



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

CARLOS EDUARDO SOARES DE MACEDO

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GENÉTICA DO TCF7L2
APÓS CIRURGIA BARIÁTRICA

RECIFE/PE
2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

CARLOS EDUARDO SOARES DE MACEDO

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GENÉTICA DO TCF7L2 APÓS CIRURGIA BARIÁTRICA

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Cirurgia.

Orientador

Dr. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz

PROF. DR. ASSOCIADO DE CIRURGIA, CCS-UFPE

Co-orientadora

Dra. Danyelly Bruneska Gondim Martins

Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami, UFPE

Linha de pesquisa

Bases Fisiopatológicas do tratamento cirúrgico da
obesidade mórbida e da síndrome metabólica

RECIFE/PE
2015

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4 - 1010

M141a Macedo, Carlos Eduardo Soares de.
 Avaliação da expressão genética do TCF7L2 após cirurgia bariátrica /
Carlos Eduardo Soares de Macedo. – Recife: O autor, 2015.
 58 f.: il.; tab.; gráf.; 30 cm.

 Orientador: Álvaro Antônio Bandeira Ferraz.
 Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
 Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, 2015.
 Inclui referências, apêndices e anexos.

 1. Cirurgia bariátrica. 2. Diabetes mellitus tipo 2. 3. Derivação gástrica.
 4. Expressão gênica. 5. Genômica. I. Ferraz, Álvaro Antônio Bandeira
 (Orientador). II. Título.

617.91

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2015-053)

**“ALTERAÇÃO NA EXPRESSÃO DO TCF7L2 APÓS CIRURGIA
BARIÁTRICA”**

CARLOS EDUARDO SOARES DE MACEDO

APROVADA EM: 23/02/2015

ORIENTADOR INTERNO: **Dr. ÁLVARO ANTÔNIO BANDEIRA FERRAZ**

COMISSÃO EXAMINADORA:

PROF. Dr. JOSEMBERG MARINS CAMPOS (PRESIDENTE) – CCS/UFPE

PROF. Dr. LÚCIO VILAR RABELO FILHO – CCS/UFPE

PROF. Dr. EUCLIDES DIAS MARTINS FILHO – CCS/UFPE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

REITOR

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Sílvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Francisco de Sousa Ramos

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIRETOR

Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

DIRETOR SUPERINTENDENTE

Prof. Frederico Jorge Ribeiro

DEPARTAMENTO DE CIRURGIA

CHEFE

Prof. Saulo Monteiro dos Santos

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

NÍVEL MESTRADO E DOUTORADO

COORDENADOR

Prof. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz

VICE-COORDENADOR

Prof. Josemberg Marins Campos

CORPO DOCENTE

Prof. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz

Prof. Carlos Teixeira Brandt

Prof. Fernando Ribeiro de Moraes Neto

Prof. José Lamartine de Andrade Aguiar

Prof. Josemberg Marins Campos

Prof. Lúcio Vilar Rabelo Filho

Profa. Magdala de Araújo Novaes

Prof. Rodrigo Pessoa Cavalcanti Lira

Prof. Salvador Vilar Correia Lima

Prof. Sílvio Caldas Neto

Dedico essa conquista aos meus pais, Elias Soares de Macedo e Maria do Socorro Soares de Macedo, pelo suporte constante nos momentos cruciais de minha vida e que, a despeito de uma vida humilde e sofrida, sempre me motivaram a acreditar que os estudos podem transformar nosso futuro.

A minha noiva, Natália da Silva Lira, pelo amor, compreensão e companheirismo sempre presentes desde que nos conhecemos.

.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Álvaro Ferraz pela disponibilidade, cordialidade, dedicação ao ensino e disponibilidade para dirimir dúvidas e sugerir mudanças necessárias.

Aos estudantes e residentes, particularmente Guilherme da Conti e Malu Rosa, pela disponibilidade e auxílio na coleta dos dados.

À Equipe do LIKA, sem os quais o trabalho não poderia ser realizado, em especial minha co-orientadora, Dra. Danyelly Bruneska, pela análise da expressão genética do material do estudo e pela disponibilidade e auxílio com a interpretação dos resultados.

A Alessandro, pela excelente qualidade do seu trabalho, fundamental para a adequada análise estatística do mesmo.

À equipe de enfermagem, especialmente Gisele Belo, pelo auxílio na coleta dos dados e contato com o paciente em todo o período de seguimento.

Aos pacientes, cuja compreensão permitiu a realização do estudo, espero que nossos resultados possam auxiliar a melhor compreensão de suas doenças.



“Todos, em qualquer idade, têm talentos não completamente desenvolvidos. Mesmo aqueles que alcançaram o topo de suas profissões não estão imunes a isto... Ter talento não é o suficiente. Não é suficiente dedicar-se com afinco e estudar noite adentro. Você tem de se tornar um profundo conhecedor dos métodos que utiliza para tomar suas decisões... O constante esforço vale a pena, ainda que nem sempre de forma imediata e tangível”.

Garry Kasparov, How life imitates chess



RESUMO

INTRODUÇÃO: Obesidade e diabetes tipo 2 (DM 2) são um crescente problema de saúde. O fator de transcrição 7-like 2 (TCF7L2) é o gene mais associado ao DM 2 e sua potencial associação com a obesidade tem sido aventada em estudos recentes. **OBJETIVO:** O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do tratamento cirúrgico da obesidade na expressão do TCF7L2 e suas associações com o índice de massa corpórea (IMC) e o DM 2. **METODOLOGIA:** Foi realizado um estudo tipo coorte, amostras de sangue periférico de 26 pacientes portadores de obesidade foram colhidas antes da cirurgia bariátrica e após um ano de seguimento, foi extraído RNA das amostras por sistema automatizado QIAAsymphony® (QIAGEN®), Realizou-se PCR em tempo real, utilizando reagentes SYBR® Green PCR Kit (QIAGEN®) através do RotorGene Q® (QIAGEN®). As variáveis categóricas foram avaliadas utilizando o teste do qui-quadrado com a correção de Fisher quando necessário e as variáveis contínuas com o teste t-student, modelos de regressão linear foram criados para avaliar a relação do IMC com a expressão genética. Apenas associações com p-valor < 0,05 foram consideradas significativas. **RESULTADOS:** a expressão genética do TCF7L2 após a cirurgia bariátrica não se alterou na população como um todo (p-valor= 0,38), contudo, nos pacientes diabéticos, houve redução significativa (27%, p-valor= 0,021). Houve tendência à diferença (p-valor 0,051) entre a proporção de pacientes diabéticos que apresentaram alguma redução da expressão (81,88%) em relação aos não diabéticos (40%). A expressão pré-operatória dos pacientes diabéticos foi significativamente maior em relação aos não diabéticos (p-valor= 0,042). Houve correlação positiva entre IMC e os valores do dCt (delta cycle threshold) do TCF7L2 antes e após a cirurgia bariátrica (p-valor= 0,037 e 0,007 respectivamente), ou seja, quanto maior o IMC do paciente menor a expressão do gene. Houve correlação positiva estatisticamente significativa entre a redução de IMC e a expressão do TCF7L2 (p-valor= 0,027), ou seja, quanto maior a redução de IMC maior o aumento de expressão genética comparada com os valores pré-operatórios. **CONCLUSÃO:** A expressão do TCF7L2 um ano após a cirurgia bariátrica não se alterou na população estudada, apenas nos pacientes diabéticos mostrou-se uma redução estatisticamente significativa. A expressão do TCF7L2 foi significativamente maior no grupo diabético antes da cirurgia bariátrica. Houve correlação positiva entre os valores do dCt do TCF7L2 e o IMC tanto no pré quanto no pós-operatório. A redução de IMC foi significativamente associada a aumento da expressão do TCF7L2.

PALAVRAS-CHAVE: Cirurgia bariátrica. Diabetes mellitus tipo 2. Derivação gástrica. Expressão gênica. Genômica. TCF7L2.



ABSTRACT

Evaluation of TCF7L2 expression after bariatric surgery

INTRODUCTION: obesity and type 2 diabetes (DM 2) are an increasing healthcare problem. The transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) is the gene most associated with DM 2 and its potential association with obesity has been reported in recent studies. **OBJECTIVE:** The objective of this study was to assess the effects of the surgical treatment of obesity in TCF7L2 expression and its possible associations with body mass index (BMI) and DM 2. **METODOLOGY:** a cohort study was conducted, peripheral blood samples were collected from 26 obese patients before bariatric surgery and after one year of follow-up, the RNA was extracted from blood samples using an automated system, QIAasympy® (QIAGEN®). cDNA was synthesized using reverse transcriptase and, posteriorly, Real-time PCR was done, using SYBR® Green PCR Kit (QIAGEN®) reagents by means of RotorGene Q® (QIAGEN®). Categorical variables were analyzed with chi-square with Fisher adjustment when needed and the continuous variables were analyzed with t-student's test, linear regression models were created to assess the relation of BMI with genetic expression. Only associations with a p-value < 0,05 were considered significant. **RESULTS:** TCF7L2 genetic expression did not change for the entire group after bariatric surgery (p-value= 0,38), however, in the diabetic patients, there was a significant decrease (27%, p-value= 0,021). There was a trend toward difference (p-value 0,051) between the proportion of diabetic patients that had some decrease in the genetic expression (81,88%) when compared with the non-diabetic ones (40%). Preoperative genetic expression of the diabetic patients was significantly higher when compared to the non-diabetic ones (p-value= 0,042). There was a positive correlation between BMI and the dCt (delta cycle threshold) values of TCF7L2 in both, the pre and postoperative periods (p-value= 0,037 e 0,007 respectively), in other words, the higher the BMI of the patients, the lower gene expression. There was a statistically significant positive correlation between BMI loss and TCF7L2 genetic expression (p-value= 0,027), in other words, the higher the BMI loss, the higher gene expression compared to the preoperative levels. **CONCLUSION:** The TCF7L2 expression one year after surgery didn't change for the entire group, only in the diabetic patients there was a statistically significant decrease. TCF7L2 expression was significantly higher in diabetic patients before bariatric surgery. There was a positive correlation between BMI and the dCt values of TCF7L2 in both, the pre and postoperative periods. The BMI loss was significantly associated with increase in TCF7L2 expression.

KEYWORDS: Bariatric surgery. Diabetes mellitus, type 2. Gastric bypass. Gene expression. Genomics. TCF7L2.



LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Distribuição dos pacientes segundo o gênero.	35
Figura 2. Distribuição dos pacientes segundo a idade .	35
Figura 3. Distribuição dos pacientes segundo o grau de obesidade .	36
Figura 4. Distribuição dos pacientes segundo a presença de DM 2.	36
Figura 5. Análise de regressão linear: Expressão genética (dCt) x IMC no pré-operatório.	38
Figura 6. Análise de regressão linear: Expressão genética (dCt) x IMC no pré-operatório no grupo diabético (a) e não diabético (b).	39
Figura 7. Análise de regressão linear: IMC x Expressão genética (dCt) no pós-operatório.	40
Figura 8. Análise de regressão linear: Expressão genética (dCt) x IMC no pós-operatório no grupo diabético (a) e não diabético (b).	41
Figura 9. Comparação da variação da expressão do TCF7L2 (ddCt) entre os grupos diabético e não diabético.	43
Figura 10. Distribuição dos pacientes diabéticos e não diabéticos conforme o aumento ou redução na expressão do TCF7L2 (ddCt).	44
Figura 11. Análise de regressão linear da redução de IMC x expressão do TCF7L2 (ddCt).	46
Figura 12. Análise de regressão linear da redução de IMC x expressão do TCF7L2 (ddCt) no grupo diabético (a) e não diabético (b).	47



LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados clínicos e demográficos da população estudada.	34
Tabela 2. Análise de regressão linear: Expressão do TCF7L2 (dCt) x IMC, no pré e pós operatório, na população estudada e nos subgrupos diabéticos e não diabéticos.	37
Tabela 3. Comparação da expressão do TCF7L2 no pré e pós operatório de acordo com a presença de DM 2.	42
Tabela 4. Análise descritiva e inferencial da expressão do TCF7L2 na população e nos subgrupos diabéticos e não diabéticos.	43
Tabela 5. Distribuição dos pacientes diabéticos e não diabéticos conforme o aumento ou redução na expressão genética relativa do TCF7L2 (ddCt).	44
Tabela 6. Análise descritiva da redução de IMC na população estudada e nos subgrupos diabéticos e não diabéticos.	45

LISTA DE ABREVIATURAS

ADA	<i>American Diabetes Association</i>
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
CT	<i>cycle threshold</i>
dCt	<i>delta cycle threshold</i>
ddCt	<i>delta-delta cycle threshold</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DM 2	diabetes mellitus tipo 2
Dp	desvio-padrão
EDTA	<i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>
GLP-1	<i>glucagon-like peptide-1</i>
HMG	<i>high motility group</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC-95	Intervalo de confiança de 95%
IMC	índice de massa corpórea
LIKA	Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TCF7L2	<i>Transcription fator 7-like 2</i>
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
Wnt	Combinação dos acrônimos WG (<i>Wingless</i>) e INT-1 (<i>Integration-1</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Apresentação do problema.....	14
1.2	Justificativa do estudo.....	15
1.3	Objetivos.....	16
1.3.1	Objetivo geral.....	16
1.3.2	Objetivos específicos.....	16
2	REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1	Epidemiologia e fisiopatologia do DM 2.....	17
2.2	Cirurgia bariátrica e DM 2.....	17
2.3	Associação do TCF7L2 ao DM 2.....	19
2.4	TCF7L2 como regulador da homeostase glicêmica.....	20
3.	CASUÍSTICA E MÉTODOS	23
3.1	Local do estudo.....	23
3.2	Delineamento do estudo.....	23
3.3	Período do estudo.....	23
3.4	Seleção dos pacientes.....	23
3.4.1	CrITÉRIOS de inclusão.....	24
3.4.2	CrITÉRIOS de exclusão.....	24
3.5	Procedimentos técnicos.....	24
3.6	Procedimentos analíticos.....	28
3.6.1	Cálculo do tamanho da amostra.....	28
3.6.2	Expressão das variáveis.....	29
3.6.3	Testes estatísticos a serem usados.....	30
3.6.4	Força da verdade.....	31
3.7	Procedimentos éticos.....	31
4	RESULTADOS	33
5	DISCUSSÃO.....	48
6	CONCLUSÕES	53
	REFERÊNCIAS.....	54
	APÊNDICES	57
	APÊNDICE 1 – Ficha de coleta de dados.....	57

APÊNDICE 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido.....	58
ANEXO.....	60
Parecer do Comitê de Ética.....	60

1. INTRODUÇÃO

A obesidade e o diabetes são problemas de saúde pública, com crescimento importante nos últimos anos e com tendência a aumento nas próximas décadas. O TCF7L2 é o gene mais associado ao diabetes em várias populações. Há controvérsias quanto ao possível efeito modulador da obesidade na expressão do gene, o presente estudo teve como objetivo avaliar a expressão sérica do TCF7L2 antes e um ano após a cirurgia bariátrica, analisando particularmente o papel da obesidade e do diabetes como potenciais moduladores da mesma.

