).

Figure 6: (A) Representative images of pancreas sections stained for Ki67. (B) % of Ki67 positive nucleus in the CTL, HyO Sham and HyO DJB pancreases. Data are means \pm SEM (n = 3-4). Different letters indicate significant difference (One-way ANOVA followed by the Tukey post-test, $P < 0.05$). The arrows represent the nucleus stained by Ki67.

Figure 1

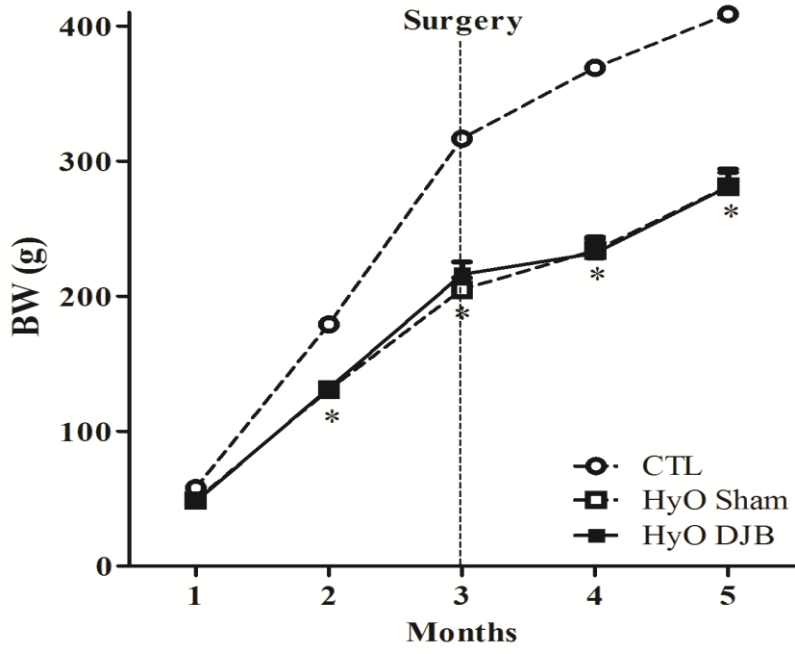


Figure 2

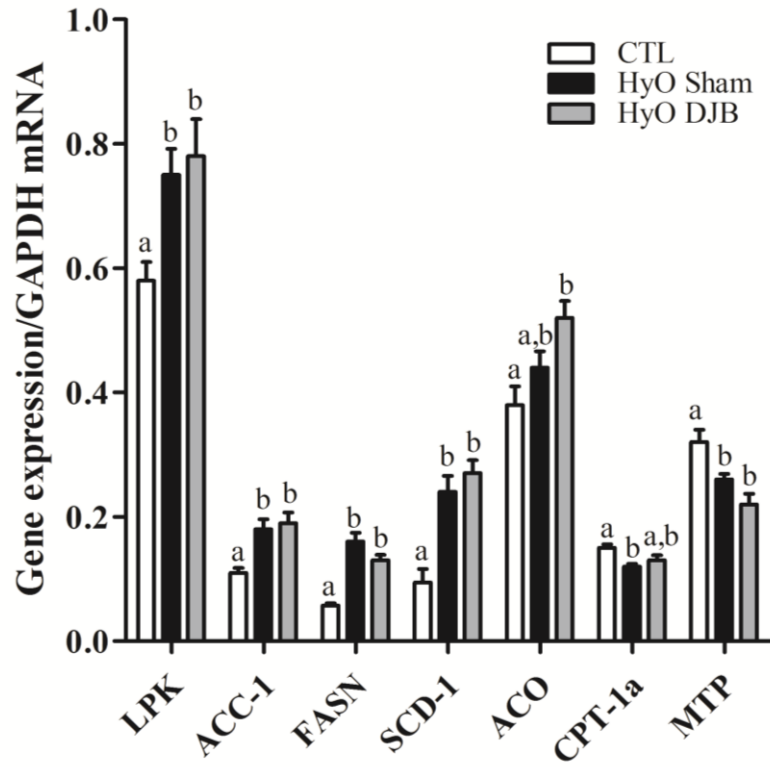


Figure 3

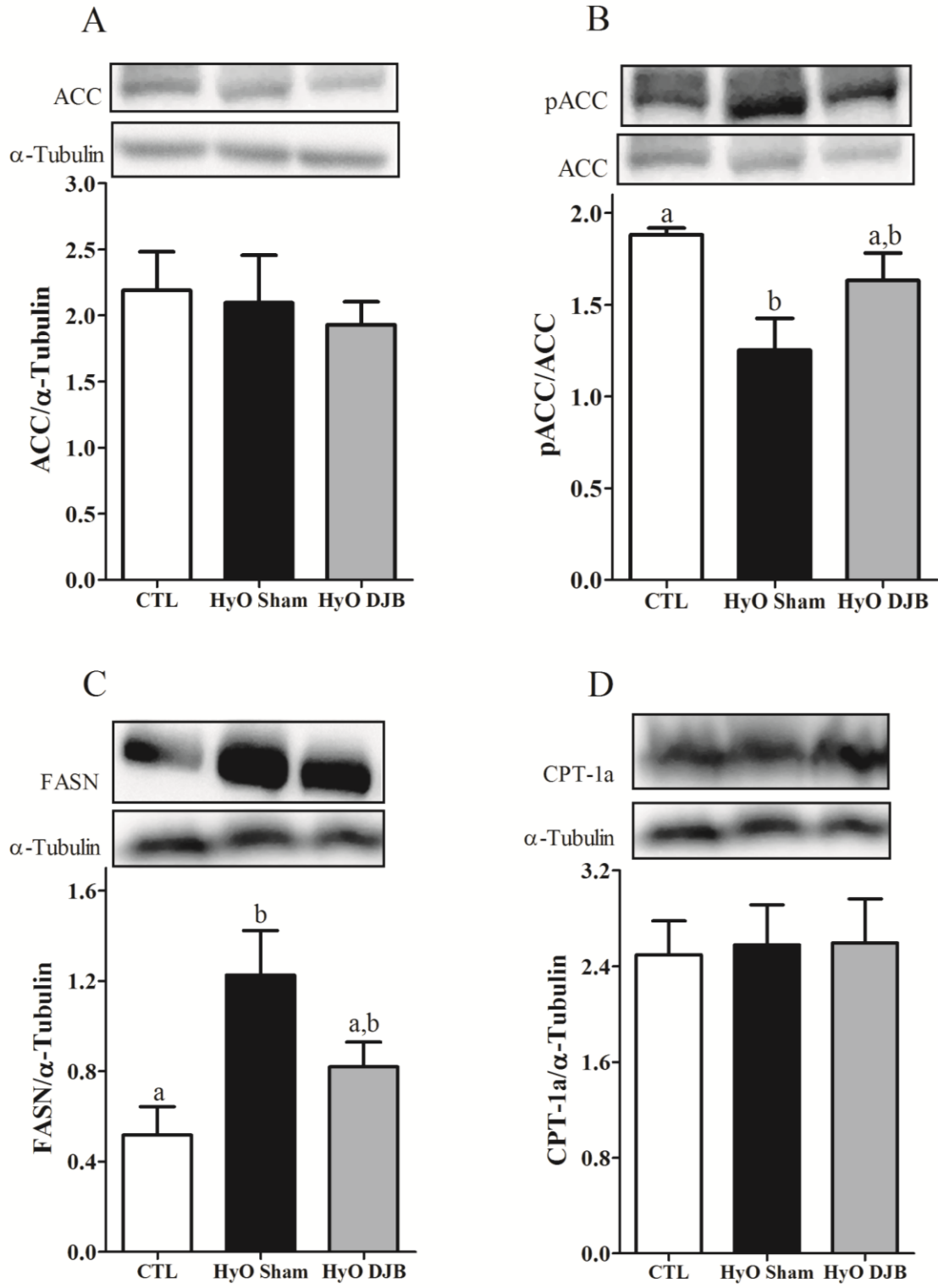


