

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CLÍNICA MÉDICA
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

NATHALIA MOLINA DUVAL DA SILVA

**EXPRESSÃO DA PROTEÍNA QUINASE ATIVADA POR AMP E SIRTUINA 1 EM
PACIENTES SUBMETIDOS À CIRURGIA BARIÁTRICA**

Porto Alegre
2013

NATHALIA MOLINA DUVAL DA SILVA

**EXPRESSÃO DA PROTEÍNA QUINASE ATIVADA POR AMP E SIRTUINA 1 EM
PACIENTES SUBMETIDOS À CIRURGIA BARIÁTRICA**

**Dissertação apresentada como requisito para obtenção
do Grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em
Medicina e Ciências da Saúde da Pontifícia
Universidade Católica do Rio Grande do Sul.**

Orientador: Prof. Dr. Vinicius Duval da Silva

Porto Alegre

2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO

S586e Silva, Nathalia Molina Duval da

Expressão da proteína quinase ativada por AMP e sirtuina 1 em pacientes submetidos à cirurgia bariátrica / Nathalia Molina Duval da Silva. Porto Alegre: PUCRS, 2013.

94 f.: fig.; tab. Inclui artigo científico submetido para publicação no periódico Hepatology.

Orientador: Prof. Dr. Vinicius Duval da Silva.

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Área de concentração: Clínica Médica.

1. OBESIDADE. 2. SÍNDROME METABÓLICA. 3. SIRTUINA-1. 4. AMPK. 5. ESTUDO DE COORTE HISTÓRICO. I. Silva, Vinicius Duval da. II. Título.

CDD 617.43
CDU 616.341-089 (043.3)
NLM WD 210

Aos meus pais, que me deram muito além da vida, da saúde e da educação. A vocês devo tudo o que sou e que conquistei. Obrigada por ensinar-me a lutar e persistir sempre, por me tornar um ser humano digno. Esta conquista, mais do que minha, é de vocês.

À minha irmã. Sem ti os percursos da vida certamente seriam muito mais complicados. Obrigada por participar das minhas escolhas, das minhas conquistas e por me apoiar nos momentos difíceis.

Amo vocês.

*Ao Prof. Dr. Vinicius Duval da Silva, meu primo.
Tens toda a minha admiração e respeito. Pelo exemplo
de pessoa e pela dedicação à profissão. Obrigada
pelo estímulo, apoio e confiança constantes.*

AGRADECIMENTOS

À **Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul**, em especial ao **Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde**, pela oportunidade de realizar o curso de Mestrado e pela infra-estrutura.

Ao **Corpo Docente** do Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Minha gratidão pelos ensinamentos e convívio.

Aos **Prof. Dr. Cláudio Corá Mottin**, chefe do Centro da Obesidade e Síndrome Metabólica do HSL da PUCRS, pelos dados disponibilizados dos seus pacientes.

Ao **Tiago Giulianni**, técnico em histologia, por todo apoio nos procedimentos histológicos.

Aos acadêmicos **Thomas Dal Bem Prates** e **Laura V. Pozza** pela cooperação na execução deste trabalho.

A todos os meus **amigos** que de alguma forma, alguns talvez até mesmo sem saber, colaboraram para mais esta conquista na minha vida e compreenderam as minhas ausências. Especialmente à **Gabriella Ferrugem Manfroi**, que percorreu comigo esta trajetória desde o início, com apoio e incentivo constantes, sendo por diversos momentos meu exemplo de luta e perseverança.

Aos meus **colegas de trabalho da CASSI**, que acompanharam principalmente a etapa final deste trabalho, sempre me apoiando e estimulando.

Aos **colegas do curso de Mestrado e Doutorado** que cruzaram por mim nesta jornada e tornaram-se cúmplices nestes dois anos de estudos.

RESUMO

Objetivo: avaliar a expressão da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) e sirtuina-1 (SIRT-1) em amostras histológicas hepáticas de pacientes no transoperatório e um ano após a realização da cirurgia bariátrica. Avaliar a associação entre a expressão dessas proteínas com o peso, Índice de Massa Corporal (IMC) e parâmetros bioquímicos (glicose, colesterol total, HDL e triglicerídeos).

Metodologia: a expressão das proteínas foi verificada através de imunistoquímica e quantificada por método de microscopia por análise de imagem digital. As demais informações foram acessadas em banco de dados.

Resultados: as biópsias hepáticas de 44 pacientes submetidos à cirurgia bariátrica foram analisadas. 31 (70.5%) eram de mulheres e 13 (29.5%) eram de homens. A média de idade foi de 37.18 ± 11.26 anos. A média do peso pré-operatório foi de 127.29 ± 27.10 kg, reduzindo para 82.00 ± 19.94 kg no pós-operatório. Com essa redução significativa, o IMC médio também reduziu, retirando os pacientes da classificação de obesidade grau III para sobrepeso. As médias dos parâmetros bioquímicos também apresentaram melhora importante, com exceção do HDL, que não teve alteração significativa. Em relação à SIRT-1 foram encontradas médias de $128.80\mu\text{m}^2$ nas biópsias do transoperatório e de $306.68\mu\text{m}^2$ nas biópsias realizadas um ano após ($p= 0.0069$). Já a AMPK teve médias de $4166.10\mu\text{m}^2$ e $2718.70\mu\text{m}^2$, respectivamente ($p=0.0028$).

Conclusão: a expressão da SIRT-1 aumentou e a da AMPK diminuiu nas biópsias hepáticas pós-operatórias, ambas de forma significativa. O padrão de expressão encontrado acompanhou os resultados de melhorias no peso, IMC e perfil de biomarcadores que são associados ao desenvolvimento de co-morbidades, verificados também verificados após o período de um ano.

Palavras-chave: Sirtuina-1, AMPK, Obesidade e Síndrome Metabólica.

ABSTRACT

Objective: to evaluate the expression of AMP-activated protein kinase (AMPK) and Sirtuin-1 (SIRT-1) in liver tissue samples from patients during bariatric surgery and one year after the procedure. To evaluate the association between the expression of these proteins with weight, Body Mass Index (BMI) and biochemical parameters (glucose, total cholesterol, HDL and triglycerides).

Methods: the expression of the proteins was verified by immunohistochemistry and quantified by digital image analysis. All other data were accessed in the database.

Results: liver biopsies of 44 patients submitted to bariatric surgery were analyzed. 31 (70.5%) were women and 13 (29.5%) were men. The mean age was 37.18 ± 11.26 years. The mean preoperative weight was 127.29 ± 27.10 kg, decreasing to 82.00 ± 19.94 kg postoperatively. With this significant reduction, the mean BMI also reduced by removing the patient's classification from obesity grade III to overweight. The mean biochemical parameters also showed significant improvement, with the exception of HDL, which showed no significant change. SIRT-1 expression had a mean value of $128.80\mu\text{m}^2$ in the intraoperative biopsies and $306.68\mu\text{m}^2$ in the biopsies performed one year after ($p = 0.0069$). And AMPK had mean values of $4166.10\mu\text{m}^2$ and $2718.70\mu\text{m}^2$ respectively ($p = 0.0028$).

Conclusion: the present study showed an increased expression of SIRT-1 and a decrease in the expression of AMPK in postoperative liver biopsies. This pattern of expression accompanied improvements in weight, BMI and the profile of biomarkers that are associated with the development of co-morbidities also verified one year after surgery.