1.1 Apresentação do problema

A obesidade é considerada um problema de saúde pública, com estimativas de que tenha dobrado sua incidência nos últimos 20 anos, com cerca de 300 milhões de pessoas obesas em todo o mundo no início da década passada ⁽¹⁾. Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) estimam que 50% da população brasileira estavam acima do peso ideal, ou seja, com índice de massa corpórea (IMC) $> 25 \text{ Kg/m}^2$ em 2008, sendo que uma em cada três crianças de 5 a 9 anos estava acima do peso. Nos adolescentes (10-19 anos) a incidência de excesso de peso aumentou seis vezes em um período de 34 anos, sendo mais evidente na zona urbana e nos indivíduos com maior renda familiar. Nesse mesmo período de tempo a incidência de excesso de peso em adultos praticamente triplicou, sendo observado aumento em todas as regiões do País e em todos os estratos de renda ⁽²⁾.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define obesidade através do IMC. O mesmo é calculado dividindo o peso corporal (Kg) pela altura, em metros elevado ao quadrado (m^2), sendo considerada obesidade um IMC maior ou igual a 30 Kg/m^2 . A obesidade está associada à morbidade significativa, como diabetes mellitus tipo 2 (DM 2), apnéia do sono, dislipidemia, acidente vascular cerebral, coronariopatia, hipertensão arterial sistêmica e uma variedade de doenças neoplásicas ⁽¹⁾.

O DM 2 é uma doença crônica multifatorial, sendo um de seus fatores de risco a obesidade, e que, em decorrência disto, vêm crescendo mundialmente de forma epidêmica. Estima-se que 5,8% dos brasileiros tenham diagnóstico de diabetes, sendo que mais de 20%

da população pernambucana acima dos 65 anos já tinham diagnóstico da doença em 2009⁽³⁾. Considerando que os números referidos acima são dados de morbidade autoreferida pode-se inferir que os números reais sejam ainda maiores, com inquérito de 2002 mostrando valores em torno de 7%⁽⁴⁾.

O fator de transcrição 7-like 2 (TCF7L2) pertence a uma família de genes que funciona como regulador da transcrição de vários processos do desenvolvimento embriológico e exercem, também, seus efeitos em várias linhagens celulares e órgãos do indivíduo adulto⁽⁵⁾. Seu produto é um grupo de alta mobilidade (HMG, do inglês *High Mobility Group*) que contém fatores de transcrição envolvidos na homeostase da glicose no sangue, atuando por meio da via de sinalização Wnt⁽⁶⁾. Demonstrou-se uma forte associação entre os polimorfismos do gene TCF7L2 e o risco de DM 2, atribuindo um risco populacional de DM associado ao TCF7L2 de 21%⁽⁷⁾.

1.2 Justificativa do estudo

Em estudo pioneiro, Hindle et al estudaram a expressão do TCF7L2 em pacientes obesos mórbidos submetidos a cirurgia bariátrica, analisando sua relação com o IMC na população estudada e, posteriormente, nos subgrupos de pacientes de acordo com a presença ou não de DM 2. Usando um modelo de regressão linear, mostraram que, nos indivíduos diabéticos, havia correlação negativa entre IMC e expressão genética normalizada do TCF7L2 enquanto que nos indivíduos não diabéticos tal relação foi oposta, com aumento à medida que os indivíduos apresentassem maior IMC⁽⁸⁾.

Tal estudo levanta vários questionamentos a respeito do papel da alteração da expressão genética do TCF7L2 na resolução da obesidade e do diabetes observadas após a cirurgia bariátrica, assim como qual a possível relação entre a expressão genética e o IMC e se a mesma pode ser influenciada pela presença ou não do DM 2.

Enquanto políticas de saúde pública estão sendo implementadas com o objetivo de controlar as causas básicas da obesidade e do DM 2 (relacionados à nutrição, sedentarismo e hábitos sociais) existe, em paralelo, uma necessidade de melhor compreensão dos processos biológicos relacionados às mesmas com o objetivo de desenvolver novas abordagens (cirúrgicas e medicamentos) de prevenção e tratamento.

No presente estudo iremos avaliar de forma prospectiva o comportamento da expressão genética do TCF7L2 antes e após a cirurgia bariátrica.

1.3 Objetivos:

1.3.1 Geral

Avaliar a expressão do TCF7L2 antes e após o tratamento cirúrgico da obesidade mórbida.

1.3.2 Específicos

Quantificar a expressão do TCF7L2 em duas fases: antes e um ano após a cirurgia bariátrica.

Verificar a correlação entre a perda ponderal e a expressão do TCF7L2 um ano após a cirurgia bariátrica.

Verificar a correlação entre IMC e expressão genética entre os grupos de pacientes diabéticos e não diabéticos antes e após a cirurgia.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Foi realizada revisão da literatura pertinente ao tema nas bases de dados PUBMED, CENTRAL e LILACS, os artigos considerados relevantes foram analisados individualmente pelo autor, excluindo-se aqueles menos relevantes a presente pesquisa. Os textos assim selecionados foram avaliados na íntegra, inclusive buscando em suas referências outros potenciais artigos relevantes.

2.1 Epidemiologia e fisiopatologia do DM 2

Em 2011 cerca de 366 milhões de pessoas no mundo tinham diabetes e estima-se que tais números possam alcançar 552 milhões até 2030⁽⁹⁾. A fisiopatologia do DM 2 é complexa, sendo que a alteração no balanço entre a sensibilidade periférica à insulina e a secreção da mesma parece ser o fator mais importante no desenvolvimento da doença. Observa-se uma queda gradual e progressiva da função das células beta pancreáticas ante uma resistência insulínica elevada persistente ⁽¹⁰⁾.

A resistência insulínica, por sua vez, é largamente influenciada pela obesidade, contudo não é o grau da mesma e sim a sua distribuição corporal o fator mais importante: uma combinação de alto conteúdo lipídico intramiocelular, aumento da gordura visceral, redução da gordura subcutânea e esteatose hepática estão associadas a aumento da resistência insulínica e consequente desenvolvimento de DM 2 ⁽¹¹⁾.

O tratamento clínico é complexo e com eficácia ainda longe do ideal, nos Estados Unidos, por exemplo, apenas 50% dos pacientes diabéticos alcançaram níveis de hemoglobina glicada inferiores a 7% com o tratamento clínico recomendado pela ADA, sendo observada uma baixa aderência às intervenções nutricionais e de estilo de vida ⁽¹²⁾.

2.2 Cirurgia bariátrica e DM 2

Uma metanálise publicada em 2004 evidenciou que a cirurgia bariátrica conseguiu promover a remissão do DM 2, em média, em 76,8% dos pacientes, variando de acordo com o tipo de cirurgia realizada (banda gástrica com 47,9%, 83,7% para o Bypass gástrico e 98% para a derivação biliopancreática), o que implica dizer que o mecanismo de resolução da doença é complexo e possivelmente associado a fatores anatômicos, fisiológicos e alterações moleculares ⁽¹³⁾.

A perda de peso induzida pela cirurgia bariátrica exerce importante papel na resolução do DM 2 visto que promove a redução da resistência insulínica, contudo, bem antes de uma perda ponderal relevante observa-se uma melhora substancial da sensibilidade à insulina bem como redução da necessidade de medicações para controle glicêmico, com grande percentual de pacientes com glicemia adequada apenas com dieta nos primeiros dias após a cirurgia ⁽¹⁴⁾.

Estudos posteriores apontam dois principais mecanismos responsáveis por esta resposta precoce: primeiro o aumento da sensibilidade hepática a insulina induzida, pelo menos em parte, pela restrição calórica presente no pós-operatório imediato da cirurgia bariátrica e segundo uma melhora da função das células beta pancreáticas, associada a uma secreção exagerada de *glucagon-like peptide-1* (GLP-1) promovida pelo trânsito intestinal alterado induzido pela cirurgia ⁽¹⁵⁾.

No bypass gástrico a exclusão do duodeno e jejuno proximal do trânsito intestinal (*foregut* hipótese) bem como a chegada precoce de alimentos ao íleo terminal (*hindgut* hipótese) estão associados a alterações hormonais relevantes, dentre as quais o aumento do GLP-1, que é considerado um dos mecanismos mais importantes associado à resolução do DM 2 observado após a cirurgia bariátrica ⁽¹⁶⁾. Contudo, de forma inesperada considerando apenas as teorias acima, os pacientes submetidos à gastrectomia vertical também demonstram aumentos relevantes do GLP-1. Embora nesta cirurgia não haja exclusão do trânsito duodenal nem desvio intestinal promovendo a chegada precoce de alimentos ao íleo, acredita-se que o esvaziamento gástrico acelerado associado a alterações da fisiologia gastrointestinal sejam os fatores responsáveis por tal aumento ⁽¹⁷⁾.

As alterações do GLP-1 explicam parcialmente a resolução do DM 2, contudo vários outros hormônios intestinais, bem como alterações na função das células beta pancreáticas, da sensibilidade periférica e hepática a insulina, do metabolismo dos ácidos biliares e até mesmo mudanças na microbiota intestinal são fatores possivelmente relacionados a melhora da doença após a cirurgia bariátrica ⁽¹⁶⁾.

2.3 Associação do TCF7L2 ao DM 2

O TCF7L2 pertence a uma família de genes que funciona como regulador da transcrição de vários processos do desenvolvimento embriológico, exercendo, também, seus efeitos em várias linhagens celulares e órgãos do indivíduo adulto ⁽⁵⁾. O gene é composto por 17 éxons e 215.9 quilobases, localizado no braço longo do cromossomo 10 (10q25.3), possui dois

domínios principais: um domínio de ligação a catenina (éxon 1) e outro para ligação ao *Deoxyribonucleic acid* (DNA) pelo HMG-box central (éxons 10 e 11). O produto do gene TCF7L2 é um HMG que contém fatores de transcrição envolvidos na homeostase da glicose no sangue, atuando por meio da via de sinalização Wnt ⁽⁶⁾.

Em 2006 Grant et al, demonstraram uma forte associação entre os polimorfismos do gene TCF7L2 e o risco de DM 2. Avaliando inicialmente uma população islandesa os autores conseguiram replicar seus achados em uma coorte de dinamarqueses e outra de americanos, atribuindo um risco populacional de DM 2 associado ao TCF7L2 de 21% ⁽⁷⁾.

A associação entre os polimorfismos do gene e o DM 2 foi observada posteriormente em vários outros estudos populacionais ⁽¹⁸⁻²⁶⁾ e em metanálise englobando mais de 74 mil indivíduos, distribuídos em 36 estudos, que atribuiu um papel ao TCF7L2 em cerca de 20% de todos os casos ⁽²⁷⁾. Na mesma publicação os autores consideram DM 2 como uma doença multifatorial, composta por vários subtipos, alguns fortemente associados a fatores ambientais e outros a fatores genéticos, aventando a possibilidade de interações gene-gene e gene-ambiente como potenciais modificadores do fenótipo do DM 2, sendo a obesidade um elemento importante a ser avaliado em futuros estudos ⁽²⁷⁾.