Figure 4

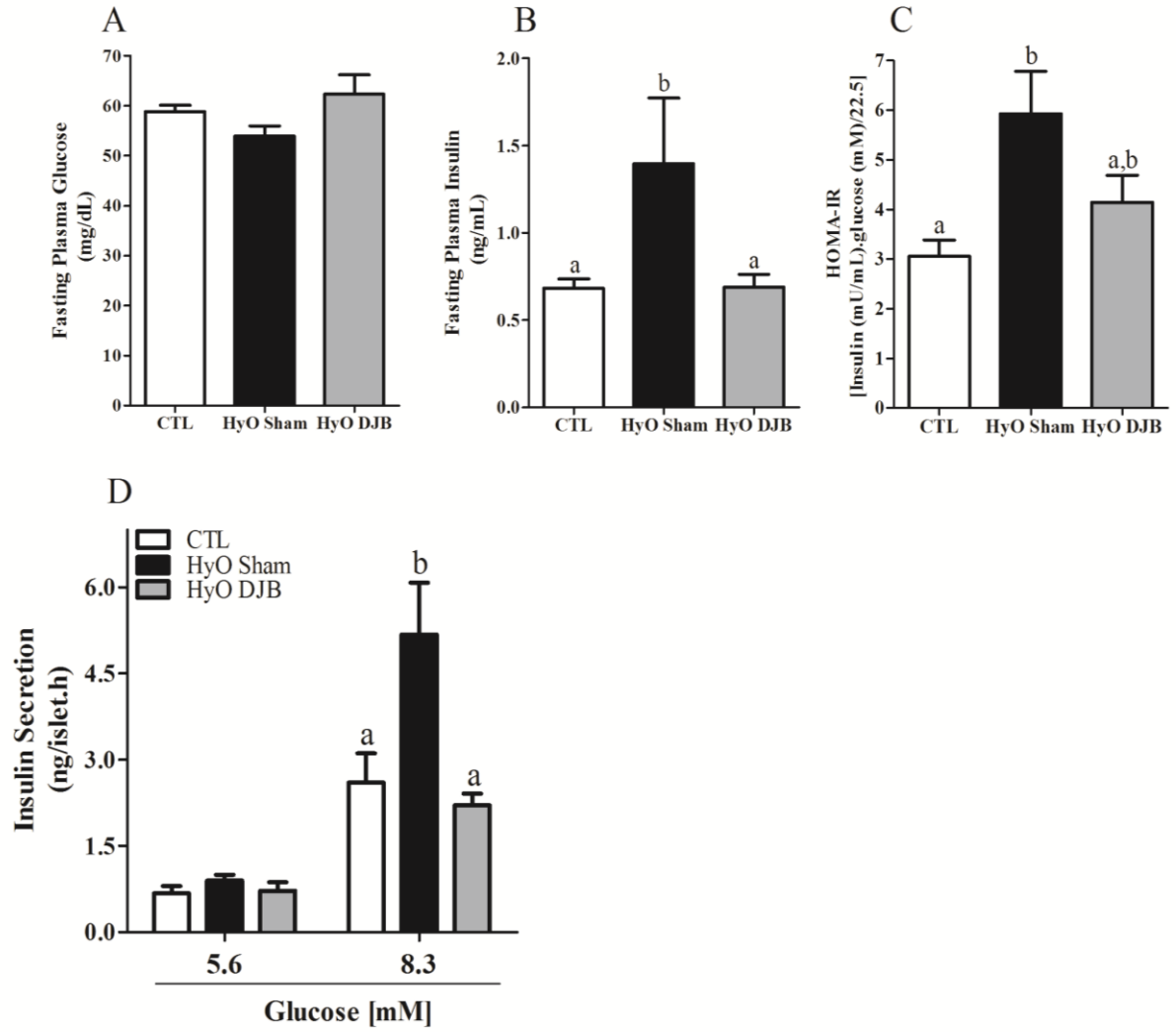


Figure 5

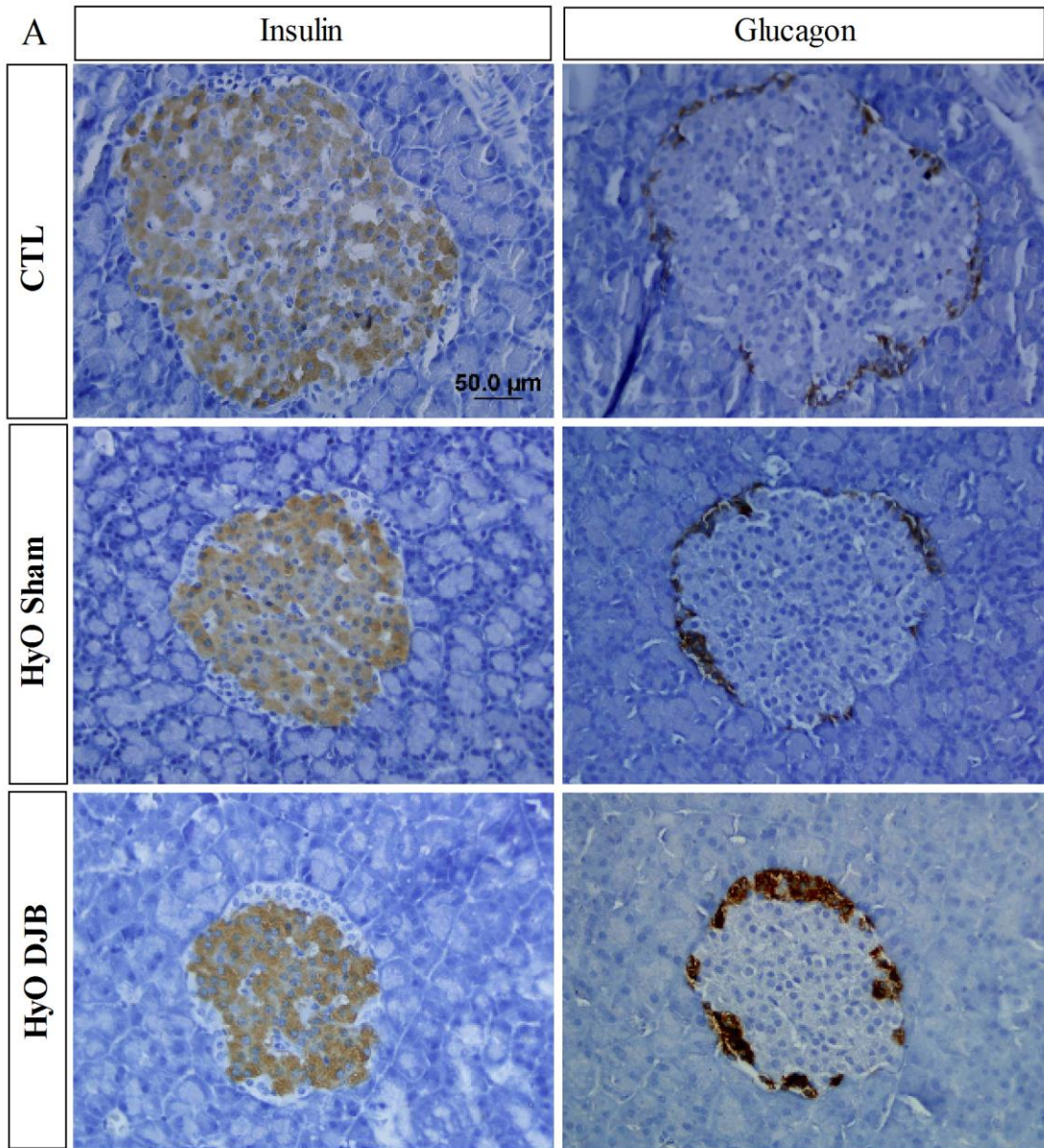
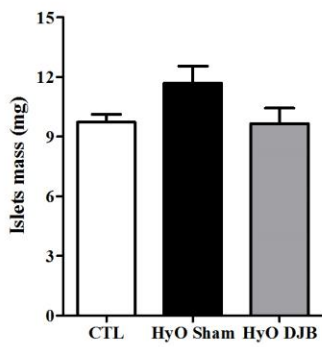
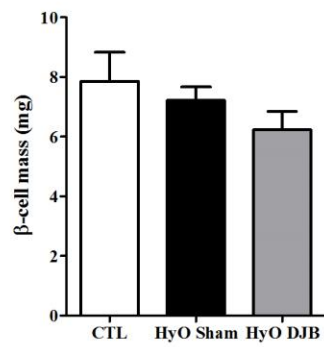
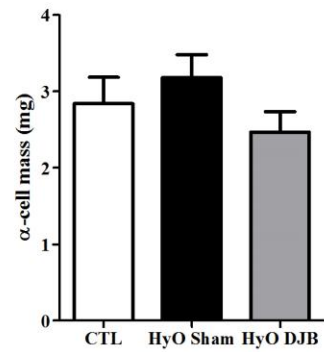
**B****C****D**