Keywords: Sirtuin-1, AMPK, Obesity, Metabolic Syndrome.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Parênquima hepático mostrando positividade nuclear na maior parte dos hepatócitos da imagem. SIRT-1, DAB, 100X.40
- Figura 2. Parênquima hepático mostrando positividade citoplasmática na maior parte dos hepatócitos da imagem. AMPK, DAB, 100X.40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Perfil dos pacientes no pré e pós-operatório	36
Tabela 2 - Análise das diferenças pareadas entre o pré e pós-operatório	37
Tabela 3 – Quantificação da SIRT-1 nas biópsias hepáticas em μm^2	37
Tabela 4 – Quantificação da AMPK nas biópsias hepáticas em μm^2	38

LISTA DE SIGLAS

ADP	Adenosina Difosfato
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP - <i>AMP-activated protein kinase</i>
ATP	Adenosina Trifosfato
BPGYR	<i>Bypass</i> gástrico em Y de Roux
CNTF	Fator neutrófico ciliar
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
FOXO	<i>Forkhead box transcriptional factor class O</i> : fator de sinalização
HDACs	Histonas desacetilases
HDL	Lipoproteínas de alta densidade
HSL	Hospital São Lucas
IGF-I	<i>Insulin growth factor I</i>
IMC	Índice de Massa Corporal
STK11/LKB1	Serina / treonina quinase
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NAM	Nicotinamida
p53	proteína 53 - gene supressor tumoral
PGC-1 α	Co-ativador-1 α - <i>peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1 alpha</i>
PPAR γ	Receptor nuclear peroxissoma proliferador ativado gama - <i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Sir2	<i>Silent information regulator</i>
SIRT-1	Sirtuina 1 - <i>Sirtuin 1</i>
UCP2	Proteína desacopladora 2 - <i>Uncoupling protein 2</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 Sirtuina 1	16
2.1.1 Regulação dos níveis de SIRT-1	16
2.1.2 SIRT-1 e funções fisiológicas	17
2.2 Proteína Quinase Ativada por AMP	20
2.2.1 Regulação dos níveis de AMPK	21
2.2.1.1 Regulação dos níveis de AMPK por citocinas	21
2.2.1.2 Regulação dos níveis de AMPK por drogas e xenobióticos	22
2.2.2 AMPK e funções fisiológicas	22
2.2.2.1 Efeitos da ativação da AMPK na homeostase de glicose	23
2.3 Cirurgia Bariátrica	24
2.3.1 Técnicas cirúrgicas	25
2.3.2 Resultados do tratamento cirúrgico	27
2.4 AMPK, SIRT-1 e Cirurgia Bariátrica	27
3 JUSTIFICATIVA	29
4 HIPÓTESE	30
5 OBJETIVOS	31
5.1 Objetivos Primários	31
5.2 Objetivos Secundários	31
6 METODOLOGIA	32
6.1 Delineamento	32
6.2 Coleta de dados	32
6.3 Amostra	32
6.3.1 Critérios de inclusão	33
6.3.2 Critérios de exclusão	33
6.4 Métodos	33
6.4.1 Análise imunoistoquímica	33

6.4.2 Análise digital das imagens	34
6.5 Análise dos dados	35
6.6 Aspectos éticos	35
7 RESULTADOS	36
8 DISCUSSÃO	41
CONCLUSÕES	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
ARTIGO ORIGINAL EM PORTUGUÊS	55
ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS	74
ANEXO A. Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS.....	92
ANEXO B. Acordo de confidencialidade do estudo AVABAR/ARPCBB.....	94

1 INTRODUÇÃO

A sirtuina-1 (SIRT-1) é amplamente transcrita em tecidos de mamíferos, tendo seus níveis aumentados após a restrição calórica ou jejum, em locais como fígado, músculo esquelético e tecido adiposo (Hursting, Berger, 2010; Yang *et al.*, 2006; Silva, Wahlestedt, 2010).

A expressão da SIRT-1, bem como sua atividade estão relacionadas aos níveis de nutrientes, por este motivo ela é considerada um sensor metabólico. Desta forma, ela desempenha um papel fundamental na regulação de processos metabólicos e fisiológicos críticos (Silva, Wahlestedt, 2010; Cakir *et al.*, 2009; Chung *et al.*, 2010) como, por exemplo, no metabolismo da glicose, dos lipídios (Picard, Kurtev *et al.*, 2004), e na secreção de insulina (Guarente 2006), assim como na regulação do consumo de oxigênio e na capacidade mitocondrial (Hursting, Berger, 2010).

A proteína quinase ativada por AMP (AMPK) também é um sinalizador celular metabólico (Hardie, 2007), que participa do processo da homeostase energética celular e corporal, pois media a adaptação celular a variações nutricionais e ambientais (Viollet, Lantier *et al.*, 2009).

A sua ativação determina uma ampla variedade de efeitos fisiológicos, principalmente nas vias metabólicas dos lipídios e da glicose, que ocorre através do estresse celular (consequência de situações como a privação alimentar e a prática de exercícios) além da sua expressão ser regulada por determinados hormônios e nutrientes (Peng *et al.*, 2010; Steinberg, Kemp, 2009).

A obesidade é uma doença crônica metabólica de prevalência crescente, que vem adquirindo proporções epidêmicas, representando um dos principais problemas de saúde pública (Bavaresco *et al.*, 2008; SBCBM, 2011). O aumento da prevalência da obesidade é um problema mundial. Atualmente há 1,46 bilhões de adultos com excesso de peso. Destes, 502 milhões são obesos e estima-se que 170 milhões de crianças menores que 18 anos estejam obesas ou com sobrepeso (Swinburn *et al.*, 2011). Dados brasileiros indicam que 48% da população apresenta excesso de peso. Destes, 16% são obesos, sendo mais prevalente no sexo masculino. Em Porto Alegre, a prevalência é ainda maior, com 55% das pessoas apresentando excesso de peso e 20% com obesidade (IBGE, 2010).

Tratamentos que preconizam modificações do estilo de vida e intervenções farmacológicas, muitas vezes são pouco eficazes, então a indicação do tratamento cirúrgico se impõe e a cirurgia bariátrica vem sendo utilizada cada vez mais com o principal objetivo de perda de peso e conseqüente melhoria da qualidade de vida para estes pacientes, minimizando os riscos da mortalidade precoce (SBCBM, 2011) (Bavaresco *et al.*, 2008).

No período pós-cirúrgico as co-morbidades melhoram de forma significativa, com melhora importante do perfil lipídico e redução significativa nos níveis e incidência da Diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Diversos estudos demonstram melhora nos níveis de glicemia, triglicerídeos, redução da incidência de DM2, melhora da hipercolesterolemia, entre outras conseqüências positivas (Sjöström *et al.*, 2004; Service *et al.*, 2005; Christou *et al.*, 2004; Rizzolli *et al.*, 2004; Rizzolli, Mottin, 2001; Rizzolli *et al.*, 2007; Bavaresco *et al.*, 2008).

Diante dos importantes papéis metabólicos da SIRT-1 e AMPK, torna-se cada vez mais evidente que modular as suas atividades através de drogas seja, no futuro, uma possível alternativa na prevenção e terapêutica de patologias como a obesidade, resistência à insulina, DM2 e em desordens metabólicas associadas (Santomauro *et al.*, 2008; Camins *et al.*, 2010; Peng *et al.*, 2010; Hardie, 2011).

O objetivo deste estudo foi analisar a expressão da AMPK e SIRT-1 em amostras histológicas hepáticas de pacientes antes e após a realização de cirurgia bariátrica, e verificar uma possível associação entre a expressão destas enzimas, peso, Índice de Massa Corporal (IMC) e parâmetros bioquímicos (glicose, colesterol total, HDL e triglicerídeos).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Sirtuina 1

As sirtuinas pertencem a uma família de proteínas desacetilases, que atuam através de um mecanismo nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) – dependente que regulam a expressão gênica em uma variedade de organismos por desacetilação de resíduos modificados de lisina sobre histonas, fatores de transcrição e outras proteínas, em uma reação que consome NAD⁺, liberando nicotinamida (NAM), O-acetil ADP ribose, e o substrato desacetilado. Elas estão envolvidas na regulação do envelhecimento, na sinalização endócrina, na transcrição e em outros processos (Hursting, Berger, 2010; Yang *et al.*, 2006; Kume *et al.*, 2010).

Sete sirtuinas (SIRT 1-7) foram identificadas em mamíferos e, além de serem divididas em quatro diferentes classes, baseadas no seu domínio central, também diferem na sua localização dentro da célula. SIRT-1, SIRT-6 e SIRT-7 encontram-se predominantemente no núcleo. As sirtuinas que tem maior predominância no citoplasma são SIRT-2, SIRT-3, SIRT-4 e SIRT-5, que são consideradas sirtuinas mitocondriais. Atualmente, a mais estudada e conhecida é a SIRT-1 (Camins *et al.*, 2010; Qiu *et al.*, 2010) (Michan and Sinclair 2007).

A SIRT-1 é uma proteína descrita recentemente, identificada como o homólogo humano da Sir2 (em inglês, *silent information regulator 2*), sendo encontrada em leveduras, que pertence a uma família de histonas desacetilases (HDACs). A SIRT-1 tem efeitos em alterações metabólicas associadas com a obesidade, longevidade e em outros processos de envelhecimento (Hursting, Berger, 2010; Kume *et al.*, 2010; Camins *et al.*, 2010). O gene SIRT-1 localiza-se no cromossomo humano 10q21.3 (Voelter-Mahlknecht S, Mahlkecht U, 2006).