Dois polimorfismos de único nucleotídeo (rs12255372 e rs7903146) do TCF7L2 se mostraram fortemente associados ao DM 2, com um risco relativo de 1,45 e 2,41 para os heterozigotos e homozigotos, respectivamente, para estes alelos. ^(18; 28). Em nosso meio um estudo de coorte observacional num período de sete anos, envolvendo 222 indivíduos nipo-brasileiros não encontrou associação entre variantes comuns do TCF7L2 e o surgimento de intolerância a glicose ⁽²⁹⁾. No entanto, outro autor encontrou associação positiva baseado em uma amostra maior e mais diversificada da população brasileira ⁽³⁰⁾.

2.4 TCF7L2 como regulador da homeostase glicêmica

De uma forma geral, aceita-se que os polimorfismos do TCF7L2 não são fatores de risco para obesidade, embora os mesmos tenham seus efeitos sobre o DM 2 modulados pelo excesso de gordura corporal ^(20; 21; 31). Em um dos estudos demonstra-se que nos pacientes magros a presença do alelo rs7903146 esteve associada ao surgimento de diabetes enquanto que nos obesos isto não ocorreu ⁽²⁰⁾.

O tratamento cirúrgico da obesidade mostrou-se eficaz no controle da doença e suas complicações, tendo no DM 2 seu exemplo mais dramático: a queda nos níveis glicêmicos e

na necessidade de medicações hipoglicemiantes é observada poucos dias após a cirurgia. Tal efeito se mantém no seguimento tardio, sendo que, nos pacientes submetidos à cirurgia bariátrica, o risco relativo de desenvolver diabetes é reduzido em 30 vezes em relação ao grupo controle de obesos não operados ⁽⁵⁾.

Ainda não se sabe quais os mecanismos envolvidos nessa associação, ou seja, como alterações do TCF7L2 influenciam a homeostase da glicose no organismo humano, bem como suas possíveis associações com a obesidade e as alterações hormonais secundárias a perda ponderal induzida pela cirurgia bariátrica.

Um estudo sugeriu que o TCF7L2 estivesse diretamente relacionado à regulação da transcrição do gene do proglucagon e na produção do GLP-1 ⁽³²⁾, no entanto, trabalho posterior tornou tal hipótese menos plausível, visto que a resposta do GLP-1 após a infusão de glicose em portadores da mutação do TCF7L2 estava dentro dos limites normais, enquanto que a secreção de insulina encontrava-se reduzida ⁽²⁸⁾. Tal hipótese é corroborada em outro artigo que evidencia também um aumento na produção hepática de glicose associada à mutação do TCF7L2 ⁽³³⁾ e em um estudo clínico que demonstrou pior resposta hipoglicemiante às sulfoniluréias no grupo com o alelo de risco presente do TCF7L2 ⁽³⁴⁾.

Contudo, artigo publicado em 2014, realizando um estudo experimental com células de ilhotas pancreáticas, demonstrou redução de 49% na produção do *messenger Ribonucleic Acid* (mRNA) da proinsulina após inativação do TCF7L2. Tais células geneticamente modificadas também possuíam menor expressão do mRNA de enzimas responsáveis pela conversão da pro-insulina em insulina, comprometendo de forma significativa a secreção insulínica estimulada pela glicose. O mesmo estudo também evidenciou que o aumento na expressão do TCF7L2 nas ilhotas esteve associado à redução na expressão da proinsulina, tal resultado, aparentemente contraditório, pode ser explicado pela expressão variável de isoformas ativadoras e inibidoras que, tomadas em conjunto, se apresentam como aumento da expressão, contudo o efeito final do gene será determinado pela complexa interação entre tais isoformas ⁽³⁵⁾.

Ainda em relação aos mecanismos de ação do TCF7L2, Canivel et al propõem que diferentes padrões de metilação de regiões adjacentes ao gene, como o promotor do mesmo, por exemplo, podem exercer efeito em sua expressão e/ou processamento (*splicing*), fato, que poderia explicar parte da variabilidade fenotípica associada aos diversos polimorfismos do gene ⁽³⁶⁾.

Aumento da expressão hepática de transcritos do TCF7L2 foi observado em indivíduos com DM 2 bem como em normoglicêmicos com alelo de risco (rs7901346), houve interação entre tais transcritos e proteínas relacionadas à gliconeogênese. Tais alterações podem, portanto, estar implicadas no mecanismo de desenvolvimento da doença ⁽³⁷⁾.

O processamento alternativo (*alternative splicing*) é o fenômeno pelo qual o mesmo gene dá origem a várias transcrições diferentes, dependendo de qual a combinação de éxons que serão incorporados no mRNA maduro, estando presente na maioria dos genes humanos. O TCF7L2, por exemplo, consiste de 18 éxons, sendo alvo de extenso processamento. A depender dos éxons inseridos a proteína resultante pode ser um forte estimulante ou até mesmo inibidor da via wnt, de forma que alterações no processamento têm o potencial de modificar o risco de diabetes ⁽³⁸⁾.

Estudo prospectivo publicado em 2012, comparando a distribuição de variantes de mRNA em tecido adiposo e hepático antes e um ano após cirurgia bariátrica mostrou que a perda ponderal está associada com uma mudança da distribuição destas variantes em ambos os tecidos, e que o aumento da expressão de uma das variantes esteve associada a aumento da glicemia e dos ácidos graxos livres na presença de hiperinsulinemia, contudo a expressão gênica total não sofreu alterações ⁽³⁸⁾. Tal estudo foi pioneiro ao demonstrar que fatores ambientais, como a obesidade, podem exercer uma regulação importante dos efeitos do TCF7L2 independentemente do genótipo.

É importante ressaltar novamente que o TCF7L2 se expressa em vários órgãos e tecidos e que o DM 2 em si é uma complexa doença da homeostase glicêmica, de forma que os diferentes mecanismos citados acima não são excludentes, podendo, pelo contrário, constituírem explicações complementares entre si.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Local do estudo

Foram analisados pacientes portadores de obesidade mórbida, submetidos ao tratamento cirúrgico no Serviço de Cirurgia Geral do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). A análise do material foi realizada no Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami (LIKA).

3.2 Delineamento do estudo

O estudo foi prospectivo e observacional, tipo coorte, com avaliação antes do procedimento e 12 meses após a cirurgia bariátrica.

3.3 Período do estudo

Os pacientes foram avaliados no período de Abril de 2013 a Novembro de 2014

3.4 Seleção dos pacientes

Para o estudo foram selecionados pacientes com indicação de tratamento cirúrgico da obesidade mórbida.

3.4.1 Critérios de inclusão

Pacientes submetidos à Derivação gástrica em y-de-roux ou gastrectomia vertical.

Faixa etária entre 18 e 65 anos, de ambos sexos.

3.4.2 Critérios de exclusão

Gravidez

Antecedente cirúrgico recente (últimos três meses)

Processo inflamatório e/ou infeccioso concomitante

3.5 Procedimentos técnicos

A abordagem do paciente foi realizada pelo pesquisador principal, no ambiente hospitalar e em caráter ambulatorial. A avaliação ambulatorial de rotina dos pacientes com indicação de tratamento cirúrgico incluiu assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido e exames pré-operatórios (exames hematológicos, bioquímicos, sorológicos, ultrassonografia de abdome total, endoscopia digestiva alta) além de avaliação de equipe multidisciplinar (endocrinologia, cardiologia, pneumologia, ortopedia, psicologia, nutrição, enfermagem).

Preenchimento de questionário específico em duas fases: pré-operatório e 12 meses após a cirurgia (APÊNDICE 1).

A coleta de sangue periférico foi realizada por equipe de enfermagem, ou pelos pesquisadores, procedimento de rotina antes da cirurgia e no seguimento, após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE 2) em duas fases: pré-operatório e após 12 meses da cirurgia.

A análise molecular foi realizada através da extração automatizada de *Ribonucleic Acid* (RNA) das amostras pelo sistema QIAasympy® (QIAGEN®), a partir de amostras de sangue coletadas em tubos PAXgene® (QIAGEN®) que permite estabilização e purificação do material genético, contribuindo para melhor qualidade e quantidade de RNA intracelular, conservadas a -80°C. As amostras foram quantificadas usando o NanoDrope® (Thermo Scientific®) com *ratio* de ~2,0 para avaliar a qualidade da extração. Em seguida, foi realizada RT-PCR (*transcriptase reversa Polimerase Chain Reaction*) para síntese de *complementary Deoxyribonucleic acid* (cDNA) das amostras utilizando o kit comercial QuantiTect Reverse Transcription Kit® (QIAGEN®). O cDNA obtido foi armazenado a -20°C até o momento da quantificação, também realizada no NanoDrope®, com *ratio* de ~1,8 para avaliação de pureza. Em seguida, foi realizada uma curva de diluição padrão para qPCR (PCR em tempo real) para o gene TCF7L2 e β -actina (utilizado como housekeeping gene, ou seja, gene endógeno de referência para normalizar a expressão). A sequência dos primers de TCF7L2

para qPCR foi: sense – 5'-CACAC TTACC AGCCG ACGTA-3', antisense – 5'-TCCTG TCGTG ATTGG GTACA-3'. Para β -actina, foi usado o primer Hs_ACTB_1_SG QuantiTect Primer Assay® (NM_001101) (QIAGEN®). A qPCR foi realizada utilizando Rotor-Gene SYBR® Green PCR Kit (QIAGEN®) através do RotorGene Q® (QIAGEN®), para volume final de 25 μ L da reação (40 ciclos de 95°C por 5 segundos, 60°C por 10 segundos).

Os níveis relativos de expressão dos genes avaliados durante PCR em tempo real foram determinados segundo o método do Ct comparativo. Nesse método, para cada amostra realizada foi obtido o Ct (*Threshold cycle*, ou ciclo limiar) que é definido como o ciclo onde a fluorescência se encontra acima da *baseline* (linha de base) e atinge o *threshold* (limite). Uma vez que a expressão do gene é analisada em relação ao controle interno (*housekeeping gene*), foi então calculado o dCt (delta-Ct), ou seja a diferença entre as médias do Ct de cada amostra e a media do Ct do controle interno (β -actina). Posteriormente foi calculado o ddCt (delta-delta-Ct) que consiste na diferença do dCt de cada amostra (pós-operatório) em relação ao dCt da amostra referência (pré-operatório). Para calcular a razão relativa da abundância dos transcritos de cada gene em relação à abundância de transcritos na amostra de referência foi aplicada a fórmula 2^{-ddCt} , que parte do princípio de que a cada ciclo da PCR a quantidade de produto dobra, sendo então necessário contemplar que o ganho de cada ciclo (2 vezes) seja elevado à potência do inverso de ddCt.

Com o objetivo de facilitar o entendimento utilizamos os termos dCt para representar a expressão normalizada do TCF7L2 (dCt) e ddCt como sendo a expressão relativa (calculada pela forma exponencial 2 elevado a -ddCt). A expressão normalizada (dCt) representa o número de ciclos necessários para atingir o limiar de detecção durante a PCR em tempo real, portanto quanto maior o seu valor, menor a expressão do TCF7L2.

A expressão relativa (ddCt) obtida através de uma equação exponencial, cujo objetivo é fazer a quantificação relativa da expressão genética, onde foram avaliados os valores pós-operatórios em relação aos pré-operatórios. Seu valor, portanto, representa o número de vezes que a expressão do TCF7L2 no pós-operatório se apresentou em relação aos valores pré-operatórios. O método de cálculo, suas derivações e suposições foram publicadas em 2001, sendo utilizadas em vários artigos especializados desde então ⁽³⁹⁾.

Como critério diagnóstico de DM 2 consideraram-se os da OMS e ADA: em pacientes assintomáticos, presença de hemoglobina glicosilada $\geq 6,5\%$; glicemia de jejum ≥ 126 mg/dL; glicemia pós-prandial de 2 horas ≥ 200 mg/dL durante teste oral de tolerância à glicose, com a utilização de uma carga de 75 g de glicose anidra em água. Na presença de sintomas clássicos

de hiperglicemia, uma aferição glicêmica ao acaso ≥ 200 mg/dL é suficiente para o diagnóstico⁴.

A técnica cirúrgica empregada nos pacientes submetidos ao Bypass gástrico por via laparotômica ou laparoscópica foi a seguinte: foi realizada a confecção da câmara gástrica com a utilização de grampeador linear, criando-se um reservatório gástrico de capacidade aproximada de 50 mL. O restante do estômago, duodeno e jejuno proximal ficam excluídos e os locais grampeados são reforçados com sutura contínua para hemostasia. A anastomose gastrojejunal foi confeccionada a 50-150 cm do ângulo de Treitz, formando a alça bílio-pancreática. A outra alça que comunica as anastomoses gastrojejunal e jejunojejunal mede 150 cm, sendo denominada alça alimentar. A mesma foi utilizada para realização da anastomose gastrojejunal pré-cólica manual com sutura em dois planos. Nos pacientes submetidos à gastrectomia vertical, a cirurgia consistiu na confecção de uma “manga” gástrica confeccionada através da ligadura progressiva dos vasos da grande curvatura gástrica próximo ao estômago, seguida de secção com grampeador linear desde a região antral até o ângulo de His, o segmento de estômago remanescente é calibrado com sonda tipo fouchet numero 32 french, sendo realizada sobressutura da linha de grampeamento ao término da cirurgia.