Figure 6

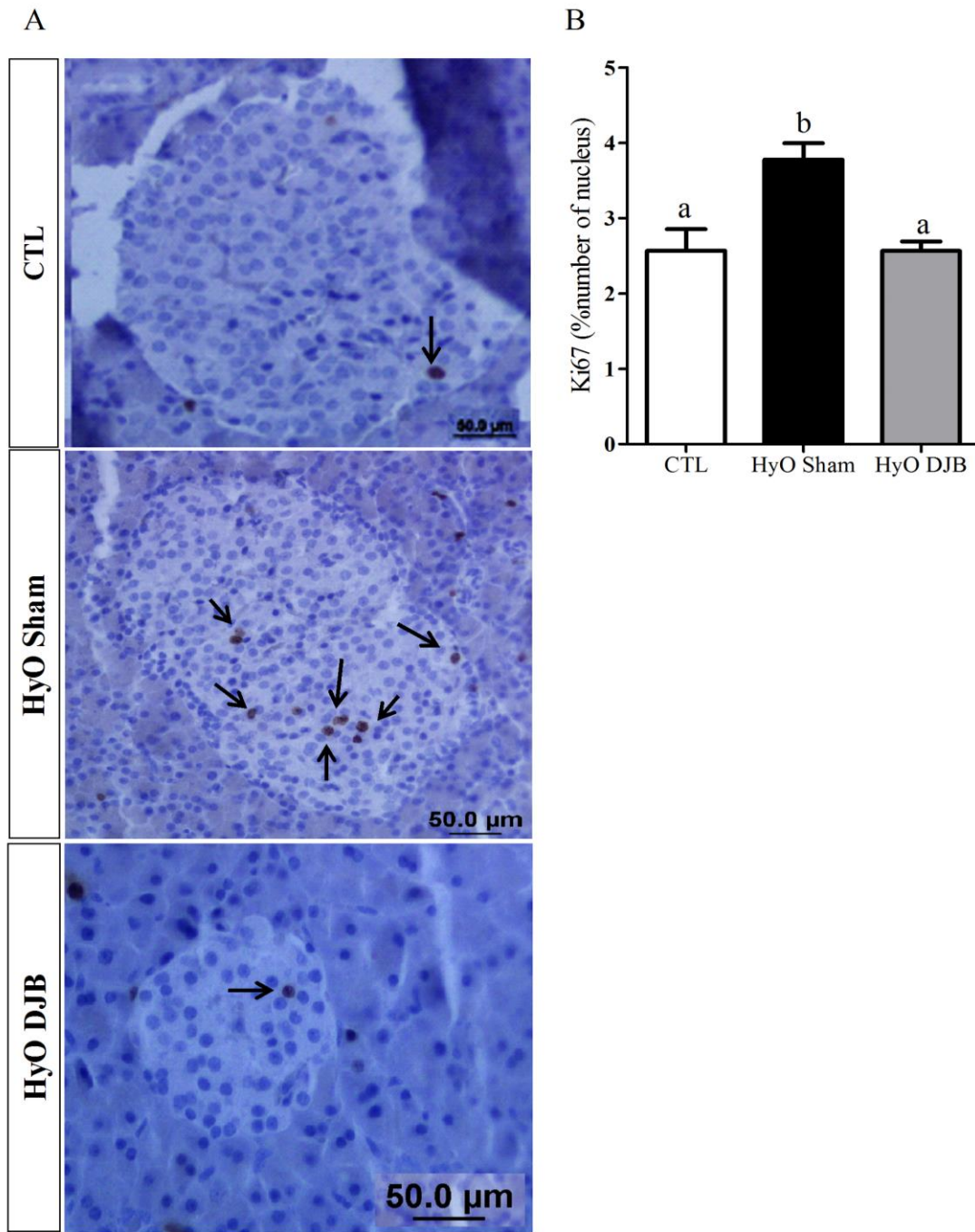


Table 1 - Obesity parameters in CTL, HyO Sham and HyO DJB rats.

	CTL	HyO Sham	HyO DJB
BW (g)	409 ± 5.2 ^a	286 ± 17.3 ^b	278 ± 14.9 ^b
Naso-anal length (cm)	21.2 ± 0.2 ^a	17.8 ± 0.4 ^b	18.3 ± 0.4 ^b
Lee index	350 ± 3.1 ^a	370 ± 4.7 ^b	366 ± 5.2 ^b
Retroperitoneal fat pad (% BW)	1.1 ± 0.1 ^a	1.8 ± 0.1 ^b	1.9 ± 0.1 ^b
Periepididimal fat pad (% BW)	1.3 ± 0.1 ^a	2.5 ± 0.2 ^b	2.3 ± 0.2 ^b

Data are mean ± SEM (n = 7-14). Different letters indicate significant difference. One-way ANOVA followed by Tukey post-test (P < 0.05).

Table 2 – Serum lipids parameters and TG liver content in CTL, HyO Sham and HyO DJB rats.

	CTL	HyO Sham	HyO DJB
Triglycerides (mg/dL)	117 ± 5.5 ^a	247 ± 8.0 ^b	142 ± 12 ^a
Total CHOL (mg/dL)	106 ± 3.6	107 ± 5.2	117 ± 9.5
NEFA (mEq/L)	0.68 ± 0.06 ^a	1.14 ± 0.09 ^b	0.87 ± 0.04 ^a
TG liver content (µg/mg liver)	5.0 ± 0.4 ^a	10 ± 0.8 ^b	7.5 ± 0.7 ^b

Data are means ± SEM (n = 6-10 rats). Different letters indicate significant difference. One-way ANOVA followed by Tukey post-test (P < 0.05).

Table 3: Morphometric analysis of the pancreas from CTL, HyO Sham and HyO DJB rats.

	CTL	HyO Sham	HyO DJB
Pancreas weight (% <i>BW</i>)	1.2 ± 0.08 ^a	0.8 ± 0.07 ^b	1.3 ± 0.07 ^a
Islets area (μm ²)	32384 ± 1569 ^a	22884 ± 887.3 ^b	19979 ± 1012 ^b
β-cell area (μm ²)	22466 ± 1068 ^a	15082 ± 570 ^b	13432 ± 683 ^b
α-cell area (μm ²)	6913 ± 532 ^a	5319 ± 292 ^b	4776 ± 340 ^b
Total islets area (% pancreas area)	0.9 ± 0.07 ^a	1.4 ± 0.02 ^b	0.7 ± 0.05 ^a
Total β-cell area (% pancreas area)	0.7 ± 0.07 ^a	1.0 ± 0.08 ^b	0.5 ± 0.05 ^a
Total α-cell area (% pancreas area)	0.3 ± 0.07	0.4 ± 0.05	0.2 ± 0.02
Islet number per section	159 ± 29	252 ± 51	150 ± 11
Number of islets analyzed	635	1007	598

Data are means ± SEM (n = 4). Different letters indicate significant difference One-way ANOVA followed by Tukey post-test (P < 0.05).