2.1.1 Regulação dos níveis de SIRT-1

A SIRT-1 é amplamente transcrita em tecidos de mamíferos, tendo seus níveis aumentados após a restrição calórica ou jejum, sendo demonstrado também um aumento da atividade e das concentrações de NAD⁺, em locais como fígado, músculo esquelético e tecido adiposo, promovendo a sobrevivência a longo prazo

das células (Hursting, Berger, 2010; Yang *et al.*, 2006; Silva, Wahlestedt, 2010). A SIRT-1 foi associada à restrição calórica em diversos modelos experimentais (Lin, Defossez *et al.*, 2000; Lin, Ford *et al.*, 2004; Cohen, Miller *et al.*, 2004; Rodgers, Lerin *et al.*, 2005; Chen, Bruno *et al.*, 2008; Fulco, Cen *et al.*, 2008).

A expressão da SIRT-1, bem como sua atividade, são sensíveis aos níveis de nutrientes, por este motivo ela é considerada um sensor metabólico. Desta forma, ela desempenha um papel fundamental na regulação de processos metabólicos e fisiológicos críticos, regulando diversos alvos moleculares (Silva, Wahlestedt, 2010; Cakir *et al.*, 2009; Chung *et al.*, 2010).

Diferentes autores sugerem que a modulação das sirtuínas seja no futuro, um possível caminho para aliviar os efeitos e complicações do envelhecimento (Michan e Sinclair, 2007; Westphal *et al.*, 2007; Yamamoto *et al.*, 2007; Gan *et al.*, 2008; Milne *et al.*, 2008; Outeiro *et al.*, 2008) como o diabetes, o câncer, as doenças cardiovasculares e neurodegenerativas. Vários estudos vêm reportando a modulação de sirtuínas em diferentes modelos experimentais, variando de culturas de células e leveduras a roedores (Howitz *et al.*, 2003; Baur *et al.*, 2006; Lagouge *et al.*, 2006; Nedachi *et al.*, 2008).

2.1.2 SIRT-1 e funções fisiológicas

A SIRT-1 vem sendo associada à regulação do metabolismo dos lipídios e da glicose através da desacetilação de alvos como peroxissoma proliferador ativado gama (PPAR- γ) e PGC1 α (em inglês *peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1 alpha*). O papel desta enzima na regulação de lipídios foi sugerido por esta atuar como uma inibidora do receptor do PPAR- γ , um regulador transcricional em resposta a insulina em tecido adiposo branco, além de ser considerado elemento essencial na diferenciação dos adipócitos e armazenamento de gordura (Picard, Kurtev *et al.*, 2004). Assim, a ativação de SIRT-1 suprime genes envolvidos na adipogênese (armazenamento de gordura) e promove a mobilização da gordura do tecido adiposo branco para ser utilizada por outros tecidos. No músculo, a SIRT-1 ativa o PGC-1 α , um regulador mestre na biogênese mitocondrial e oxidação dos ácidos graxos (Qiu *et al.*, 2010).

Outro mecanismo regulatório associado ao metabolismo de lipídios se refere à expressão de adiponectina. Esta se dá através da desacetilação de FOXO1 (em

inglês, *Forkhead box transcriptional factor class O*) que melhora sua associação com o cofator C/EBP α , formando um complexo e, ativando a expressão de adiponectina (Qiao and Shao 2006), reguladora de sensibilidade à insulina e oxidação de ácidos graxos.

A enzima SIRT-1 também atua como reguladora do metabolismo da glicose e da secreção de insulina. Este processo regulatório pode ocorrer em três diferentes tecidos, afetando diferentes alvos: hepático, pancreático e muscular (Guarente 2006).

O fígado tem um papel central na manutenção da homeostase energética e da glicose. O metabolismo pós-absortivo garante a síntese de glicose via gliconeogênese e glicogenólise para manter os níveis sanguíneos de glicose. No tecido hepático, a SIRT-1 promove a gliconeogênese pela desacetilação e ativação do PPAR- γ , o co-ativador de transcrição PGC-1 α , este que é ativado após restrição calórica ou privação nutricional. O fator de transcrição FOXO1 também faz parte do processo de regulação de genes envolvidos na gliconeogênese (Rodgers and Puigserver 2007). Então a regulação de glicose hepática através da SIRT-1 não é um processo simples, estando relacionado a mais de uma via (Guarente 2006).

Atividades da SIRT-1, como o seu efeito sobre a gliconeogênese e produção de glicose em resposta à restrição calórica, parecem ser tão importantes para a sobrevivência, que sua ausência provoca diversos efeitos e reduz a sobrevivência (Longo, 2009).

Além disso, o aumento dos níveis de SIRT-1 atenua a indução de esteatose hepática devido ao alto teor de gordura e a redução dos seus níveis no fígado leva à redução da expressão de genes envolvidos no efluxo e degradação do colesterol (Kume *et al.*, 2010; Cakir *et al.*, 2009; Chung *et al.*, 2010; Gomes-Valadés *et al.*, 2008).

Da mesma forma, PGC-1 α ativa genes envolvidos não só na gliconeogênese, mas também na biogênese mitocondrial, oxidação de ácidos graxos e respiração. Portanto, a regulação de PGC-1 α por SIRT-1 poderia influenciar na homeostase da glicose e de lipídios (Rodgers and Puigserver 2007). Sendo assim, SIRT-1 pode ser um importante alvo para regulação de glicemia e lipidemia.

Em células pancreáticas, Chung *et al.*, em 2010, demonstraram que a SIRT-1 modula a sinalização de ATP-glicose e secreção de insulina nas células- β , principalmente através da regulação da proteína desacopladora 2 (UCP2), FOXO3 e

vias NAD⁺-dependentes. O aumento da expressão de SIRT-1 no pâncreas melhora a tolerância à glicose e aumenta a secreção de insulina em resposta à glicose. Segundo Bordone, Motta *et al.*, a UCP2 codifica uma proteína de membrana mitocondrial que desregula a síntese de ATP. Possivelmente a supressão do UCP2 pela SIRT-1 aumenta a eficiência da síntese de ATP em células- β em resposta à glicose, regulando positivamente a secreção de insulina.

Conforme Yang *et al.*, existem evidências de que a SIRT-1 modula a sinalização de insulina interagindo através do fator IGF-I (em inglês, *insulin growth factor I*) sinalizando a via no *Caenorhabditis elegans* e em camundongos. A via de sinalização do IGF-I é ativada por nutrientes, e a diminuição dessa sinalização através deste percurso aumenta duração da vida em *C. elegans* e em camundongos. Diante disso, alguns pesquisadores têm sugerido que alterar a atividade da SIRT-1 pode ser uma nova e promissora terapia para a obesidade e a DM2 (Camins *et al.*, 2010).

Foi demonstrado que a SIRT-1 desempenha um papel na regulação da adiponectina, na secreção e sensibilidade a insulina, nos níveis de glicemia, assim como na regulação do consumo de oxigênio e na capacidade mitocondrial (Hursting, Berger, 2010).

A SIRT-1 também participa do processo da regulação de câncer e apoptose. Entretanto, o seu papel na regulação desses processos biológicos ainda é controverso, necessitando um maior esclarecimento para ser utilizado em estratégia terapêutica como proteína alvo.

São observadas diferentes respostas nestes eventos celulares. O gene p53 está envolvido em mais da metade dos tumores humanos é um supressor tumoral que exerce efeitos anti-proliferativos (Vogelstein, Lane *et al.*, 2000). A SIRT-1 tem a capacidade de desacetilar a proteína p53 e inibir a apoptose, desta forma favorecendo o desenvolvimento da carcinogênese em diferentes tipos de câncer como carcinomas de próstata, pele, cólon e leucemias (Yi and Luo, 2010).

Em contra partida, alguns estudos indicam que o aumento na regulação de SIRT-1 pode atuar como supressor de tumor, impedindo o processo de carcinogênese, através da inibição da β -catenina e survivina. Essa condição é observada em câncer de mama, em carcinoma hepático e em neoplasia prostática intra-epitelial (Powell, Casimiro *et al.*, 2010).