3.6 Procedimentos analíticos

3.6.1 Cálculo do tamanho da amostra

Para a determinação do tamanho da amostra, foi utilizada a equação de cálculo de amostra para duas médias experimentais, dada por:

$$n = \frac{(\sigma_1^2 + \sigma_2^2) \cdot (z_{\alpha/2} + z_{1-\beta})^2}{(\mu_2 - \mu_1)^2}$$

Em que:

$z_{\alpha/2}$ = quartil da normal padrão (1,96, quando considerado um coeficiente de confiança de 95%);

$z_{(1-\beta)}$ = quartil da normal padrão em função do poder do teste (0,84, quando considerado um poder do teste de 80%);

μ_1 = Estimativa da média da expressão no pré-operatório ($\mu_1 = 8,15$);

σ_1^2 = Estimativa da variância da expressão no pré-operatório ($\sigma_1^2 = 0,80324$);

μ_2 = Média esperada da expressão no pós-operatório ($\mu_2 = 8,15$);

σ_2^2 = Variância esperada da expressão no pós-operatório ($\sigma_2^2 = 0,80324$);

Para determinação dos parâmetros acima realizamos uma análise piloto com 10 pacientes, obtendo desta forma os valores da média e variância no pré-operatório, para os valores pós-operatórios consideramos uma variância semelhante, e uma diferença mínima de 0,7 na média de expressão, como valor mínimo a ser detectado no estudo. Considerando os parâmetros acima, o tamanho amostral foi definido de 26 elementos para cada fase da pesquisa, totalizando 52 observações. Prevendo eventuais perdas optamos pela inclusão de 30 pacientes.

3.6.2 Expressão das variáveis

Os resultados serão apresentados sob a forma de médias para as variáveis contínuas e na forma de proporções para as variáveis categóricas, calculadas no período pré e pós-operatório e vinculadas às seguintes variáveis:

Variáveis quantitativas:

Demográficas:

Idade expressa em anos.

Antropométricas:

Peso expresso em quilogramas (Kg).

Altura expressa em Metros (m).

IMC expresso em quilogramas por metro quadrado (Kg/m²).

Laboratoriais:

Glicemia em jejum expressa em miligrama por decilitro (mg/dL).

Hemoglobina glicosilada expressa em percentual (%).

TCF7L2:

No estudo utilizamos duas formas unidades de avaliação da expressão genética do TCF7L2: o dCt, representando a expressão normalizada do TCF7L2 e aferida antes e um ano após a cirurgia bariátrica e o ddCt, representando a razão da expressão pós-operatória em relação aos valores prévios (detalhes em procedimentos técnicos).

Variáveis qualitativas:

Presença ou não de diabetes, gênero (masculino ou feminino)

Grau de obesidade (I – IMC entre 30 e 35, II – IMC entre 35 e 40, III- IMC acima de 40),

3.6.3 Testes estatísticos utilizados

Para análise dos dados foi construído um banco de dados na planilha eletrônica *Microsoft Excel*, versão 2007, a qual foi exportada para o software *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS), versão 18, onde foi realizada a análise. Na avaliação dos dados demográficos e clínicos dos pacientes avaliados foram calculadas as frequências percentuais e

construídas as respectivas distribuições de frequência. Na comparação das proporções encontradas foi utilizado o teste Qui-quadrado para comparação de proporção.

Na Avaliação da expressão relativa do TCF7L2 foram obtidas as estatísticas: mínimo, máximo, média e desvio padrão. Ainda, foi calculado o intervalo de confiança para a expressão genética. A avaliação da normalidade do dCt e do ddCt foi feita através do teste Kolmogorov-smirnov e nos casos em que a normalidade foi indicada aplicou-se o teste t-student para uma amostra a fim de verificar se houve alteração na expressão do grupo avaliado. Ainda, na comparação do dCt entre o grupo diabético e não diabético, utilizou-se o teste t-student para amostras independentes. Após avaliação quantitativa do ddCt foi feita a categorização dos indivíduos, considerando expressão abaixo de 1 como diminuída e acima de 1 como aumentada. Para avaliar o DM 2 como fator influente no aumento ou redução da expressão aplicou-se o teste Qui-quadrado para independência, no caso em que a suposição do teste não foi satisfeita calculou-se o p-valor através do teste de Exato de Fisher.

Na avaliação da relação do IMC com a expressão normalizada (dCt) foi aplicada a teoria da regressão linear e estimado o modelo de ajuste IMC x Expressão tanto nos dados do pré quanto do pós-operatório. Ainda, foi realizada a análise de regressão linear da redução de IMC x ddCt. Em todas as situações será considerada uma probabilidade máxima de erro de 5% para rejeição da hipótese nula.

3.6.4 Força da verdade

Foram adotados os seguintes parâmetros: $\alpha=0,05$ e $\beta=0,20$ que, respectivamente, indicam a ocorrência do erro tipo I, ou seja, a probabilidade de rejeitar a hipótese nula (H_0), quando esta é verdadeira e a ocorrência do erro tipo II, ou seja, a probabilidade de não rejeitar a hipótese nula (H_0), quando esta, na realidade, é falsa.

3.7 Procedimentos éticos

O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do centro de ciências da saúde com número do parecer 431.576 (ANEXO). Os voluntários da pesquisa realizaram a leitura do termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE 2) com

explicação sobre a natureza da pesquisa, benefícios previstos e potenciais riscos que esta poderia acarretar aos mesmos, sendo incluídos na pesquisa apenas os pacientes que concordaram e assinaram os termos. A participação do paciente foi permitida apenas através de assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido, após explicação pelo pesquisador responsável, informando a necessidade de coleta sanguínea.

Os dados dos pacientes foram arquivados em pastas individuais com o nome do voluntário da pesquisa, sendo guardadas em um armário já existente na Enfermaria de Cirurgia Geral do Hospital das Clínicas. Os mesmos foram mantidos em sigilo, não sendo permitida a divulgação com a identificação dos pacientes.

4. RESULTADOS

No período de Abril a Outubro de 2013, 30 pacientes foram incluídos no estudo, destes quatro foram posteriormente excluídos, restando 26 pacientes para análise. Os motivos de exclusão foram os seguintes: um paciente foi a óbito após a alta, por causas não relacionadas ao procedimento; um houve perda da amostra coletada que, por razões desconhecidas, não se prestou para análise da expressão genética; os outros dois perderam seguimento ambulatorial, não realizando a coleta após um ano.

Na tabela 1 e nas figuras 1-4 temos a distribuição dos dados demográficos e clínico-laboratoriais dos pacientes avaliados. Através dela verifica-se que a maioria dos pacientes é do gênero feminino (92,3%), possui idade de até 40 anos (69,2%), é portadora de obesidade grau III (76,9%) e não possui diabetes (57,7%). O IMC médio no pré-operatório foi de 45,19 com desvio-padrão (Dp) de 6,42. Os pacientes diabéticos tinham níveis médios de hemoglobina glicada de 6,7% com Dp de 0,9.

Tabela 1. Dados clínicos e demográficos da população estudada

Fator avaliado	N	%
Gênero		
Masculino	2	7,7
Feminino	24	92,3
Idade		
< 40 anos	18	69,2
Maior ou igual a 40 anos	8	30,8
Mínimo	22	
Máximo	62	
Média ± desvio padrão	38,1±10,8	
IMC pré-operatório		
Obesidade Grau I	1	3,8
Obesidade Grau II	5	19,2
Obesidade Grau III	20	76,9
Mínimo	33,87	
Máximo	57,20	
Média ± desvio padrão	45,19±6,42	
Diabetes Mellitus		
Sim	11	42,3
Não	15	57,7
Glicemia		
Mínimo	68,0	
Máximo	263,0	
Média ± desvio padrão	109,0±43,6	
Hemoglobina Glicada		
Mínimo	5	
Máximo	8	
Média±desvio padrão	6,7±0,9	

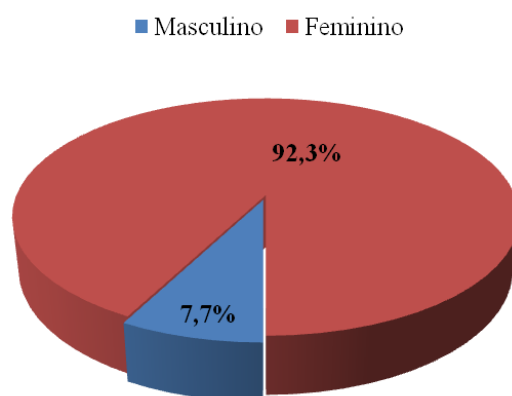


Figura 1. Distribuição dos pacientes segundo o gênero.

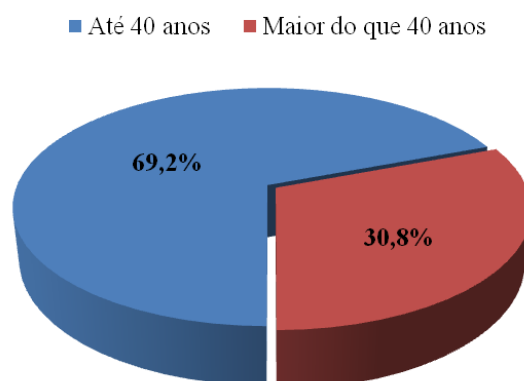


Figura 2. Distribuição dos pacientes segundo a idade.

■ Obesidade Grau I ■ Obesidade Grau II ■ Obesidade Grau III

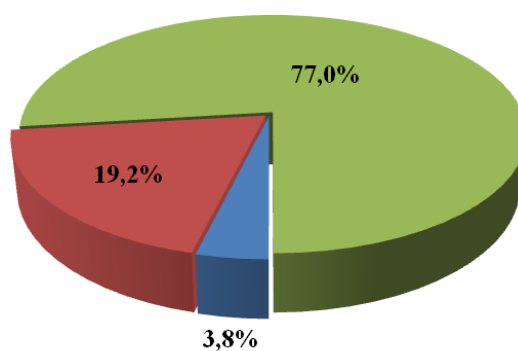


Figura 3. Distribuição dos pacientes segundo o grau de obesidade.

■ Possui DM ■ Não possui DM

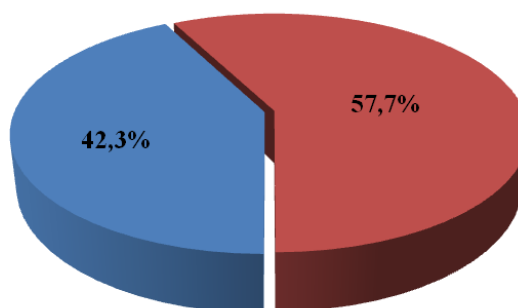


Figura 4. Distribuição dos pacientes segundo a presença de DM 2.

Na tabela 2 temos a análise dos modelos de regressão linear do IMC x dCt. Através dela verifica-se que no pré-operatório foi encontrada uma correlação positiva entre IMC e expressão genética (figura 5), ou seja, houve aumento do dCt (redução da expressão genética) à medida que aumentou o IMC dos pacientes avaliados, sendo encontrada relevância estatística ($p=0,037$).

O mesmo modelo de análise foi empregado para avaliar os subgrupos de pacientes diabéticos e não diabéticos, foi encontrada uma relação inversamente proporcional entre dCt e o IMC no grupo diabético e uma relação diretamente proporcional no grupo não diabético (Figura 6), contudo o teste de relevância desta relação não foi significativo em ambos os grupos avaliados (p -valor = 0,378 e 0,061, respectivamente).

No pós-operatório o mesmo modelo de regressão foi empregado, mostrando resultados semelhantes aos do pré-operatório, aumento do dCt conforme os pacientes apresentaram maior IMC (figura 7). Contudo, ao avaliar os subgrupos de pacientes diabéticos e não diabéticos no pós-operatório (figura 8), diferentemente do que ocorreu no pré-operatório ambos os grupos apresentaram relação diretamente proporcional entre o dCt e o IMC, sendo que, apenas no grupo não diabético houve significância estatística ($p=0,039$).

Tabela 2. Análise de regressão linear: Expressão do TCF7L2 (dCt) x IMC, no pré e pós-operatório, na população estudada e nos subgrupos diabéticos e não diabéticos.