ANEXO A:

Parecer do comitê de ética animal



Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA

PARECER DE PROTOCOLO

O protocolo intitulado "Homeostase glicêmica e lipídica em ratos Wistar obesos - MSG submetidos à cirurgia bariátrica", sob vossa coordenação, foi avaliado pelo CEUA como **APROVADO** para execução.

ATENÇÃO!

O Certificado Experimental deste Protocolo, somente será emitido após o encerramento das atividades previstas e após o encaminhamento do Relatório Final ao CEUA. Este Parecer **NÃO** tem valor como Certificado Experimental.

Cascavel, 09/07/13

A handwritten signature in purple ink, appearing to read 'L. Fariña', is written over a faint circular stamp.

Profa. Dra. Luciana Oliveira de Fariña
Coordenadora do CEUA
Portaria nº 2861/2012-GRE

ANEXO B:
Normas da revista científica

OBESITY SURGERY

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

1. ABOUT OBSU

Obesity Surgery is published by Springer Science+Business Media LLC and is the official journal of the International Federation for the Surgery of Obesity and metabolic disorders (IFSO). Obesity Surgery publishes concise articles on Original Contributions, New Concepts, "How I Do It," Review Articles, Brief Communications, Letters to the Editor and dedicated Video Submissions. Requirements are in accordance with the "Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals," www.icmje.org. Articles that are accepted for publication are done so with the understanding that they, or their substantive contents, have not been and will not be submitted to any other publication.

2. IMPORTANT SUBMISSION INFORMATION

2a. SYSTEM REQUIREMENTS

Authors will need the following items in order to use Editorial Manager:

- Internet access
- A current Adobe Acrobat browser plug-in
- Electronic files of all required documents for upload.

2b. YOUR AUTHOR ACCOUNT

Authors entering the journal's Editorial Manager site for the first time can create a new account at <http://www.edmgr.com/obsu/> by clicking "Login" at the top of the screen, and "Register Now" at the next screen, and then following the online prompts in order to create your account and submit a manuscript. NOTE: If you have previously logged into the system, you should Always use your existing account for ALL subsequent submissions. If you have forgotten your Username or Password, you may use the "Send Username/Password" link at the OBSU Log In Page.

2c. ONLINE SUBMISSION

After you have logged into your account and entered your Submission Center, Editorial Manager will lead you through a step-by-step submission process. When submitting your manuscript through Editorial Manager, you will navigate through nine (9) submission steps. The required documents for all online submissions include the main Manuscript document, and a Conflict of Interest (COI) form, which should be completed by each contributing author.

Note: Always keep copies of your word-processing, graphics, video and COI files. You may want to revise the manuscript text, figures or forms after the review process and you will need the original files if your manuscript requires revisions. Please make sure that all required online fields are completed before attempting to submit. If you cannot finish your submission in one visit, you can save a draft and later re-enter the process at the same step by clicking on the “Incomplete Submissions” link in your Author Main Menu.

3. MANUSCRIPT PREPARATION

3a. MANUSCRIPT SECTIONS AND FILE ITEMS

When you upload your manuscript documents to OBSU, the system will ask you to indicate the manuscript file “Item.” Your manuscript should be submitted in various parts; for example, your item, “Manuscript” should be uploaded separately from the item, “Official Conflict of Interest Form.” Images should be submitted separately, as should any electronic supplementary material (or “Other”) and videos (either as supplementary videos or as dedicated video submissions). Please use the following format guidelines.

- Use a normal, plain font (e.g., 12-point Times Roman) for text.
- Double-space the text, and set page borders at one inch.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents; do not use the space bar for indents.

i. File Item: “Manuscript” (required)

In the “Attach Files” step (final step) of your submission, the file item “Manuscript” should include a Title Page, the Main Text (which should include a Conflict of Interest Disclosure Statement), References, and Figure Legends (if any). Tables may also be included at the end of this document, or submitted separately under the File Item, “Table.”

Title Page. This should include:

- The title of the article.
- The manuscript type.
- The complete names and academic degrees for each contributing author (first name, middle initial[s], surname, degree[s]).

- The departmental and institutional affiliations with complete street or mailing addresses and email addresses for each contributing author. Include the city, state or province, and country where the work was performed.
- "Correspondence to" followed by the name and contact information for the corresponding author.
- A shortened title for use as a running head (not to exceed 30 characters in length, including spaces between words).
- At the bottom of the page, any detailed grant information, and an acknowledgment of grant support.
- Acknowledgments: Individuals, other than authors, who were of direct help in the reported work should be acknowledged by a brief statement. Each acknowledged person should give their written consent to be named in the manuscript.

Main Text. The main text document for most submissions should include:

- Abstract (not required for Letters)
- Introduction/Purpose
- Materials and Methods
- Results
- Conclusion
- Conflict of Interest Disclosure Statement (see details below)
- References (see details below)
- If separate figures are provided, then a Figure Legend should be included in the main text document after the References.
- Any Tables that you provide should be included at the end of the text.

Additional format requirements and details for specific manuscript types are included in the "3b. MANUSCRIPT TYPES AND FORMATS" section below.

Conflict of Interest Disclosure Statement (in Text).

A Conflict of Interest disclosure statement is required to be included for each author within the manuscript text, and should be located just before the list of References. For each author, the statement must declare the potential conflict of interest, or "no conflict of interest."

Note: The details provided in the COI Disclosure Statement within the manuscript text must correspond with the information provided in the required author ICMJE COI forms.

Potential conflicts of interest do not imply impropriety but could either directly or indirectly, purposely or inadvertently affect the conduct, outcome, or reporting of any scholarly activity. Potential conflicts of interest exist when an author is related to a forprofit company or institution in any of the following ways:

1. Employment
2. Consultancies in the last 3 years (please list)
3. Honoraria in the last 3 years (please list)
4. Stock ownership/ options other than mutual funds (current; please list)
5. Expert testimony in the last 3 years (please list)
6. Grants received in the last 3 years (please list)
7. Grants pending (please list)
8. Patents received
9. Patents pending
10. Royalties (describe)
11. Other relationships (please specify)

References

For the references, please:

- Use Medline®/Pubmed® Style.
- Type references double-spaced and list them in consecutive, numerical order as they appear in the text (not alphabetically).
- Identify reference citations in the text by numbers in square brackets (e.g., [1]). Once a reference is cited, all subsequent citations should be to the original number.
- Cite all references within the text or tables.
- Papers that have been accepted for publication or are in press may be listed in the References, but the Journal does not reference unpublished data and personal communications.
- If several references are available on the same subject, cite only the most recent and pertinent, giving preference to original articles over review articles or textbooks.