Assim como a SIRT-1 regula vários processos fisiológicos e atua em diferentes alvos, estudos vêm demonstrando que esta enzima também possui alguns mecanismos de regulação e sugerem que estes possam ser regulados em três níveis: transcricional, pos-transcricional e de tradução (Kwon and Ott 2008). A regulação transcricional, na maioria das vezes, está associada a um agente estressor como restrição calórica (Howitz, Bitterman *et al.*, 2003; Picard, Kurtev *et al.*, 2004) e estresse oxidativo.

2.2 Proteína Quinase Ativada por AMP

A AMPK é um sinalizador celular metabólico serina/treonina quinase e da taxa de energia do AMP / ATP (adenosina trifosfato) presente em todos os eucariontes (Hardie, 2007). Este composto participa do processo da homeostase energética celular e corporal, pois media a adaptação celular a variações nutricionais e ambientais (Viollet, Lantier *et al.*, 2009). Esta enzima é um complexo heterotrimérico que consiste em uma subunidade catalítica α e subunidades regulatórias β e γ com múltiplos genes que codificam cada uma das subunidades (Hardie, 2007), que são facilmente reconhecidas em outros reinos eucarióticos (plantas, fungos e protistas) (Hardie, 2011).

Os animais obtêm energia proveniente da oxidação de compostos reduzidos de carbono contidos nos alimentos e utilizam-nos para sintetizar ATP a partir de ADP (adenosina difosfato). A consequência da aumentada relação entre ATP/ADP mobiliza a maioria das reações que requerem energia que ocorrem nas células. É essencial que o processo de produção e consumo de ATP esteja em equilíbrio, o que é obtido através da ação de sistemas regulatórios, que incluem a AMPK (Hardie, 2011).

Algumas das funções da AMPK são manter os estoques de energia e melhorar o metabolismo oxidativo. A sua ativação determina uma ampla variedade de efeitos fisiológicos, incluindo o aumento da captação de glicose pelos músculos esqueléticos (através dos transportadores de glicose GLUT1 e GLUT4) e aumento do catabolismo de lipídios. Essa ativação ocorre através do estresse celular, que é consequência de situações como a privação alimentar e a prática de exercícios, além da sua expressão ser regulada por determinados hormônios e nutrientes (Peng *et al.*, 2010; Steinberg, Kemp, 2009).

Esta proteína controla o metabolismo de lipídios e glicose através da fosforilação direta de seus substratos e controle indireto sobre transcrição gênica. Por isso, pode ser um alvo potencial na prevenção e terapêutica do DM2, e também no contexto de desordens metabólicas associadas (Peng *et al.*, 2010; Santomauro *et al.*, 2008).

2.2.1 Regulação dos níveis de AMPK

A AMPK é ativada mediante a um aumento na razão entre AMP e ATP, que reflete o *status* energético da célula. Geralmente a ativação está associada a situações onde a síntese de ATP está comprometida e os níveis de AMP estão aumentados. Em situações como hipóxia, isquemia, baixa disponibilidade de nutrientes, ou em momentos onde o consumo de ATP está aumentado, como durante o exercício ou jejum. Um estudo recente que aborda aspectos estruturais e bioquímicos revelou que, independente do AMP, a ativação de ADP também pode contribuir para o estímulo da AMPK (Cantó and Auwerx, 2011). A atividade da AMPK também é modulada por hormônios e citocinas, que regulam o balanço energético, como adiponectina, leptina (Fay, Steele, *et al.*, 2009), grelina, canabinóides, interleucina-6 e fator neutrófico ciliar (CNTF) (Hardie, 2007).

2.2.1.1 Regulação dos níveis de AMPK por citocinas

A leptina, que é liberada dos adipócitos, estimula a AMPK no músculo esquelético, o que explica como ela ativa a oxidação de gordura e o gasto energético. Já no hipotálamo, foi relatado que a leptina inibe a AMPK, o que possivelmente esclarece como ela suprime o consumo alimentar. Embora algumas funções da leptina no hipotálamo pareçam aparentemente normais na ausência de AMPK, outras vias que estimulam o consumo alimentar, como grelina, canabinóides e hipoglicemia, ativam a AMPK no hipotálamo (Hardie, 2011), indo ao encontro do conceito de que a AMPK representa um antigo sistema de resposta à fome (Hardie, 2007). A adiponectina, que também é liberada dos adipócitos, mas tem uma concentração plasmática que é paradoxalmente aumentada em indivíduos magros, reduz os níveis de glicose plasmática através da ativação da AMPK no fígado (Hardie, 2011).

2.2.1.2 Regulação dos níveis de AMPK por drogas e xenobióticos

A atividade ou a regulação dos níveis de AMPK também podem ser moduladas por meio de medicamentos utilizados no tratamento do DM2, como a metformina¹⁰ (Hardie, 2007). Esta droga é prescrita para mais de 100 milhões de pacientes em todo o mundo. Já foi demonstrado em estudos em camundongos que ela ativa a AMPK, sendo esse processo de ativação hepática da AMPK essencial para os efeitos anti-hiperglicêmicos do medicamento (Hardie, 2011).

Outra grande classe de drogas anti-diabéticas é chamada de tiazolidinedionas, que também ativa a AMPK. O principal alvo terapêutico desta parece ser o receptor nuclear PPAR- γ . A ativação da AMPK ocorre através de efeitos autônomos na célula e efeitos indiretos que envolvem a liberação de adiponectinas (Hardie, 2011).

Muitos xenobióticos derivados de plantas, que também são considerados como tendo propriedades benéficas para a saúde (prevenção da obesidade e resistência à insulina, e aumento do tempo de vida), têm sido relatados como ativadores da AMPK. Isso inclui o resveratrol (presente nas uvas e no vinho tinto), epigalotequina-3-galato (presente no chá verde), capsaicina contida na pimenta, berberina (corante amarelo utilizado na medicina tradicional chinesa) e quercitina (Hardie, 2011). Na maioria dos casos, o mecanismo pelo qual esses agentes ativam a AMPK permanece nuclear (Hardie, 2007).

2.2.2 AMPK e funções fisiológicas

A AMPK originalmente evoluiu como um mecanismo para responder à privação alimentar, e seu papel parece ter sido adaptado ao longo da evolução de organismos eucariontes multicelulares para que ela se tornasse sensível ao *status* energético da célula, assim como a hormônios e citocinas, que regulam o balanço energético corporal (Hardie, 2007).

Mediante a sua ativação, a AMPK aciona vias que geram ATP (catabólicas), para normalizar os níveis de ATP. A curto prazo esse processo ocorre através da promoção / estimulação da glicólise e oxidação de ácidos graxos e, a longo prazo, através do aumento da capacidade mitocondrial e o uso dos seus substratos como

fonte energética. Além disso, ocorre a inibição de processos anabólicos, que consomem ATP, e que não são necessários para a sobrevivência imediata da célula (Cantó and Auwerx, 2011). Provocando a diminuição da síntese de ácidos graxos no fígado e nos adipócitos, esteróis, secreção de insulina pelas células- β , glicogênio, proteínas no fígado e músculo. A AMPK afeta o controle tanto pela fosforilação de alvos protéicos como, indiretamente, através da regulação da transcrição (Fay, Steele *et al.*, 2009).

A AMPK atua como o maior controlador do metabolismo mitocondrial através da promoção da oxidação mitocondrial de substratos lipídicos e biogênese mitocondrial através da forma de transcrição (Cantó and Auwerx, 2011). Esta proteína também pode modular a transcrição de genes específicos envolvidos no metabolismo energético, desse modo, exercendo controle metabólico a longo prazo (Viollet, Lantier *et al.*, 2009).

Devido às suas funções, foi primeiramente sugerido por Winder e Hardie, em 1999, que AMPK é um interessante alvo terapêutico para intervenção em diversas condições de distúrbios do balanço energético, incluindo DM2 e resistência à insulina.

2.2.2.1 Efeitos da ativação da AMPK na homeostase de glicose

Ao longo dos avanços nas pesquisas com AMPK, torna-se cada vez mais claro que os ativadores da AMPK podem ser úteis como drogas para tratar a resistência à insulina e DM2. Assim, AMPK aumenta intensamente a captação de glicose muscular através de um mecanismo que continua funcional em indivíduos com resistência à insulina e também aumenta a expressão de GLUT4 de modo que a insulina promove melhor captação de glicose pelo músculo mesmo sem mudanças na sensibilidade à insulina. AMPK também promove o metabolismo de glicose através do aumento da biogênese mitocondrial, que é relevante devido ao fato de que indivíduos com risco de desenvolverem DM2 parecem ter um relativo déficit na função mitocondrial. Outro mecanismo pelo qual AMPK poderia aumentar a sensibilidade à insulina seria através da oxidação de ácidos graxos e reduzindo o armazenamento de triglicerídeos; elevadas quantidades de triglicerídeos musculares estão associadas à resistência à insulina. Finalmente, uma importante fonte sobre as elevadas concentrações de glicose em pacientes com DM2 é a alta produção de

glicose hepática, que a AMPK inibe através da inibição de vias gliconeogênicas (Hardie, 2011).