Momento da coleta	Diabéticos			Não diabéticos			Geral		
	B	p-valor	R ²	B	p-valor	R ²	B	p-valor	R ²
Pré-operatório	-2,163	0,378	0,087	2,243	0,061	0,245	2,32	0,037	0,168
Pós-operatório	3,928	0,164	0,204	3,570	0,039	0,288	3,81	0,007	0,268

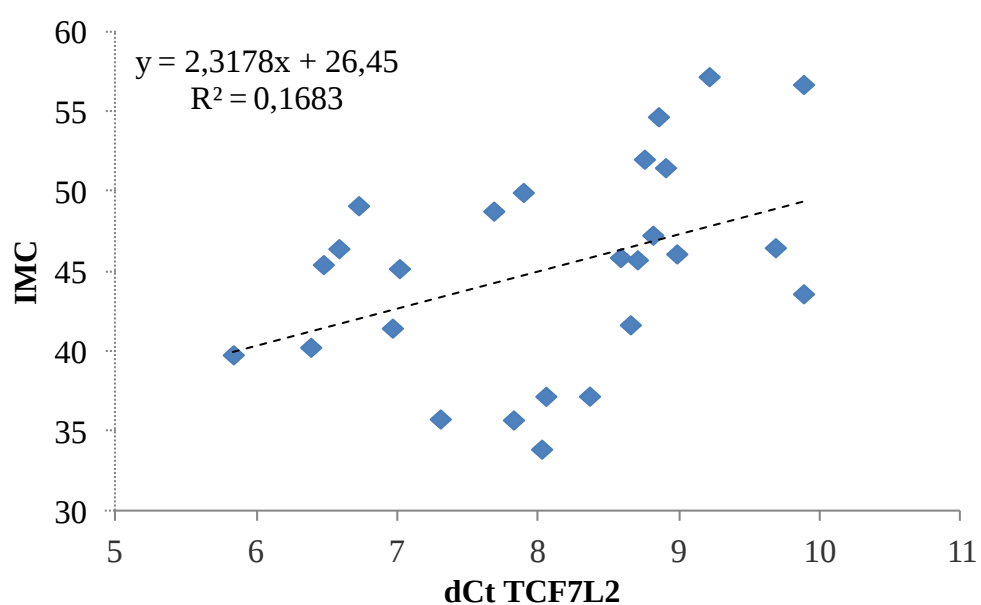


Figura 5. Análise de regressão linear: Expressão genética (dCt) x IMC no pré-operatório.

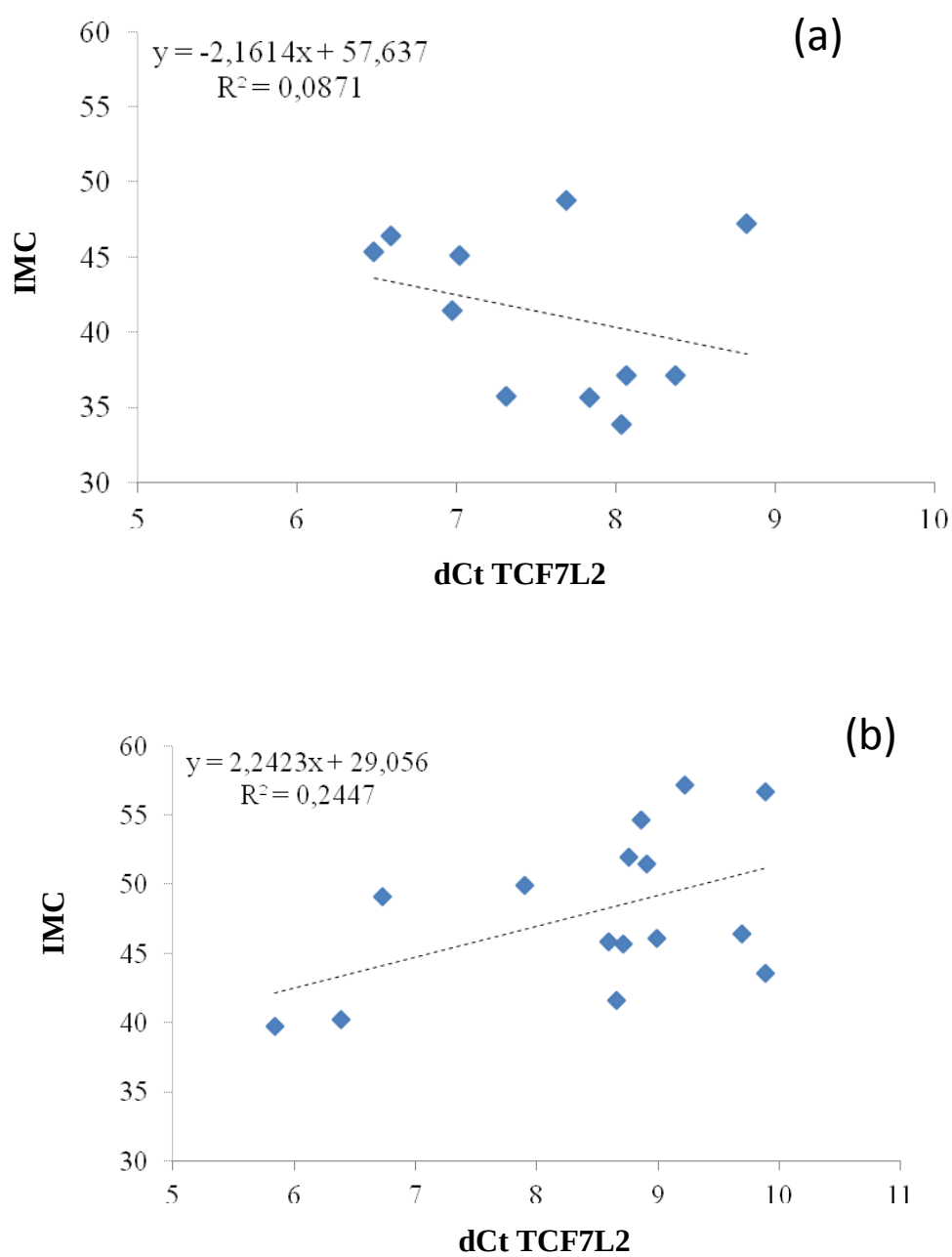


Figura 6. Análise de regressão linear: Expressão genética (dCt) x IMC no pré-operatório no grupo diabético (a) e não diabético (b).

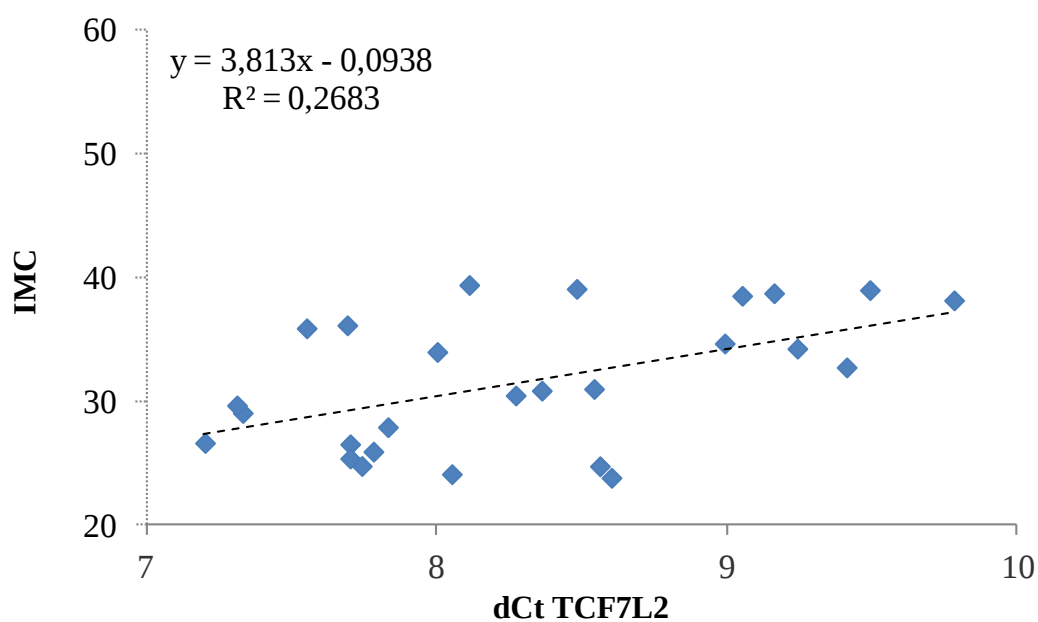


Figura 7. Análise de regressão linear: IMC x Expressão genética (dCt) no pós-operatório.

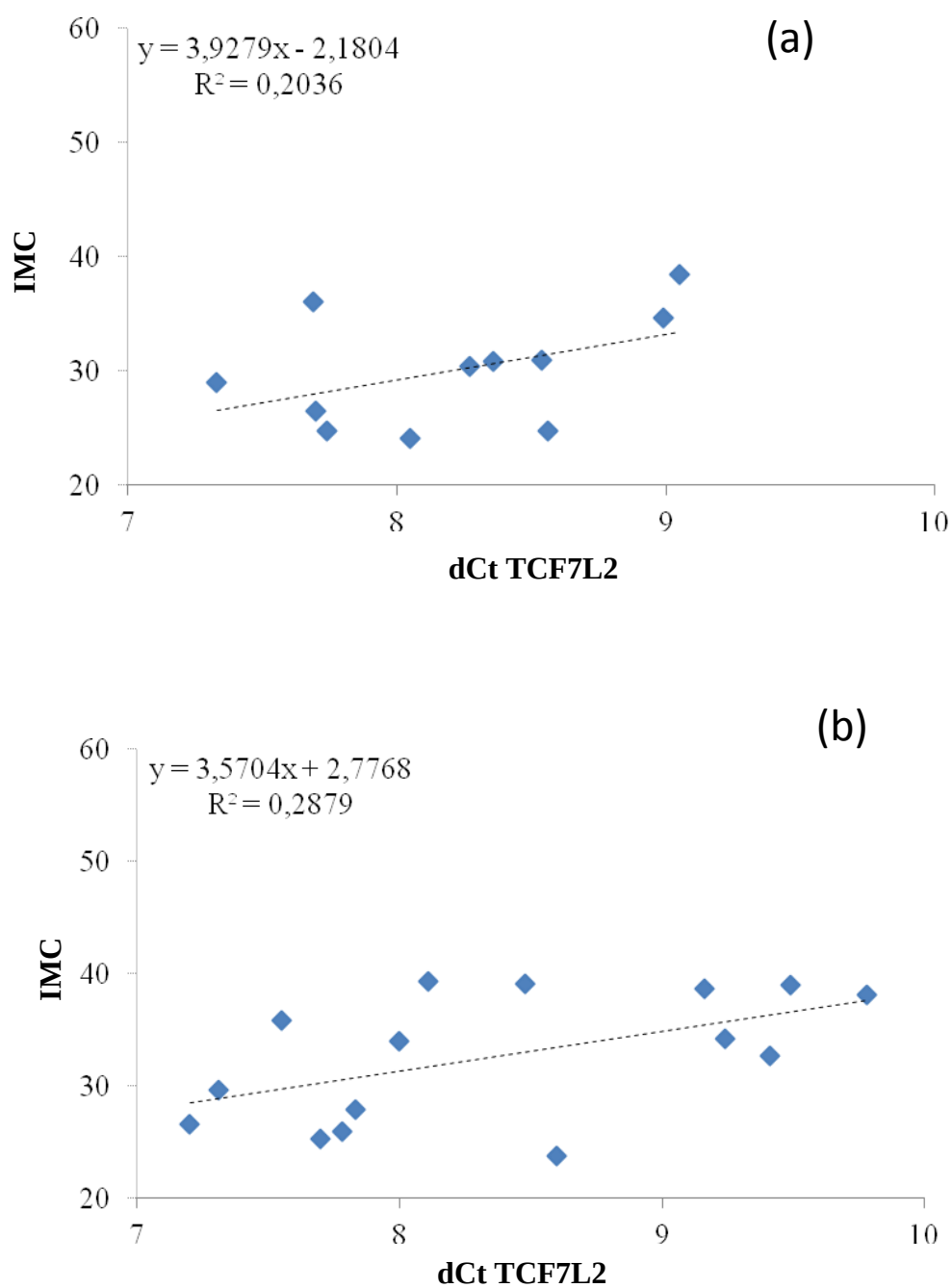


Figura 8. Análise de regressão linear: Expressão genética (dCt) x IMC no pós-operatório no grupo diabético (a) e não diabético (b).

Na tabela 3 temos a média e desvio padrão da expressão genética do TCF7L2 (dCt), avaliando de forma transversal a variação da mesma entre os subgrupos diabéticos e não diabéticos. Através dela verifica-se que os pacientes diabéticos apresentaram valores de dCt significativamente menores no pré-operatório, indicando, portanto, uma expressão sérica aumentada do gene (p -valor = 0,042).

Na tabela 4 temos a média e desvio padrão da expressão relativa do TCF7L2 (ddCt) avaliando de forma longitudinal sua variação na população estudada e nos subgrupos. Através dela verifica-se que, em média, houve um aumento de 16% da expressão genética do TCF7L2, considerando todos os pacientes, após um ano da cirurgia, contudo, tal diferença não foi estatisticamente relevante (p = 0,381).

Ainda na tabela 4, ao avaliarmos o ddCt nos subgrupos de acordo com a presença ou não de DM 2, percebe-se um aumento médio de 48% (1,48) nos não diabéticos e uma redução média de 27% (0,73) nos diabéticos após um ano da cirurgia, contudo apenas nos diabéticos tal variação foi estatisticamente significativa (p = 0,021). Percebe-se que o padrão de variação da expressão foi diferente entre os dois grupos (figura 9), com p -valor= 0,02.

Tabela 3. Comparação da expressão do TCF7L2 (dCt) no pré e pós-operatório de acordo com a presença de DM 2.

DM 2	Expressão genética (dCt)	
	Pré-operatório	Pós-operatório
Sim	7,56±0,75	8,21±0,56
Não	8,47±1,24	8,38±0,85
<i>p</i> -valor ¹	0,042	0,574

¹ p -valor do teste t-student para comparação de média

Tabela 4. Análise descritiva e inferencial da expressão do TCF7L2 (ddCt) na população e nos subgrupos diabéticos e não diabéticos.