Journal Articles

Journal articles should be cited according to the Medline®/Pubmed® Journal Article Citation Format. An example follows:

Lee MJ, Fanelli F, Haage P, Hausegger K, Van Lienden KP. Patient safety in interventional radiology: a CIRSE IR checklist. *Cardiovasc Intervent Radiol*. 2012 Apr;35(2):244-6. Epub 2011 Oct 20. PMID: 22011783

Books and Other Published Material

For citation format examples of books, other monographs, other published material, and electronic material, please visit http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Tables

- Any tables included in the manuscript should be provided as follows.
- Use the table function (not spreadsheets) to make tables.
- Number all tables using Arabic numerals.
- Always cite tables in the text in consecutive, numerical order.
- For each table, please supply a table heading. The table title should explain clearly and concisely the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table heading.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.
- All tables should be supplied on a separate page at the end of the main document and have callouts in the text.

ii. File Item: “Official Conflict of Interest Form(s)” – (required)

Every contributing author must complete the official ICMJE Conflict of Interest (COI) form, which is available by clicking the “Conflict of Interest Form” link in the “For Authors and Editors” section of the Springer page at www.springer.com/11695, or by directly visiting http://www.icmje.org/coi_disclosure.pdf. No hand-written information is required in this form. A completed, submitted form from each author is required for

our records. The form(s) will not appear as part of the manuscript for review. The corresponding/submitting author is responsible for collecting ALL participating authors' completed ICMJE COI forms and uploading them with the manuscript submission. It is recommended that each ICMJE COI form be saved and renamed as the author's name. If any contributing author's COI form is incomplete or missing from the submission, the submission will be returned to the author for correction prior to review. Each author must complete the form even if no conflict of interest exists.

Note: Details provided in the ICMJE COI forms must correspond with the required COI Disclosure Statement that the authors include in the manuscript text.

iii. File Item: "Figure" (optional)

Along with uploading main text document, you can also upload separate figure and graphic image documents. Common graphics files such as GIF, JPEG, EPS, TIFF and many others are supported. Please do not upload figures as PDF files, or in PowerPoint; we also recommend that figures not be embedded in the main text of your article. For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, TIFF format is preferred. Very large figure files should be compressed as much as possible before uploading figures to the website. If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions. All figures are to be numbered using Arabic numerals. Figure parts should be denoted by lowercase letters. Figures should always be cited in text in consecutive numerical order. For each figure, include the figure legends at the end of the manuscript text. Make sure to identify all elements found in the figure in the caption. Photographs of patients in which the subject is identifiable must either have the face masked out, or be accompanied by written permission from the individual in the photograph for publication.

Image Size

- Actual size of submitted image(s) should be as follows:
- Width: 39 mm, 84 mm, 129 mm or 174 mm wide.
- Height: No higher than 234 mm.
- The following open source image-conversion software is available in Mac and Windows format to assist you in standardizing your images:
 - GraphicsMagick - www.graphicsmagick.org
 - Image Magick - www.imagemagick.org

- Xn Convert - www.xnconvert.com

For detailed submission guidelines regarding Line Art, Halftone Art, Combination Art, Color Art, and other artwork details, please click here: [ARTWORK INSTRUCTIONS](#).

iv. File Item: “Other” (optional)

If you want to provide a file with your submission that does not fit any of the above file designations, you may submit it under “Other.”

v. File Item: “Multimedia Article (video)” (optional)

We invite contributing authors to publish additional, article-related materials on the website that complement and reinforce information published in the print journal, as well as dedicated Multimedia articles. If any multimedia is submitted, it will be reviewed along with the submission, and if accepted will be published as received from the author in the online version only. All standard instructions for manuscript and video submission should be followed (see “Videos” below).

Multimedia Articles may consist of:

- Information that cannot be printed: animations, video clips, sound recordings.
- Information that is more convenient in electronic form: sequences, spectral data, etc.
- Large original data, e.g. additional tables, illustrations, etc.
- If supplying any multimedia, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables (e.g., “. . . as shown in Animation 3.”)

Supplementary Videos

Upon submission of articles that include supplementary video, the author(s) will be required to submit the video according to the following specifications:

- To accommodate user downloads, keep to the recommended upper limit for the size of the different file types. Larger-sized files may require very long download times, and some users may experience other problems during downloading.
- Video clips should not exceed one minute or 2MB. Anything exceeding 1 minute must be submitted in separate videos.
- Always use either .mp4 or .mov files.

- The content of these files must be identical to that reviewed and accepted by the editor-in-chief.
- All narration should be in English.

Note: For any articles already published on Springer.com, authors may submit follow-up or supplementary videos related to the article via [videos.springer.com](https://www.springer.com/videos).

Dedicated Video Submissions

Upon submission of dedicated video submissions, author(s) will be required to submit the video according to the following specifications:

- Always use either .mp4 or .mov files.
- Please note that larger-sized files may take extra time to upload, and may require very long download times for reviewers and other users; some users may experience other problems during downloading, so please make sure to consider the optimal size of your video when submitting it.
- Dedicated video submissions should not exceed 10 minutes in duration. Invited videos or contributions with specific topics may be longer (at the discretion of the editors).
- Narration of the procedure is required; all narration should be in English.
- An Abstract of up to 500 words in Word or RTF must be provided along with the video. It should contain the title; authors and affiliations; a conflict of interest statement as described above, and a structured Abstract that includes an introduction (including a description of the video and the run-time), materials and methods, results and conclusions, and references.
- If applicable, provide references (as detailed above) at the end of the Abstract.