2.3 Cirurgia Bariátrica

A cirurgia bariátrica (do grego *barios* “peso”, *iatrikos* “a arte da cura”) vem sendo estudada e aplicada como alternativa para o tratamento da obesidade desde a década de 1950. A partir de então, técnicas foram testadas e aperfeiçoadas, porém algumas foram abdicadas devido às intercorrências graves que surgiam no período pós-operatório (Leite, Rodrigues, 2002; Payne, DeWind, 1969).

Atualmente, a cirurgia bariátrica é considerada o instrumento mais eficaz disponível para o tratamento e controle da obesidade mórbida, através da perda de peso e conseqüente melhoria da qualidade de vida para esses indivíduos (Bavaresco *et al.*, 2008).

A obesidade é uma doença crônica metabólica de prevalência crescente, que vem adquirindo proporções epidêmicas, representando um dos principais problemas de saúde pública da sociedade moderna (Bavaresco *et al.*, 2008; SBCBM, 2011). Dados da Pesquisa de Orçamentos Familiares do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2010) apontam a região sul do país com mais homens e mulheres obesas (15,9 e 19,6%, respectivamente) do que nas demais regiões. Esta pesquisa também constatou que as prevalências de obesidade vêm crescendo continuamente de 1974 a 2009. Os níveis aumentaram em mais de quatro vezes para os homens (de 2,8% para 12,4%) e em mais de duas vezes para as mulheres (de 8,0% para 16,9%).

Indivíduos caracterizados como obesos mórbidos são aqueles que apresentam Índice de Massa Corporal (IMC) $\geq 40\text{kg/m}^2$ (obesidade grau III), ou indivíduos com IMC $\geq 35\text{kg/m}^2$ (obesidade grau II) e que apresentam co-morbidades de importância clínica, como hipertensão arterial sistêmica, DM2, dislipidemias, esteatose hepática, doenças cardiovasculares, entre outras doenças crônicas (Bavaresco *et al.*, 2008; SBCBM, 2011).

Segundo dados da Sociedade Brasileira de Cirurgia Bariátrica e Metabólica (SBCBM, 2011), 2% dos homens e 4% das mulheres brasileiras apresentam obesidade mórbida, sendo predominante na faixa etária dos 46 aos 55 anos. Além

disso, 11% dos homens e 14% das mulheres já apresentam algum grau de obesidade.

Na região sul do país, 3% dos homens e 7% das mulheres estão classificados como obesos mórbidos, sendo que as mulheres da região sul só perdem para as mulheres da região centro-oeste, que tem seus níveis registrados em 8%. E os homens do sul do país ficam em primeiro lugar somente junto com os homens da região norte (SBCBM, 2011).

A cirurgia bariátrica vem sendo utilizada cada vez mais nos últimos anos com o principal objetivo de minimizar os riscos da mortalidade precoce em pacientes obesos mórbidos. Somente em 2010 foram realizadas 60.000 cirurgias bariátricas no país, o que mostra uma alta de 275% em relação a 2003, ano em que foram coletados os primeiros registros, e de 33% em relação a 2009. Pelo Sistema Único de Saúde (SUS), o número de procedimentos aumentou 23,7% entre 2007 e 2009, atingindo o patamar de 3.681 ocorrências. Esses dados fazem do Brasil o segundo colocado no ranking de cirurgias bariátricas, atrás apenas dos Estados Unidos, com 300.000 procedimentos em 2010 (SBCBM, 2011; MS, 2010).

2.3.1 Técnicas cirúrgicas

As técnicas cirúrgicas utilizadas são predominantemente restritivas ou disabsortivas, além das mistas, cada uma com diferentes resultados, efeitos colaterais e riscos transoperatórios (Leite, Rodrigues, 2002; Payne, DeWind, 1969).

As técnicas disabsortivas (de derivação bileo-pancreática) são fundamentadas na má-absorção intestinal, quando os alimentos ingeridos só misturem-se com o suco bileo-pancreático nos últimos 50 cm de íleo. Como consequência ocorre absorção diminuída das gorduras e dos amidos, principalmente (Scopinaro *et al.*, 2000; Scopinaro *et al.*, 2000). Nesta categoria estão contempladas as técnicas de derivação bileo-pancreática de Scopinaro e a Duodenal-*switch* de Hess e Marceau, todas com ótimos resultados de redução de excesso de peso, todavia o monitoramento clínico e laboratorial freqüente deve ser preconizado, devido ao elevado risco para o desenvolvimento de desnutrição protéica e hipovitaminoses (Scopinaro *et al.*, 2000; Marceau *et al.*, 2000).

As técnicas restritivas contemplam a gastrectomia em manga, a banda gástrica ajustável, a gastroplastia vertical de Mason, além do balão intragástrico,

apesar do último não ser considerado um procedimento cirúrgico. Estas técnicas têm como objetivo reduzir o volume de alimentos que podem ser tolerados pelo estômago (Evans, Scott, 2001). Complicações em relação a deficiências nutricionais e vitamínicas importantes dificilmente ocorrem, mas como não envolvem métodos disabsortivos, podem ser “burladas” com mais facilidade através do consumo de alimentos líquidos e pastosos hipercalóricos, podendo dificultar o processo de perda de peso (El-Atat *et al.*, 2003; Carneiro, *et al.*, 2003). Quando comparadas às demais técnicas, as restritivas não têm efeito metabólico significativo no DM2 (Buchwald *et al.*, 2004).

Atualmente, as técnicas mistas ou de *Bypass* gástrico em Y de Roux (BPGYR) são as mais utilizadas tanto no Brasil, como nos Estados Unidos e Europa, pois têm se mostrado eficientes e seguras a médio e longo prazo. Seu desenvolvimento inicial ocorreu a partir da década de 1960, atingindo o modelo atual a partir dos anos de 1980, após diversos aprimoramentos (Fobi *et al.*, 2000; Fisher, Barber, 2000). O estômago é reduzido a uma pequena bolsa gástrica, com volume de 30-50ml, e o restante do estômago, o duodeno e os primeiros 30 a 50 cm do jejuno são mantidos, mas ficam desviados do trajeto alimentar. Durante a realização do procedimento pode ser colocado um anel de *sylastic* para restringir o esvaziamento rápido do estômago e reduzir a dilatação progressiva que pode ocorrer ao longo do tempo com a bolsa gástrica. Esta técnica pode ser realizada por cirurgia convencional ou videolaparoscópica (Fisher, Barber, 2000; Garrido *et al.*, 2002).

Com esta técnica, ocorre redução da ingestão de alimentos (componente restritivo) e diminuição da absorção de alguns nutrientes, principalmente gorduras e carboidratos simples (componente disabsortivo) (Flanagan, 2000).

Os resultados atingidos com as cirurgias mistas são muito positivos. No final do primeiro ano de pós-operatório, a redução de excesso de peso fica em torno de 85% (cerca de 40% do peso total) (Fobi *et al.*, 2000; Fisher, Barber, 2000; Garrido *et al.*, 2002), mesmo apresentando uma pequena taxa de reganho de peso, mantem-se em torno de 65% de redução do excesso de peso, 30% do peso total, após dez anos de pós-operatório (Sjöström *et al.*, 2004).

2.3.2 Resultados do tratamento cirúrgico

Em um estudo feito por Moretto *et al.*, em 2012, o objetivo foi avaliar a prevalência de fibrose hepática em pacientes obesos mórbidos submetidos à cirurgia bariátrica e seu comportamento após o emagrecimento. Nesta pesquisa, dos 35 pacientes com fibrose, cerca de metade (45,7%) apresentou regressão da fibrose, muitos se mantiveram estáveis, e apenas 11,6% apresentaram piora da fibrose após o emagrecimento secundário à cirurgia bariátrica.