Estatísticas	Grupo		Geral
	Diabéticos	Não diabéticos	
Mínimo	0,17	0,15	0,15
Máximo	1,28	3,76	3,76
Media ²	0,73	1,48	1,16
Desvio padrão	0,33	1,07	0,91
IC(95%)	0,50 – 0,95	0,88 – 2,07	0,79 – 1,53
p-valor ¹	0,021	0,106	0,381

¹p-valor do teste t-student sobre a hipótese $H_0: \bar{X}_{DDCT} = 1$ (Se p-valor < 0,05 a expressão pré-operatória é diferente ao pós-operatório).

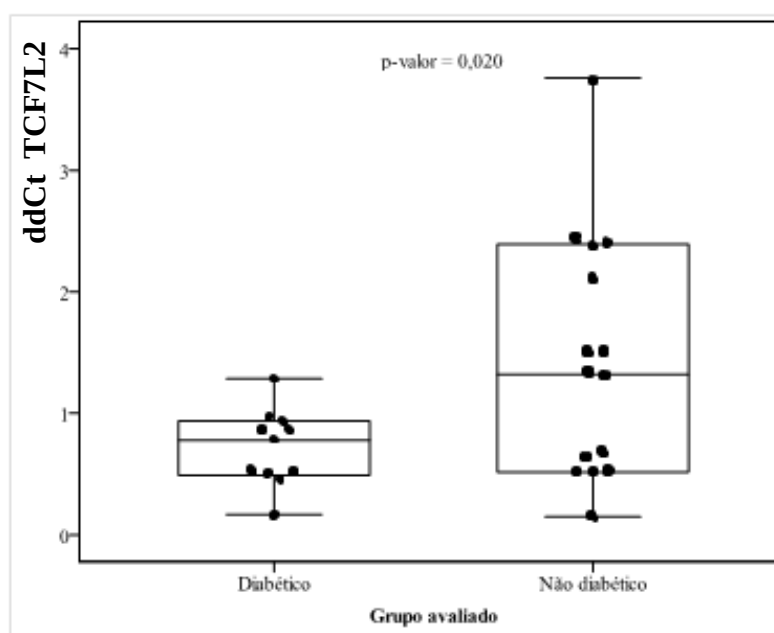


Figura 9. Comparação da variação da expressão do TCF7L2 (ddCt) entre os grupos diabético e não diabético.

Na tabela 5 e figura 10 avaliamos os subgrupos de pacientes diabéticos e não diabéticos em relação expressão pós-operatória do gene desta vez utilizando a mesma como variável categórica, dividimos os paciente em dois subgrupos, aqueles com aumento ou redução na expressão relativa (ddCt maior ou menor que 1). Na tabela observamos uma tendência a maior proporção de pacientes com redução da expressão entre os diabéticos em relação aos não diabéticos (81,88% versus 40%), valor que muito se aproxima de uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,051$).

Tabela 5. Distribuição dos pacientes diabéticos e não diabéticos conforme o aumento ou redução na expressão genética relativa do TCF7L2 (ddCt)

Diabetes	Expressão		p-valor ¹
	Aumentou	Diminuiu	
Diabético	2 (18,2%)	9 (81,88%)	0,051
Não diabético	9 (60,0%)	6 (40,0%)	

¹p-valor do teste Exato de Fisher.

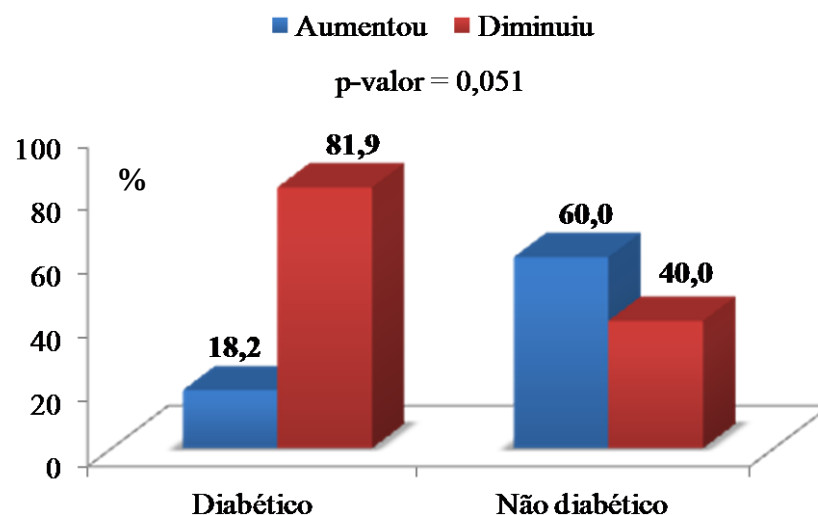


Figura 10. Distribuição dos pacientes diabéticos e não diabéticos conforme o aumento ou redução na expressão do TCF7L2 (ddCt).

Por fim analisamos a relação da redução de IMC com a variação da expressão do TCF7L2 (ddCt), na tabela 6 pode-se observar que os pacientes apresentaram uma perda média de 13,5 Kg/m², com os pacientes não diabéticos apresentando uma perda ponderal mais relevante que os não diabéticos.

Tabela 6. Análise descritiva da redução de IMC na população estudada e nos subgrupos diabéticos e não diabéticos.

Estatísticas	Grupo		Geral
	Diabéticos	Não diabéticos	
Mínimo	5,25	9,37	5,25
Máximo	17,83	20,59	20,59
Media	10,97	15,38	13,51
Desvio padrão	3,39	3,25	3,93
IC(95%)	8,69 – 13,25	13,57 – 17,18	11,92 – 15,10

Foi realizado um modelo de regressão linear entre perda do IMC e expressão relativa do TCF7L2 (ddCt), conforme observamos na figura 11 houve uma correlação positiva entre uma maior redução de IMC e um aumento no ddCt, inclusive relação estatisticamente significativa ($p = 0,027$). Contudo, ao aplicar modelo de regressão semelhante para avaliar os subgrupos populacionais diabéticos e não diabéticos não encontrou-se relação estatisticamente relevante (figura 12).

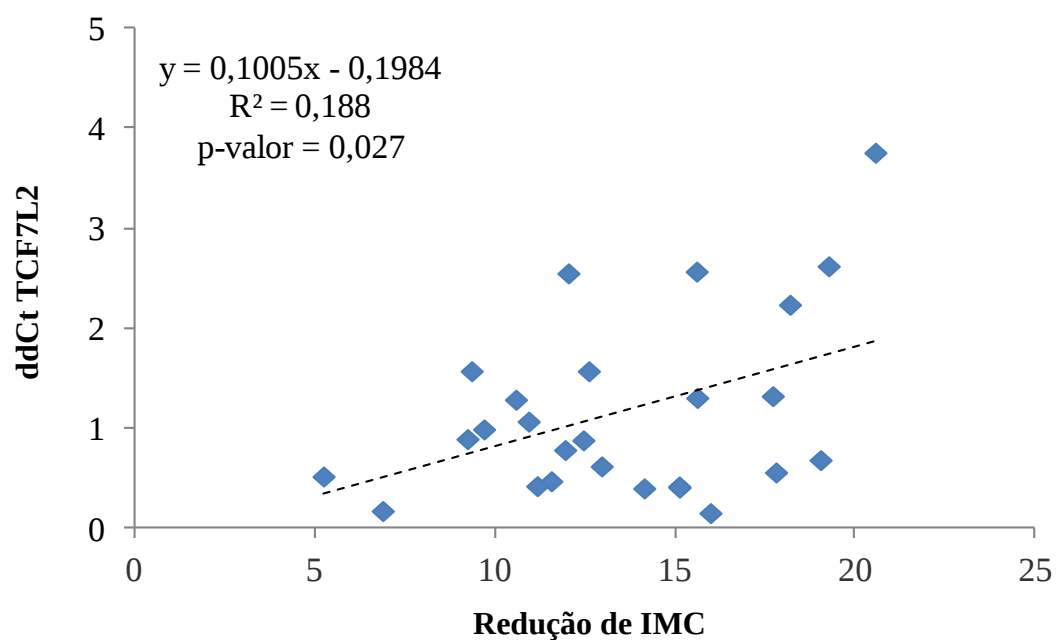


Figura 11. Análise de regressão linear da redução de IMC x expressão do TCF7L2 (ddCt).

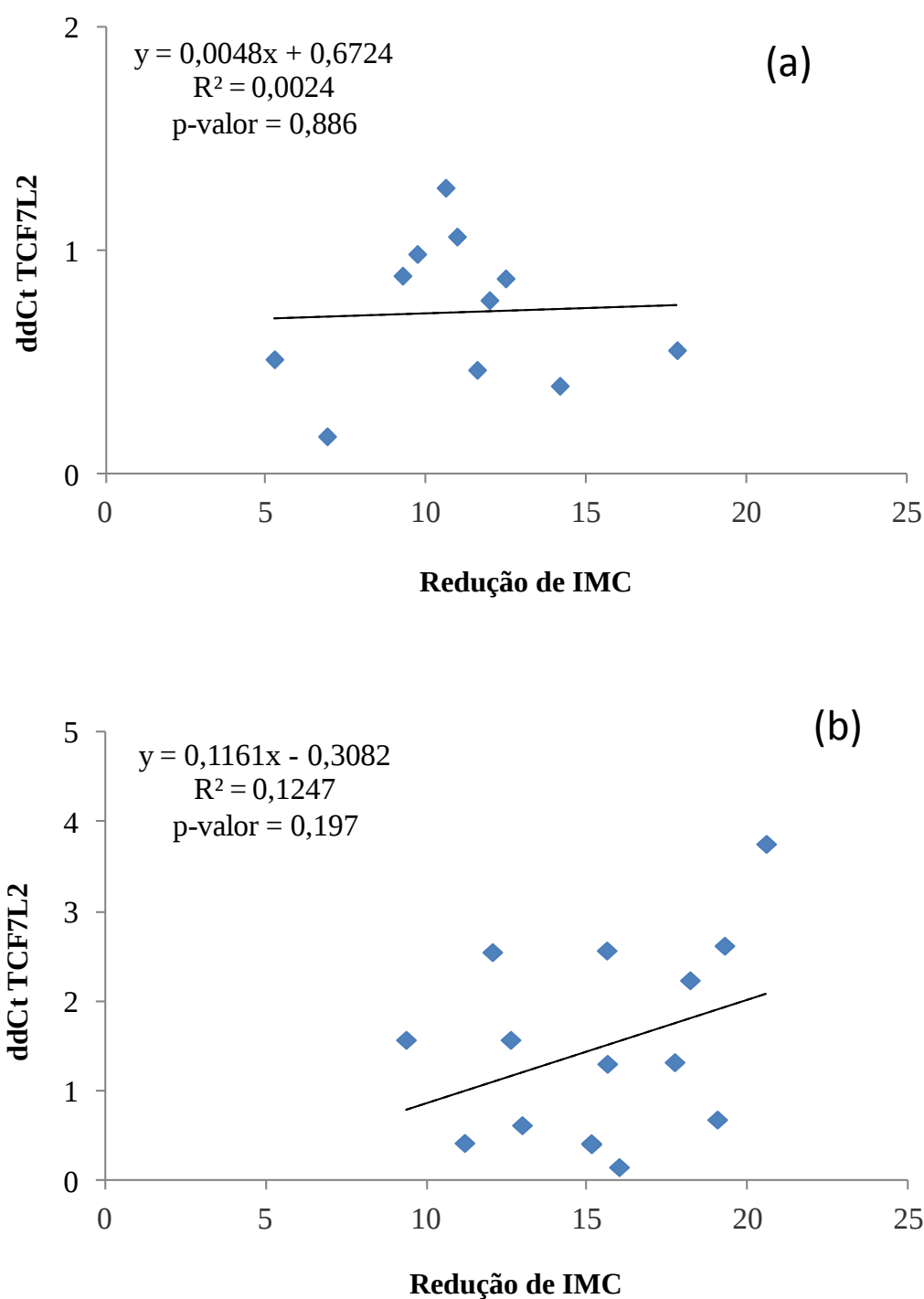


Figura 12. Análise de regressão linear da Redução de IMC x expressão do TCF7L2 (ddCt) no grupo diabético (a) e não diabético (b).

5. DISCUSSÃO

O perfil dos pacientes incluídos na pesquisa demonstra uma clara predominância de pacientes jovens, femininos e portadores de obesidade grau III (tabela 1 e figuras 1-3). Por prováveis questões sócio-culturais, tais pacientes costumam procurar tratamento cirúrgico com maior freqüência, visto que dados nacionais não corroboram tais diferenças na população brasileira ⁽²⁾.

Contudo, a grande freqüência de pacientes diabéticos no estudo (42,3%), pode ser parcialmente explicada por um aumento da freqüência do DM 2 na população bariátrica em relação a média populacional brasileira de 7% ⁽⁴⁾. Estudo nacional, usando modelo de regressão logística, verificou que pacientes obesos (IMC>30) tinham seis vezes mais chances de apresentar DM 2 que não-obesos (IMC<25) ⁽³⁰⁾. Contudo, esta prevalência elevada também pode ser atribuída a uma diretriz do serviço de cirurgia geral, durante o período em que ocorreu a coleta dos dados, que priorizava os pacientes portadores de comorbidades importantes, dentre elas o DM 2.