3b. MANUSCRIPT TYPES AND FORMATS

The manuscript types for submission include Review Articles, Brief Communications, New Concepts, How I Do It, Original Contributions, Letters, and Video Submissions. Each of these manuscript types requires a specific format. You may submit your manuscript in either Format I or Format II, as detailed below. Please type all manuscript text (including references) double-spaced with one-inch wide margins. Number the pages consecutively and organize the manuscript in the order indicated below.

i. Manuscript Format I (Full Articles)

- Original Contribution
- New Concept
- How I Do It

Format: The main body text in Original Contributions, New Concepts, and “How I Do It” submissions, is limited to eight double-spaced, typewritten pages (2,400 words, excluding references, figure legends and Abstract), and up to six figures/images. The following format should be followed:

Title Page

Manuscript Text For Review

- Abstract - The Abstract in full manuscripts must not exceed 250 words, and should consist of five (5) structured paragraphs: Introduction/Purpose, Materials and Methods, Results, and Conclusion.

- Key Words

- Introduction/Purpose - Should convey the background and purpose of the report.

- Materials and Methods, Results, and Discussion - Should follow the Introduction.

When required by the nature of the report, manuscripts that do not follow this specific format may be accepted. Please include a statement in the Methods section indicating approval (or exemption) by your Institutional Review Board for the conduct of your research.

- Conflict of Interest Disclosure Statement – Is required to be included within the manuscript text for each author, and should be located just before the list of References.

- References (not included in word count).

- Tables (not included in word count), Figures (Illustrations) - Submitted separately from the main text.

Official ICMJE Conflict of Interest forms - Must be completed and submitted from each contributing author, and are not viewable to reviewers.

ii. Manuscript Format II

- Review

- Brief Communication

- Letter Manuscripts submitted as Review Articles, Brief Communications, and Letters to the Editor should be in accordance with the following conventions. Other

invited submissions not mentioned here may also require certain formats, which would be clarified upon invitation.

REVIEW ARTICLES

Format: The main body text in a Review Article is generally limited to ten double-spaced, typewritten pages (3,000 words, excluding references, figure legends and Abstract), and up to six figures/images. It should include a one-paragraph Abstract, not to exceed 125 words. Review Articles are usually invited submissions dealing with current topics. However, non-invited review articles may also be considered and are subject to the same review process as original articles.

BRIEF COMMUNICATIONS

Format: The main body text in a Brief Communication is limited to six double-spaced, typewritten pages (1,800 words, excluding references and figure legends), and up to two figures/images. Aim to limit the total number of references in Brief Communications to a maximum of twenty (20). Brief Communications are descriptions of focused studies with important, but very straightforward results. An Abstract is optional; if included, it should not exceed 150 words. The order of presentation is Background, Methods, Results and Conclusion, followed by references, tables, and legends.

LETTERS TO THE EDITOR

Format: Letters to the Editor should be no more than four double-spaced, typewritten pages (1,200 words), with up to three illustrations, and limited references. No Abstract is required. Letters are unstructured communications, in letter format. The editors reserve the right to accept, reject or excerpt letters without changing the views expressed by the author.

iii. Manuscript Format III

- Video Submissions

Manuscripts submitted as dedicated Video Submissions must be accompanied by a textual Abstract document of up to 250 words, which briefly describes the video.

3c. ADDITIONAL SUBMISSION DETAILS

i. Language Editing Services

If you would like your manuscript language edited by a scientific expert before submission or upon revision, Springer recommends using Edanz Group. Edanz provides scientific editing and related services that raise the quality of manuscripts to the standard necessary for ease of peer review. As the only international editing service centralized in China and Japan, Edanz understands the publication challenges faced by scientists whose first language is not English. For more information and a price quotation, please contact: <http://www.edanzediting.com/springer>

ii. Special Characters

The Journal does not assume responsibility for errors in conversion of customized software, newly released software, and special characters. Please indicate any special characters used in the file (e.g., Greek, math symbols) by using a symbol code (e.g., <ga> for Greek alpha), and defining these codes at the end of your paper.

iii. Abbreviations, Drug Names, Digits

Please use the standard abbreviations and units listed in *Scientific Style and Format: The CBE Manual for Authors, Editors, and Publishers, Sixth Edition* (Reston, Va., Council of Biology Editors, 1994). The first time an uncommon abbreviation appears in the text, it should be preceded by the full name for which it stands. Generic names for drugs and chemicals should be used the first time the drug or chemical is mentioned in the text and, preferably, thereafter. If an author wishes, the trade name may be inserted in parentheses following the generic name the first time the generic name appears, and the manufacturer name and city should also be included. Please express digits as numerals except when they are the first word in a sentence, and decimals should be written in North American format. Express units of measurement in the metric system whenever possible, and abbreviate them when used with numbers.

iv. Permissions

If you use text passages, illustrations, or tables from other works, you must in each case obtain permission from the copyright holder for both the print and the online

format. A written statement must accompany materials that are taken from other sources and included in the submitted manuscript. Please be informed that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred in order to receive these permissions from other publishers. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free. In these cases we kindly ask you to use figures from other sources. To access the Rights and Permissions Instructions, go to: <http://www.springer.com/rights?SGWID=0-122-12-372399-0>

v. Statement of Human and Animal Rights

When reporting experiments on human subjects, authors should indicate whether the procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional and national) and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2000. If doubt exists whether the research was conducted in accordance with the Helsinki Declaration, the authors must explain the rationale for their approach, and demonstrate that the institutional review body explicitly approved the doubtful aspects of the study. When reporting experiments on animals, authors should be asked to indicate whether the institutional and national guide for the care and use of laboratory animals was followed.