As co-morbidades melhoram de forma exacerbada, com melhora importante do perfil lipídico e redução significativa nos níveis e incidência de DM2. Estudos têm demonstrado a normalização da glicose sanguínea em 83% dos pacientes submetidos à cirurgia bariátrica, com redução da incidência de diabetes após oito anos em pacientes de segmento. Além disso, há melhora expressiva da hipertrigliceridemia, artropatias, apnéia obstrutiva do sono, hiperuricemia e, com menor intensidade, os casos de hipercolesterolemia e hipertensão (Sjöström *et al.*, 2004; Christou *et al.*, 2004; Rizzolli *et al.*, 2004; Rizzolli *et al.*, 2004; Rizzolli, Mottin, 2001; Bavaresco *et al.*, 2008).

2.4 AMPK, SIRT-1 e Cirurgia Bariátrica

Foi recentemente constatado que tanto a SIRT-1 como a AMPK são sensores de estresse metabólico conservados evolutivamente, cujas funções são complementares. Embora ambos tenham ações benéficas similares e compartilhem vias de sinalização, uma interação direta não foi observada entre estas duas enzimas. No entanto, a proteína LKB1 (serina / treonina quinase), também chamada de STK11, tem sido proposta como uma possível rota de sinalização celular entre esses dois importantes reguladores metabólicos. Podemos supor que a ativação da AMPK e SIRT-1 após a cirurgia bariátrica de bypass gástrico será associada com a ativação do LKB1 (Peng *et al.*, 2010; Cantó *et al.*, 2009).

O aumento da SIRT-1 e da AMPK estão associados com a diminuição da lipogênese e aumento da oxidação de ácidos graxos, e ambos desempenham um papel fundamental na proteção dos hepatócitos contra a esteatose hepática induzida pelo álcool (You *et al.*, 2008).

Em um modelo de ratos, demonstrou-se que a dieta rica em gordura induz esteatose e que a cirurgia bariátrica de *bypass* gástrico induz uma continuada perda de peso e melhora da esteatose. Ainda confirmou-se que esta cirurgia diminui os triglicerídeos hepáticos e a sinalização hepática lipogênica. Além disso, demonstrou-se que as proteínas AMPK e SIRT-1 tem seus níveis aumentados no fígado de ratos obesos submetidos à cirurgia bariátrica de *bypass* gástrico (Peng *et al.*, 2010).

Pode-se começar a integrar os efeitos conhecidos da restrição calórica sobre a fisiologia de mamíferos com a recente compreensão das funções do principal regulador, a SIRT-1, em diversos tecidos. Tecidos de armazenamento de gordura, tecidos metabólicos e células produtoras de insulina fornecem um teste antecipado da importância da mediação da SIRT-1 na restrição calórica. A SIRT-1 e a AMPK são considerados emergentes alvos potenciais no desenvolvimento de estratégias terapêuticas para doenças metabólicas como diabetes e obesidade, assim como para o câncer e doenças neurodegenerativas (Bordone, Guarente, 2005; Zschoernig, Mahlknecht, 2008).

3 JUSTIFICATIVA

Estudos em tecido humano, como o ora proposto, são necessários para definir o papel exato da SIRT-1 e da AMPK na fisiopatologia de doenças humanas prevalentes como a obesidade e, além disso, são muito escassos na literatura mundial até o momento. Esse é o primeiro estudo na literatura a avaliar a expressão destas enzimas em pacientes submetidos à cirurgia bariátrica.

4 HIPÓTESE

Diante dos achados descritos na literatura, eminentemente experimentais, postulamos a hipótese de que os níveis de AMPK e SIRT-1 estarão mais elevados após a cirurgia bariátrica, pois as alterações metabólicas decorrentes deste procedimento estão relacionadas com as expressões destas duas enzimas.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo Primário

Avaliar a expressão da AMPK e SIRT-1 em amostras histológicas hepáticas de pacientes no transoperatório e após a realização de cirurgia bariátrica no Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (HSL da PUCRS) no período de 2006 a 2010, através do método imunoistoquímico com quantificação por análise de imagem digital.

5.2 Objetivo Secundário

Avaliar a associação entre a expressão da AMPK e SIRT-1 com o peso, Índice de Massa Corporal (IMC) e parâmetros bioquímicos (glicose, colesterol total, HDL e triglicerídeos).

6 METODOLOGIA

6.1 Delineamento

Estudo de coorte histórico.

6.2 Coleta de dados

Os dados foram coletados a partir de amostras já existentes do banco de dados do Serviço de Patologia do HSL da PUCRS de biópsias hepáticas de pacientes que foram submetidos à cirurgia bariátrica no Centro da Obesidade e Síndrome Metabólica do mesmo hospital, no período de 2006 a 2010.

A identificação, quantificação e comparação da expressão da AMPK e da SIRT-1 foram verificadas nas amostras histológicas de fígado oriundas das biópsias hepáticas às quais os pacientes foram submetidos no transoperatório e no mínimo ano após a realização da cirurgia bariátrica, por ser este o período de maior redução ponderal após o procedimento. A execução da biópsia hepática nestes dois momentos é uma prática de rotina do Centro da Obesidade e Síndrome Metabólica.

Os dados complementares (peso, IMC, glicose, colesterol total, HDL e triglicerídeos) foram obtidos do banco de dados dos pacientes do Centro da Obesidade e Síndrome Metabólica.

6.3 Amostra

O cálculo do tamanho da amostra foi realizado no programa Minitab versão 15. Os dados de entrada (desvio-padrão) foram obtidos no trabalho de Peng et al (2010), mas referem-se a ratos. Como o estudo será emparelhado, os desvios-padrão antes e depois fornecidos pelos autores foram somados. Com 28 amostras por grupo, com campos de 10x, será possível chegar a diferenças significativas para AMPK a partir de 150 células marcadas e na SIRT-1 de 50 células, com 95% de confiança e poder fixado em 80%.

6.3.1 Critérios de inclusão

- Amostras histológicas de biópsias hepáticas de pacientes submetidos ao procedimento entre 2006 e 2010;
- Pacientes obesos mórbidos operados pelo Centro da Obesidade e Síndrome Metabólica do HSL da PUCRS;
- Realização de biópsia hepática no transoperatório;
- Realização de segunda biópsia hepática, no mínimo um ano após o procedimento cirúrgico.

6.3.2 Critérios de exclusão

- Material dos pacientes que abandonaram o segmento pelo Centro da Obesidade e Síndrome Metabólica do HSL da PUCRS;
- Biópsia hepática com material insuficiente para avaliação histológica;
- Uso crônico de álcool (acima de 20g/dia);
- Presença de HBsAg e/ou anti-HCV positivos.

6.4 Métodos

A expressão da AMPK e da SIRT-1 foi verificada através de imunistoquímica e quantificada por meio de análise de imagem digital pelo programa Image Pro Plus 4.5.1 (Media Cybernetics, Rockville, EUA).

6.4.1 Análise imunistoquímica

Foram realizados ensaios imunistoquímicos com o anticorpo monoclonal AMPK e SIRT-1 nas biópsias hepáticas. Foram realizados cortes em parafina com espessura de 4 μ m e preparadas lâminas para execução da técnica imunistoquímica. Estas foram submetidas à recuperação antigênica em banho-maria por 30 minutos a 99°C, utilizando tampão Tris/EDTA, pH 9 (20mM Tris/0,65 mM EDTA). O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com solução de peridrol a 3% (H₂O₂ em álcool metílico) por 30 minutos. Os cortes foram imersos em solução

salina a 5% em tampão PBS (“phosphate-binding saline”) por 30 minutos para diminuir a coloração de fundo (*background*). As secções foram então incubadas com anticorpo monoclonal SIRT-1 (Anti-SIRT1 antibody [E104], Abcam, Cambridge, EUA) com diluição de 1:30 e AMPK (Anti-AMPK alpha 1 antibody [Y365]) com diluição de 1:100. O sistema de detecção a utilizado foi o kit Dako LSAB + peroxidase (Streptoavidina). Os cortes foram revelados utilizando-se cromógeno 3,3´diaminoazobenzidina (DAB), e tampão PBS em solução a 0,002% de peróxido de hidrogênio e contra-corados com hematoxilina, sendo desidratados, clarificados e montados com bálsamo e lamínula. Todo método imunoistoquímico foi realizado em sistema automatizado Dako AutoStainer Link 48 (DAKO Corp., Carpinteria, EUA), com padronização, controles positivos e negativos das reações.