A relação entre IMC e expressão genética no pré-operatório expressa pelo dCt (figura 5) mostrou uma correlação positiva, com p-valor = 0,037, indicando um aumento nos valores do dCt (redução da expressão genética) à medida que os pacientes apresentaram maior IMC. Após dividirmos os pacientes em diabéticos e não diabéticos, embora com p-valor > 0,05, percebesse nos gráficos uma tendência divergente, com os diabéticos apresentando tendência a correlação negativa, ocorrendo o inverso com os pacientes não diabéticos (figura 6). Tais dados estão em sincronia com os de Hindle et al, que avaliaram a expressão genética do TCF7L2 no pré-operatório de pacientes obesos mórbidos submetidos a cirurgia bariátrica, utilizando o dCt como forma de medida da expressão gênica, contudo, em seu trabalho, não foi evidenciada diferença estatística na população geral, apenas ao se avaliar os subgrupos (diabéticos e não diabéticos) em relação ao dCt ⁽⁸⁾. As diferenças entre tais resultados e os do presente estudo podem ser atribuídas ao tamanho amostral ou ao tipo de material analisado: no trabalho de Hindle et al a expressão foi avaliada a partir de fragmentos de fígado e gordura omental, enquanto que aqui foi utilizado sangue periférico.

Usando a mesma metodologia acima no pós-operatório (figura 7), observamos que a correlação positiva entre dCt e IMC observada no pré-operatório se manteve semelhante, também com diferença estatística (p = 0,007). Contudo percebe-se uma inversão na relação entre dCt e IMC nos pacientes diabéticos após a cirurgia (figura 8a), que passaram a

apresentar o mesmo padrão dos pacientes não diabéticos (figura 8b). Nesta análise de subgrupo a relação entre IMC e dCt foi estatisticamente significativa apenas no grupo não diabético ($p = 0,039$).

Tal achado aventa a hipótese de que, com o aumento do peso, há uma tendência fisiológica a redução da expressão genética do TCF7L2, contudo os pacientes diabéticos não seguem este padrão, inclusive apresentando valores de expressão pré-operatória aumentados (dCt menor) em relação aos não diabéticos, conforme observado na tabela 3. Tal achado é intrigante, pois sugere que, em um subgrupo de indivíduos, o surgimento do DM 2 após a engorda bem como a resolução do mesmo após a perda de peso estejam associados a uma regulação inadequada do TCF7L2 ante as variações do IMC.

Utilizando o método de análise relativa da expressão (ddCt), percebe-se que não houve alteração da mesma após a cirurgia na população estudada como um todo (tabela 4), contudo os pacientes diabéticos apresentaram redução estatisticamente significativa em relação aos valores pré-operatórios ($p = 0,021$). Ao separarmos os pacientes em diabéticos e não diabéticos observa-se que houve uma distribuição heterogênea de alterações da expressão após um ano da cirurgia: nos pacientes diabéticos a média do ddCt foi de 0,725, enquanto que nos não diabéticos foi de 1,478. Percebesse, então, que o subgrupo de pacientes diabéticos apresenta uma tendência a redução da expressão genética após a cirurgia bariátrica, enquanto os não diabéticos apresentaram grande heterogeneidade de alterações, mas com tendência a aumento do ddCt.

Analizando expressão genética do TCF7L2 como variável categórica (aumento vs redução) observa-se que cerca de 80% dos pacientes diabéticos apresentaram redução da expressão genética um ano após a cirurgia, enquanto 60% dos não diabéticos apresentaram algum aumento da mesma (tabela 5 e figura 9), embora os dados mostrem uma tendência clara a diferenças de expressão entre os dois grupos o tamanho da amostra provavelmente explica a ausência de significância estatística aqui observada.

As alterações genéticas observadas prospectivamente após a cirurgia bariátrica corroboram a hipótese de que, nos pacientes diabéticos, a relação expressão genética vs IMC apresente padrões diferentes dos observados nos indivíduos não diabéticos. Apesar da heterogeneidade de alterações na expressão do TCF7L2, particularmente nos indivíduos não diabéticos (figura 9), observa-se que nos diabéticos a tendência a manutenção ou redução da expressão após a cirurgia (e,consequentemente, a perda de peso e resolução do DM 2) foi

relativamente homogênea e constante, com diferença estatisticamente significativa entre os dois subgrupos (figura 9).

Também demonstrou-se um aumento da expressão do TCF7L2 à medida que houve uma maior redução de IMC (figura 10) com relevância estatística ($p = 0027$), a análise dos subgrupos (figura 11 a e b) não conseguiu definir diferenças, provavelmente devido ao tamanho amostral, contudo mostrou uma tendência a aumento diretamente proporcional da expressão a medida que houve maior redução de IMC no grupo não diabético, enquanto nos não diabéticos a relação praticamente inexistente.

Levanta-se aqui a hipótese de que a resolução do DM 2 no pós-operatório de cirurgia bariátrica tem como um de seus mecanismos a modulação da expressão genética do TCF7L2, provavelmente relacionada a perda ponderal. Os dados do presente estudo corroboram esta hipótese, mostrando diferentes padrões de expressão do TCF7L2 no pré-operatório entre os dois subgrupos, bem como diferentes padrões de alteração da mesma após a cirurgia bariátrica. Ainda, na população como um todo, consegue-se observar a relação entre redução de IMC e aumento na expressão do TCF7L2.

Kaminska et al, demonstraram ausência de alteração na expressão genética em tecido adiposo e hepático antes e um ano após cirurgia bariátrica, contudo evidenciou mudança da distribuição de variantes do mRNA produzidas pelo gene ⁽³⁸⁾. Acreditamos que no presente estudo parte da heterogeneidade das alterações de expressão genética observadas possa ser explicada pela modulação do processamento alternativo, no qual, a depender dos éxons inseridos a proteína resultante pode ser um forte estimulante ou até mesmo inibidor da via wnt, ou seja, embora no pós-operatório 80% dos pacientes diabéticos tenham apresentado redução na expressão genética do TCF7L2 não podemos descartar que tenha ocorrido redução de transcritos inibidores e manutenção ou até mesmo aumento de transcritos estimuladores, resultando em uma atividade aumentada do gene e um melhor controle glicêmico.

Zhou et al, em estudo experimental com ilhotas pancreáticas, demonstraram que tanto as células onde houve deleção como aquelas onde houve aumento da expressão do TCF7L2 apresentaram redução na expressão da proinsulina, acreditamos que, como no presente estudo, a expressão variável de isoformas ativadoras e inibidoras que, em conjunto, se apresentam como aumento da expressão, não necessariamente resultam em aumento do efeito do gene, que seria determinado pela complexa interação entre tais transcritos ⁽³⁵⁾.

Como no presente estudo não houve avaliação das variantes de mRNA produzidas e sim uma avaliação global da expressão, tais hipóteses não podem ser corroboradas, podendo ser objetivo de futuros estudos sobre o tema. Contudo demonstra-se que as alterações induzidas pela cirurgia bariátrica alteram a expressão genética do TCF7L2 e que tanto a redução de IMC quanto a presença de diabetes são fatores moduladores destas alterações.

Vale ressaltar que nos estudos anteriores a expressão genética não foi avaliada em sangue periférico, utilizou-se o mesmo neste estudo tanto por acreditar que a expressão sérica do gene pudesse também estar associada ao controle glicêmico como devido à praticidade de coleta, que facilita novas dosagens no seguimento bem como uma maior factibilidade de seu uso posteriormente na prática clínica.

O mecanismo pelo qual a obesidade possa modular alterações na expressão e processamento do gene pode estar relacionado a possíveis mecanismos epigenéticos, como a metilação de regiões adjacentes ao gene, como proposto por Canivel et al ⁽³⁶⁾.

Dos 11 pacientes diabéticos apenas dois ainda utilizavam alguma medicação para controle glicêmico no pós-operatório, embora com níveis glicêmicos recentes normais, tais paciente foram reencaminhados para avaliação com endocrinologista e possível suspensão dos hipoglicemiantes. Como parte dos pacientes não possuía exames (glicemia de jejum e hemoglobina glicada) nos tres meses anteriores a coleta e como os mesmos não faziam parte dos objetivos do estudo, optou-se por não adicionar tais dados nos resultados.

Até onde sabemos, este é o primeiro estudo que demonstra alteração na expressão sérica do TCF7L2 após a cirurgia bariátrica, bem como suas potenciais associações com o diabetes e a redução de IMC.

Futuros estudos sobre o tema devem abordar a variação na expressão das isoformas e sua relação com a perda ponderal, bem como uma análise do comportamento das mesmas nos pacientes com diabetes e sua possível associação com a resolução do mesmo.

6. CONCLUSÕES

Com um nível de significância de 95% pode-se concluir que:

- 1- Não houve alteração estatisticamente significativa na expressão do TCF7L2 um ano após a cirurgia bariátrica na população estudada como um todo
- 2- Os pacientes diabéticos mostraram expressão aumentada do TCF7L2 em relação aos não diabéticos na avaliação pré-operatória, com redução estatisticamente significativa da mesma após a cirurgia.
- 3- Houve correlação positiva entre a dCt do TCF7L2 e o IMC tanto no pré quanto no pós-operatório na população estudada; no entanto observou-se uma tendência a correlação negativa apenas no grupo diabético na avaliação pré-operatória.
- 4- A redução de IMC foi significativamente associada ao aumento da expressão relativa do TCF7L2 na população estudada.

REFERÊNCIAS

1. Tessier DJ, Eagon JC. Surgical management of morbid obesity. *Curr Probl Surg*. 2008 Feb; 45(2): 68-137.
2. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009: Antropometria e estado nutricional de crianças adolescentes e adultos no Brasil. Comunicação Social. Brasília. 2010 [Internet]. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_encaa/pof_20082009_encaa.pdf
3. Ministério da Saúde, VIGITEL, dados de morbidade autoreferida 2009 [Internet]. Disponível em: <http://www.sbn.org.br/pdf/vigitel.pdf>
4. Gross JL, Silveiro SP, Camargo JL, Reichelt AJ, Azevedo MJ. Diabetes melito: diagnóstico, classificação e avaliação do controle glicêmico. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2002; 46: 16-26.
5. He X, Axelrod JD 2006 A WNTer wonderland in Snowbird. *Development* 133: 2597–2603.
6. Pang DX, Smith AJ, Humphries SE. Functional analysis of TCF7L2 genetic variants associated with type 2 diabetes. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2013 Jun; 23(6): 550-6.
7. Grant SF, Thorleifsson G, Reynisdottir I, Benediktsson R, Manolescu A, Sainz J, et al. 2006 Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 2006 Mar; 38 (3): 320–3.
8. Hindle AK, Brody F, Tevar R, Kluk B, Hill S, McCaffrey T, et al. TCF7L2 expression in diabetic patients undergoing bariatric surgery. *Surg Endosc*. 2009 Apr; 23(4): 700-4.
9. Federação Internacional de Diabetes. Diabetes Atlas. Vol. 2012. Brussels, Belgium: IDF; 2011.
10. Wilmot E, Idris I. Early onset type 2 diabetes: risk factors, clinical impact and management. *Therapeutic Advances in Chronic Disease* 2014 Nov; 5(6): 234-44.
11. D'Adamo E, Caprio S. Type 2 diabetes in youth: epidemiology and pathophysiology. *Diabetes Care*. 2011 May; 34 Suppl 2: S161-5.
12. Resnick HE, Foster GL, Bardsley J, Ratner RE. Achievement of American Diabetes Association clinical practice recommendations among U.S. adults with diabetes, 1999-2002: the National Health and Nutrition Examination Survey. *Diabetes Care*. 2006 Mar; 29(3): 531-7.
13. Buchwald H, Avidor Y, Braunwald E, Jensen MD, Pories W, Fahrbach K, et al. Bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 2004 Oct 13; 292 (14): 1724–37.
14. Wickremesekera K, Miller G, Naotunne TD, Knowles G, Stubbs RS. Loss of insulin resistance after Roux-en-Y gastric bypass surgery: a time course study. *Obes Surg*. 2005 Apr; 15(4): 474-81.