vi. Statement of Informed Consent

Patients have a right to privacy that should not be infringed without informed consent. Identifying information, including patients' names, initials, or hospital numbers, should not be published in written descriptions, photographs, and pedigrees unless the information is essential for scientific purposes and the patient (or parent or guardian) gives written informed consent for publication. Informed consent for this purpose requires that a patient who is identifiable be shown the manuscript to be published. Authors should identify Individuals who provide writing assistance and disclose the funding source for this assistance. Identifying details should be omitted if they are not essential. Complete anonymity is difficult to achieve, however, and informed consent should be obtained if there is any doubt. For example, masking the eye region in photographs of patients is inadequate protection of anonymity. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic pedigrees, authors should provide assurance that alterations do not distort scientific meaning and editors should so note.

vii. Other Required Forms

Copyright forms and color publication payment details are now handled online after an accepted article is accepted for publication. When proofs are ready for viewing, the author is contacted via e-mail by the typesetter, and sent a website address that will provide the author with forms/orders/proofs procedures.

viii. Note regarding plagiarism and self-plagiarism:

Manuscripts are evaluated via iThenticate for signs of any potential plagiarism. For information on the concept of self-plagiarism, visit the following online link: www.ithenticate.com/self-plagiarism-free-white-paper/

4. MANUSCRIPT SUBMISSION**4a. SUBMISSION STEPS****i. Submission Checklist**

Please view a copy of the SUBMISSION CHECKLIST here. We recommend that you have all items listed in the checklist complete and ready for upload before starting your online submission.

ii. Review Your Submission

After uploading the files for your submission, the system will convert the files to PDF. You will see the result of the conversion with the Acrobat plug-in in your browser. Make sure to review the PDF of your submission before you confirm your submission. Once you have reviewed your PDF document for completeness, click "Submit" and all contributing authors will receive an emailed confirmation. After the manuscript is submitted, the Editors will inspect the submission before assigning reviewers. If any part of the manuscript is not complete, the manuscript will be unsubmitted and returned to your Submission Center, with an e-mail notification sent to the authors indicating the need for additional information and/or correction. Once a complete manuscript is correctly submitted, the OBSU editors will assign reviewers to your submission.

4b. KEEPING TRACK

After submission, you may monitor the progress of your submission through the review process. Only the submitting author can view the submission. In order to view

your submission details and current status, you must enter the same User Name and Password that you originally used to submit your manuscript.

4c. EDITORIAL REVIEW AND ACTION

The editorial staff will examine submitted manuscripts for accuracy and completeness, and will customarily send initial manuscript submissions to two or three reviewers, depending on the manuscript type. We aim for quick reviewer turnaround times, and rely on the promptness and thoroughness of our volunteer reviewers and Editors. Authors will be notified as to the acceptability of a manuscript as rapidly as possible. The decision categories are: Accept; Immediate Reject; Reject (after review); Accept Pending Minor Revisions, and Reject but Encourage Resubmission After Major Revisions. Suggestion for resubmission does not guarantee acceptance upon resubmission. If the manuscript is accepted pending minor revisions, or suggested for resubmission after major revisions, we emphasize the importance of authors providing their revisions as promptly as possible, and providing a point-by-point reply to all reviewer comments. The annotated version of the revised manuscript should identify all changes and include each reviewer point in parentheses, e.g., "(Reviewer 1, Comment 2)."

5. AFTER ACCEPTANCE

If your article is accepted, you will receive a link to the special Springer web page with questions related to:

5a. AUTHOR PROOFS

After a submission is accepted and processed, the author will receive e-mailed notification from the Production Office, and a proof of the article is made available to the author. You should check the proof for typesetting errors, completeness, and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor. Any such changes would require a written request and written approval/agreement from all contributing authors to the Editorial Office and to Production for their consideration. The article will be published online after receipt of the corrected proofs. Online publication is the official first publication of the article, and citable with the DOI. After online publication, further changes can only be made

in the form of an Erratum, which would be hyperlinked to the article. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

5b. OPEN CHOICE

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer now provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink. We regret that Springer Open Choice cannot be ordered for published articles. Please go to: <http://springer.com/openchoice> or click on the link below for more information.

OPEN CHOICE

5c. PUBLICATION OF COLOR FIGURES

Color figures may be used without charge for the electronic version of the journal that is published online via SpringerLink. However, color figures will appear in the print version of the Journal at the author's expense at \$1,150 per article. You may provide your choice at the Springer web page.

5d. OFFPRINTS/ REPRINTS

Can be ordered via the Springer web page.

6. SUPPORT AND ASSISTANCE

When entering your data during the submission process, support for special text characters is available. If you have questions at any point during your submission process, or you need assistance submitting your manuscript online, please contact the OBSU Managing Editor:

ATTN: Deana Rodriguez

Managing Editor, OBSU Editorial Office

Phone: +001 (562) 961-9928

E-mail: obsu.rodriquez@gmail.com

SUBMISSION CHECKLIST

Authors: Make sure that all of the items below are ready and available for Step 6, "File Upload."

TITLE PAGE REQUIRES:

- Full Title
- All Contributing Authors, Full Names/Degrees
- All Author Email Addresses/Affiliations
- "Correspond To" Information
- Short Title for Running Head
- Detailed Acknowledgments and Grant Information

MAIN MANUSCRIPT TEXT REQUIRES:

- Text
- Abstract (N/A for Letters to the Editor; optional for Brief Communications)
- Required Ethical, COI, and Human/Animal Rights Statements
- References in PubMed style
- Tables (Optional)
- Figure Legends (if providing figures)

FIGURES/IMAGES:

- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, use TIFF format. MS Office files are also acceptable
- Figure width should be 39 mm, 84 mm, 129 mm or 174 mm, and no higher than 234 mm
- No identifying information about patients
- Patient and/or publisher permissions, if needed

VIDEO/ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL:

- Any Video or multimedia in either .MP4 or .MOV file format
- Supplementary videos not to exceed 2 MB in size
- Narration in English

REQUIRED OFFICIAL ICMJE CONFLICT OF INTEREST FORM(S):

- One form completed by each author (ex: 5 authors = 5 forms)

REQUIRED FOR REVISIONS ONLY:

- One copy of clean, revised text, tables and figures
- One copy of annotated, revised text, tables and figures