6.4.2 Análise digital das imagens

As lâminas foram analisadas sem qualquer conhecimento prévio da evolução clínica dos pacientes e da classificação histopatológica anterior. Foi utilizado um sistema de análise digital composto por microscópio óptico Zeiss Axioskop 40 (Oberkochen, Alemanha), com lentes neofluares, conectado através de uma vídeo-câmera Roper Scientific (Media Cybernetics, Rockville, EUA) a um microcomputador Pentium IV 2.2 GHz com 512 MB de memória RAM, disco rígido de 160 GB e placa de captura Image Pro Capture kit (Media Cybernetics, Rockville, EUA). Para a análise digital das imagens foi utilizado o programa Image Pro Plus versão 4.5 (Media Cybernetics, Rockville, EUA), que permite a captura digital da imagem e marcação e contagem da área de interesse. As imagens foram capturadas no formato TIFF (True Image Format File) sem compressão. A captura das imagens foi realizada no Laboratório de Anatomia Patológica do HSL da PUCRS. Foram capturadas imagens de pelo menos dez campos aleatórios não sobrepostos de cada lâmina histológica com magnificação de 100X. As lâminas com positividade focal para os marcadores tiveram os campos selecionados pelo método de *hot spot* (Weidner et al.). O tamanho médio das biópsias, realizadas por agulha, variou entre 2 e 4 mm². A seleção de cores foi realizada de forma interativa através da concordância ente três observadores treinados e, após, aplicada à leitura de todas as amostras pelo sistema de análise de imagens digital automatizado (Irion *et al.*, 2008).

6.5 Análise dos dados

Os dados foram digitados no programa Excel (Microsoft, Redmond, EUA) e posteriormente exportados para o programa IBM SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences, IBM, Armonk, EUA*) v.19.0 para análise estatística. As variáveis quantitativas foram descritas pela média e o desvio padrão e comparadas entre grupos pelo teste *t de Student* para amostras independentes (distribuição simétrica).

Para avaliação da expressão imunoistoquímica da SIRT-1 e AMPK foi utilizado o teste não paramétrico de Wilcoxon.

Foi considerado um nível de significância de 5% e calculados intervalos de confiança de 95%. A avaliação de correlação entre as variáveis foi realizada pelo teste de Pearson.

6.6 Aspectos éticos

Inicialmente o projeto foi encaminhado à Comissão Científica da PUCRS. Posteriormente o projeto foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS e obteve parecer favorável - CEP 12/97022 (Anexo A). Após o recebimento destes pareceres autorizando a pesquisa, foi iniciada a coleta dos dados.

Para este estudo foi solicitada a dispensa do termo de consentimento livre e esclarecido, pois a pesquisa não implicou em interação ou intervenção com os pacientes, não apresentando nenhum tipo de risco aos indivíduos. Uma vez que se refere à pesquisa em lâminas do banco de dados do Serviço de Patologia do HSL da PUCRS, de pacientes não facilmente encontrados, sem endereço informado ou já falecidos, e, portanto impossível de localizá-los para assinarem o Termo de Consentimento Informado.

Sendo assim, comprometemo-nos a cumprir as normas da resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde relacionado em IV.1.g. “a garantia do sigilo que assegure a privacidade dos sujeitos quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa”.

Este estudo foi realizado em conformidade com as exigências e autorização da coordenação do projeto ARPCBB (HSL/PUCRS-COMPUCRS), conforme acordo de confidencialidade do estudo AVABAR/ARPCBB (Anexo B).

7 RESULTADOS

As biópsias hepáticas de 44 pacientes submetidos à cirurgia bariátrica atenderam aos critérios de inclusão e exclusão, sendo essas analisadas. 31 (70,5%) eram de mulheres e 13 (29,5%) eram de homens. A média de idade dos pacientes foi de $37,18 \pm 11,26$ anos.

Tabela 1 - Perfil dos pacientes no pré e pós-operatório (N=44).

Variáveis	Média	Desvio-padrão
Idade (anos)	37,18	11,26
Peso pré-operatório (kg)	127,29	27,10
Peso pós-operatório (kg)	82,00	19,94
IMC pré-operatório (kg/m²)	45,53	9,60
IMC pós-operatório (kg/m²)	29,31	7,08
Glicose pré-operatória (mg/dL)	118,48	56,25
Glicose pós-operatória (mg/dL)	82,32	11,58
Colesterol total pré-operatório (mg/dL)	197,61	38,34
Colesterol total pós-operatório (mg/dL)	162,82	35,23
HDL pré-operatório (mg/dL)	48,75	14,77
HDL pós-operatório (mg/dL)	52,95	12,29
Triglicerídeos pré-operatório (mg/dL)	158,66	65,35
Triglicerídeos pós-operatório (mg/dL)	96,80	33,21

A Tabela 1 mostra que a média do peso pré-operatório foi de $127,29 \pm 27,10$ kg, reduzindo-se para $82,00 \pm 19,94$ kg no pós-operatório. Com essa redução de $45,28 \pm 13,17$ kg o IMC médio também reduziu de $45,53 \pm 9,60$ kg/m² para $29,31 \pm 7,08$ kg/m² no pós-operatório, retirando os pacientes da classificação de obesidade grau III para sobrepeso. As médias dos parâmetros bioquímicos também apresentaram melhora: a glicose passou de $118,48 \pm 56,25$ mg/dL para $82,32 \pm 11,58$ mg/dL, o colesterol total reduziu de $197,61 \pm 38,34$ mg/dL para $162,82 \pm 35,23$ mg/dL, os triglicerídeos foram de $158,66 \pm 65,35$ mg/dL para $96,80 \pm 33,21$ mg/dL e o HDL aumentou de $48,75 \pm 14,77$ mg/dL para $52,95 \pm 12,29$ mg/dL no pós-operatório.

Foram calculados outros dados em relação à diferença das médias das variáveis entre o momento pré e pós-operatório. São eles: o peso, que reduziu $45,28 \pm 13,17\text{kg}$; o IMC, que reduziu $16,22 \pm 4,75\text{kg/m}^2$; a glicose, que reduziu $36,15 \pm 48,08\text{mg/dL}$; o colesterol total, que reduziu $34,79 \pm 30,24\text{mg/dL}$; o HDL, que aumentou $4,20 \pm 14,01\text{mg/dL}$ e os triglicérides, que reduziram $61,86 \pm 61,53\text{mg/dL}$.

Tabela 2 - Análise das diferenças pareadas entre o pré e pós-operatório.

Variáveis	Diferença das médias	Desvio-padrão	p
Peso pré e pós-operatório	45,28	13,17	,000
IMC pré e pós-operatório	16,22	4,75	,000
Glicose pré e pós-operatória	36,15	48,08	,000
Colesterol total pré e pós-operatório	34,79	30,24	,000
HDL pré e pós-operatório	4,20	14,01	0,053
Triglicérides pré e pós-operatório	61,86	61,53	,000

Conforme pode ser observado na Tabela 2, o peso, IMC e parâmetros bioquímicos demonstraram diferença significativa, com exceção do HDL, que não apresentou diferença significativa entre os momentos pré e pós-operatório.

Tabela 3 – Quantificação da SIRT-1 nas biópsias hepáticas em μm^2 .

	N	Média	Mediana	N Pós-operatório	Média	Mediana	p
	Transoperatório		(p25-p75)			(p25-p75)	
Homens	13	32,43	0	13	210,48	0 a 506,3	0,0625
Mulheres	31	169,21	0 a 421,6	31	407,69	0 a 782,7	0,0094*
Total	44	128,8	0 a 421,6	44	306,68	0 a 743,3	0,0069*

* p significativo

Os resultados da quantificação de SIRT-1 (Tabela 3) mostraram aumento da sua expressão. Entre os homens foram encontradas medianas (p25-p75) de $0\mu\text{m}^2$ nas biópsias realizadas durante a cirurgia e de 0 a $421,6\mu\text{m}^2$ nas biópsias realizadas um ano após o procedimento cirúrgico, sem diferença significativa ($p=0,0625$). A média foi incluída na tabela 3, mesmo considerando a assimetria dos dados, pois apenas a biópsia de um paciente expressou SIRT-1. A média entre os homens foi de

32,43 e 210,48 μm^2 , respectivamente. Oito pacientes não tiveram expressão de SIRT-1 em ambas as biópsias.