15. Dirksen C, Jørgensen NB, Bojsen-Møller KN, Jacobsen SH, Hansen DL, Worm D, et al. Mechanisms of improved glycaemic control after Roux-en-Y gastric bypass. *Diabetologia*. 2012 Jul; 55(7): 1890-901.
16. Cho YM. A gut feeling to cure diabetes: potential mechanisms of diabetes remission after bariatric surgery. *Diabetes Metab J*. 2014 Dec; 38(6): 406-15.
17. Romero F, Nicolau J, Flores L, Casamitjana R, Ibarzabal A, Lacy A, et al. Comparable early changes in gastrointestinal hormones after sleeve gastrectomy and Roux-En-Y gastric bypass surgery for morbidly obese type 2 diabetic subjects. *Surg Endosc*. 2012 Aug; 26(8): 2231-9.
18. Karns R, Zhang G, Jeran N, Havas-Augustin D, Missoni S, Niu W, et al. Replication of genetic variants from genome-wide association studies with metabolic traits in an island population of the Adriatic coast of Croatia. *Eur J Hum Genet*. 2011 Mar; 19(3): 341-6.
19. Yan Y, North KE, Heiss G, Klein R, Girman CJ, Lange EM, et al. Transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) polymorphism and context-specific risk of impaired fasting glucose in African American and Caucasian adults: the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. *Diabetes Metab Res Rev*. 2010 Jul; 26(5): 371-7.
20. Bouhaha R, Choquet H, Meyre D, Abid Kamoun H, Ennafaa H, Baroudi T, et al. TCF7L2 is associated with type 2 diabetes in nonobese individuals from Tunisia. *Pathol Biol (Paris)*. 2010 Dec; 58(6): 426-9.
21. Stolerman ES, Manning AK, McAteer JB, Fox CS, Dupuis J, Meigs JB, et al. TCF7L2 variants are associated with increased proinsulin/insulin ratios but not obesity traits in the Framingham Heart Study. *Diabetologia*. 2009 Apr; 52(4): 614-20.
22. Sanghera DK, Ortega L, Han S, Singh J, Ralhan SK, Wander GS, et al. Impact of nine common type 2 diabetes risk polymorphisms in Asian Indian Sikhs: PPARG2 (Pro12Ala), IGF2BP2, TCF7L2 and FTO variants confer a significant risk. *BMC Med Genet*. 2008 Jul 3; 9: 59.
23. Salpea KD, Gable DR, Cooper JA, Stephens JW, Hurel SJ, Ireland HA, et al. The effect of WNT5B IVS3C>G on the susceptibility to type 2 diabetes in UK Caucasian subjects. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2009 Feb; 19(2): 140-5.
24. Roth CL, Hinney A, Reinehr T, Schreiner F, Nguyen TT, Müller T, et al. TCF7L2 polymorphism rs7903146 and predisposition for type 2 diabetes mellitus in obese children. *Horm Metab Res*. 2008 Oct; 40(10): 713-7.
25. Ng MC, Park KS, Oh B, Tam CH, Cho YM, Shin HD, et al. Implication of genetic variants near TCF7L2, SLC30A8, HHEX, CDKAL1, CDKN2A/B, IGF2BP2, and FTO in type 2 diabetes and obesity in 6,719 Asians. *Diabetes*. 2008 Aug; 57(8): 2226-33.
26. Saadi H, Nagelkerke N, Carruthers SG, Benedict S, Abdulkhalek S, Reed R, et al. Association of TCF7L2 polymorphism with diabetes mellitus, metabolic syndrome, and markers of beta cell function and insulin resistance in a population-based sample of Emirati subjects. *Diabetes Res Clin Pract*. 2008 Jun; 80(3): 392-8.

27. Tong Y, Lin Y, Zhang Y, Yang J, Zhang Y, Liu H, et al. Association between TCF7L2 gene polymorphisms and susceptibility to type 2 diabetes mellitus: a large Human Genome Epidemiology (HuGE) review and meta-analysis. *BMC Med Genet*. 2009 Feb 19; 10:15.
28. Schafer SA, Tschritter O, Machicao F, Thamer C, Stefan N, Gallwitz B, et al. Impaired glucagon-like peptide-1-induced insulin secretion in carriers of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene polymorphisms. *Diabetologia*. 2007 Dec 50:2443–2450.
29. Franco, LF. And Japanese-Brazilian Diabetes Study Group et al. Variants of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene and incident glucose intolerance in Japanese-Brazilians. *Braz J Med Biol Res* [online]. 2011, vol.44, n.3, pp. 240-244.
30. Marquezine, GF. Papel do polimorfismo rs7903146 do gene TCF7L2 na população brasileira e sua aplicação na predição de risco de diabetes tipo 2 Fonte: São Paulo; s.n; 2009. [72] p. tab, graf. Tese [LILACS ID: 587331]
31. Cauchi S, Choquet H, Gutiérrez-Aguilar R, Capel F, Grau K, Proença C, et al. Effects of TCF7L2 polymorphisms on obesity in European populations. *Obesity (Silver Spring)*. 2008 Feb; 16(2): 476-82.
32. Yi F, Brubaker PL, Jin T. TCF-4 mediates cell type-specific regulation of proglucagon gene expression by β -catenin and glycogen synthase kinase-3 β . *J Biol Chem*. 2005 Jan 14; 280(2): 1457-64.
33. Lyssenko V, Lupi R, Marchetti P, Del Guerra S, Orho-Melander M, Almgren P, et al. Mechanisms by which common variants in the TCF7L2 gene increase risk of type 2 diabetes. *J Clin Invest*. 2007 Aug; 117(8): 2155-63.
34. Holstein A, Hahn M, Körner A, Stumvoll M, Kovacs P. TCF7L2 and therapeutic response to sulfonylureas in patients with type 2 diabetes. *BMC Med Genet*. 2011 Feb 24; 12: 30.
35. Zhou Y, Park SY, Su J, Bailey K, Ottosson-Laakso E, Shcherbina L, et al. *TCF7L2* is a master regulator of insulin production and processing. *Human Molecular Genetics* 2014 Dec 15; 23(24): 6419-6431.
36. Canivell S, Ruano EG, Sisó-Almirall A, Kostov B, González-de Paz L, Fernandez-Rebollo E, et al. Differential methylation of TCF7L2 promoter in peripheral blood DNA in newly diagnosed, drug-naïve patients with type 2 diabetes. *PLoS One*. 2014 Jun 10; 9(6): e99310.
37. Neve B, Le Bacquer O, Caron S, Huyvaert M, Leloire A, Poulain-Godefroy O, et al. Alternative human liver transcripts of TCF7L2 bind to the gluconeogenesis regulator HNF4 α at the protein level. *Diabetologia*. 2014 Apr; 57(4): 785-96.
38. Kaminska D, Kuulasmaa T, Venesmaa S, Käkälä P, Vaittinen M, Pulkkinen L, et al. Adipose tissue TCF7L2 splicing is regulated by weight loss and associates with glucose and fatty acid metabolism. *Diabetes* 2012 Nov; 61 (11): 2807-13.
39. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec; 25(4): 402-8.

APÊNDICE - 1**Ficha de coleta de dados**

Nome: _____

Data: __/__/__ Registro: _____

Telefones/email: _____

Idade: _____ Sexo: F() M()

1. PRÉ-OPERATÓRIOPeso inicial _____ Kg Altura _____ m² IMC _____ Kg/m²

Diabetes T2 (pré-cirurgia): SIM () NÃO ()

Glicemia inicial _____ mg/dl Hb glicada: _____

Expressão TCF7L2 - dCt Antes - _____

2. SEGUIMENTO (01 ANO APÓS)Peso atual _____ Kg IMC atual _____ kg/m²

dCt 01 ano após - _____

ddCt - _____

APÊNDICE - 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável.

Desde logo fica garantido o sigilo das informações. Em caso de recusa você não será penalizado(a) de forma alguma.

Título do Projeto: Alteração na expressão do TCF7L2 em pacientes submetidos à cirurgia bariátrica

Pesquisador Responsável: Carlos Eduardo Soares de Macedo

Telefone para contato: 081 88304286

Pesquisadores participantes: Álvaro Antônio Bandeira Ferraz,

Telefones para contato: 081 21263654

Essa pesquisa tem como objetivo o estudo da expressão de um gene relacionado ao diabetes (TCF7L2) em pacientes obesos que farão a cirurgia e terá o objetivo de melhor compreender os mecanismos associados ao diabetes e a obesidade e a sua resposta ao tratamento cirúrgico. A importância deste trabalho baseia-se no fato de que, tanto a obesidade quanto o diabetes, são doenças crônicas de alta morbidade e o estudo visa prosseguir o conhecimento nesta área, abrindo campo para o desenvolvimento de novas intervenções e aprimorando o nosso conhecimento sobre a doença e as alterações produzidas pela cirurgia.

Caso decida aceitar o convite, solicitamos que o Sr.(a) permita a esta pesquisa acessar suas informações hospitalares, bem como realizar exames ligados à expressão do gene acima citado, antes e após o procedimento cirúrgico. Para isso, o Sr.(a) será submetido(a) ao(s) seguinte(s) procedimentos: Coleta de 5 mL de sangue antes da cirurgia (1 vez) e, novamente, 12 meses após a cirurgia, data que coincidirá com um de seus retornos ao ambulatório para reavaliação da cirurgia, datas em que o Sr.(a) já iria realizar coleta de sangue para exames de rotina para tal cirurgia. Tal procedimento será realizado no Hospital das Clínicas da UFPE. Sua cirurgia será realizada, independente de sua aceitação em participar deste projeto, o que implica esclarecer que esta pesquisa não se responsabiliza por eventuais complicações inerentes ao ato cirúrgico.

Os riscos relacionados com sua participação são relacionados ao sigilo dos dados da pesquisa.

Todas as informações obtidas serão sigilosas e sua identidade não será revelada publicamente em nenhum momento. Os dados serão guardados em pastas individuais para cada participante da pesquisa, num armário localizado na enfermaria de Cirurgia Geral, cujas chaves ficarão sob a responsabilidade do pesquisador. A divulgação dos resultados será feita de forma a não identificar os voluntários. Somente os pesquisadores envolvidos neste projeto terão acesso a essas informações, que serão utilizadas somente para fins de pesquisa. O Sr.(a) não receberá pagamento de nenhum valor econômico por sua participação.

O Sr.(a) ficará com uma cópia deste Termo. Dúvidas a respeito da ética dessa pesquisa poderão ser questionadas ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFPE, no endereço Av. Prof. Moraes Rêgo, s/n, Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50670-901, Tel. 21268588.

♦ CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Declaro que compreendi os objetivos desta pesquisa, como ela será realizada, os riscos e benefícios envolvidos. Acredito ter sido suficientemente esclarecido a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim e declaro que aceito participar do estudo, me submetendo ao exame acima proposto. Estou ciente do exposto acima, autorizando, inclusive, a publicação das informações que forneci em revistas científicas, desde que minha identidade não seja revelada.

Assinatura do participante da pesquisa:

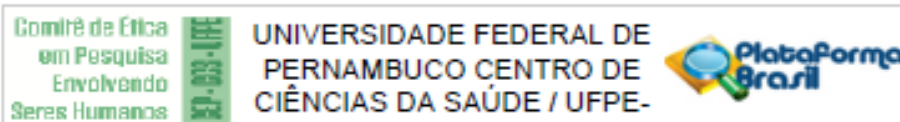
Testemunha 1:

Testemunha 2:

Assinatura do
pesquisador:

Recife, ____ de ____ de ____

ANEXO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Alteração na expressão do TCF7L2 em pacientes submetidos a cirurgia bariátrica

Pesquisador: carlos eduardo soares de macedo

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 01581012.0.0000.5208

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 431.576

Data da Relatoria: 16/10/2013

Apresentação do Projeto:

Trata-se de emenda ao protocolo intitulado Alteração na expressão do TCF7L2 em pacientes submetidos a cirurgia bariátrica, cujo documento nomeado de situação da pesquisa, anexado à Plataforma Brasil em 10/10/13, justifica a necessidade de aumentar a sua amostra de 23 pacientes para 32. A análise estatística com essa justificativa encontra-se destacada no Item 2.2.1 Tamanho da Amostra (página 9 do projeto de pesquisa anexado à Plataforma Brasil em 10/10/13).

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo primário da pesquisa é avaliar de maneira prospectiva os efeitos da perda de peso induzida pelo tratamento cirúrgico da obesidade mórbida na regulação da expressão do TCF7L2, principal gene relacionado ao desenvolvimento do diabetes.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Em relação aos riscos, a participação na pesquisa não envolve riscos adicionais ao procedimento cirúrgico (cirurgia bariátrica).

Como benefício para a sociedade a pesquisa poderá contribuir como já está estabelecido que o tratamento cirúrgico da obesidade mantém a perda de peso sustentada em longo prazo com diminuição das comorbidades associadas e da mortalidade. Toma-se importante prosseguir a

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-800
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 Fax: (81)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br

Comitê de Ética
em Pesquisa
Envolvendo
Serres Humanos



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



Continuação do Parecer: 431.576

Investigação em busca de marcadores genéticos que possam servir como fatores preditivos de resultado ou abrir espaço para novas pesquisas sobre um tema tão prevalente e importante na atualidade. Para a ciência o benefício é identificar e compreender o papel da expressão do TCF7L2 na obesidade e no diabetes e sua possível relação com a resolução dos mesmos após a cirurgia bariátrica.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa apresenta problemática relevante. Os objetivos encontram-se claramente definidos. O método está adequado a atender aos objetivos propostos. Descreve claramente os critérios de inclusão e exclusão da amostra. O projeto foi atualizado sem modificar a essência do projeto original.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de notificação obrigatória foram anexados à Plataforma Brasil.

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Emenda aprovada.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado aprova o parecer da Emenda, tendo a mesma sido avaliada e aprovada e o pesquisador pode continuar a coleta de dados da pesquisa.

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-800
UF: PE Município: RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 Fax: (81)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br

Comitê de Ética
em Pesquisa
Envolvendo
Serres Humanos



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



Continuação do Parecer: 431.576

RECIFE, 22 de Outubro de 2013

Assinado por:

GERALDO BOSCO LINDOSO COUTO
(Coordenador)

Endereço: Av. de Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
UF: PE Município: RECIFE
Telefone: (81)2128-8588 Fax: (81)2128-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br