Entre as mulheres, foram observadas medianas (p25-p75) de 0 a 421,6 μm^2 e 0 e 782,7 μm^2 nas biópsias realizadas durante a cirurgia e um ano após o procedimento cirúrgico, respectivamente, observando-se diferença significativa (p=0,0094), com médias de 169,21 e 407,67 μm^2 . Nove pacientes não tiveram expressão de SIRT-1 em ambas as biópsias.

A análise dos 44 pacientes teve médias de 128,8 e 306,68 μm^2 com medianas (p25-p75) de 0 a 421,6 μm^2 e 0 a 743,3 μm^2 respectivamente, com diferença significativa (p= 0,0069).

A avaliação da correlação entre as variáveis apresentou significado estatístico entre as variáveis peso, IMC, colesterol total e triglicerídeos no pós-operatório (p<0,005).

Tabela 4 – Quantificação da AMPK nas biópsias hepáticas em μm^2 .

	N	Média	Mediana	N Pós-	Média	Mediana	p
	Transoperatório		(p25-p75)	operatório		(p25-p75)	
Homens	13	4608,4	1920,2 a 7604,9	13	2161,9	595,05 a 3656,9	0,0017*
Mulheres	31	3980,6	1853,328 a 7466,093	31	2952,2	790,47 a 5627,75	0,1018
Total	44	4166,1	2254,03 a 6938,7	44	2718,7	946,5 a 3482,2	0,0028*

* p significativo

A avaliação da AMPK (Tabela 4) mostrou redução de sua expressão, com medianas de 1920,2 a 7604,9 μm^2 nas biópsias realizadas durante a cirurgia e de 595,05 a 3656,9 μm^2 nas biópsias realizadas um ano após o procedimento cirúrgico entre os homens, com diferença significativa (p=0,0017) e médias de 4608,4 e 2161,9 μm^2 durante e após e um ano após o procedimento cirúrgico. Entre as mulheres, foram observadas médias de 3980,6 e 2952,2 μm^2 e medianas de 1853,328 a 7466,093 μm^2 , com redução para 790,47 a 5627,75 μm^2 nas biópsias realizadas durante a cirurgia e um ano após o procedimento cirúrgico,

respectivamente. Porém entre as mulheres não houve diferença significativa ($p=0,1018$). Todas as pacientes tiveram expressão de AMPK em ambas as biópsias.

A análise dos 44 pacientes teve médias de $4166,1\mu\text{m}^2$ e medianas de $2254,03$ a $6938,7\mu\text{m}^2$ na biópsia transoperatória e médias de $2718,7\mu\text{m}^2$ e medianas (p25-p75) de $946,5$ a $3482,2\mu\text{m}^2$ na biópsia realizada um ano após o procedimento cirúrgico, com diferença significativa ($p=0,0028$).

A figura 1 apresenta um campo com a positividade nuclear da SIRT-1 em hepatócitos. As marcações foram realizadas por 3,3'diaminoazobenzidina (DAB), com coloração amarronzada. Microscópico. A figura 2 mostra a positividade citoplasmática para AMPK em hepatócitos.

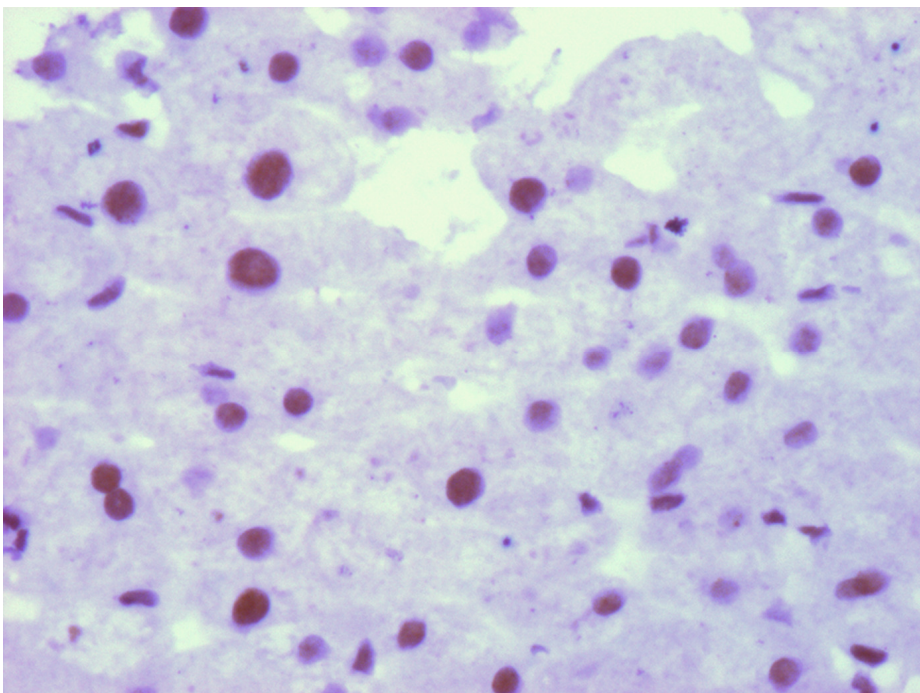


Figura 1. Parênquima hepático mostrando positividade nuclear na maior parte dos hepatócitos da imagem. SIRT-1, DAB, 100X.

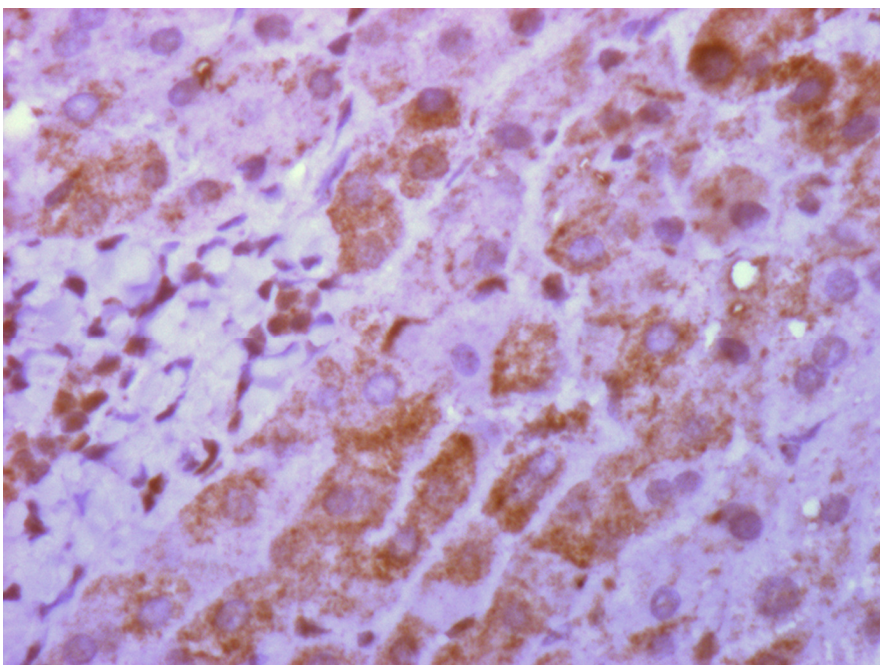


Figura 2. Parênquima hepático mostrando positividade citoplasmática na maior parte dos hepatócitos da imagem. AMPK, DAB, 100X.

8 DISCUSSÃO

Decorrências da perda de peso estão ligadas à melhoria do perfil de biomarcadores relacionados com co-morbidades. Neste trabalho a média do peso reduziu $45,28 \pm 13,17\text{kg}$ entre o período pré e pós-operatório, com uma conseqüente diminuição da média do IMC de $45,53 \pm 9,60\text{kg/m}^2$ para $29,31 \pm 7,08\text{kg/m}^2$ no pós-operatório. Esse resultado retirou os pacientes da classificação de obesidade grau III para sobrepeso. Alguns exemplos de melhoria são: a redução na concentração plasmática de glicose, insulina, triglicerídeos e lipoproteínas de baixa densidade (LDL); aumento na concentração plasmática de HDL e redução da pressão sanguínea sistólica e diastólica (Am J Clin Nutr, 1998).

Lee *et al.*, avaliaram os efeitos da cirurgia bariátrica em pacientes com síndrome metabólica. Foi observada uma redução substancial da pressão sistólica e diastólica, níveis de colesterol total, triglicerídeos e glicemia, em concordância com os achados deste estudo, onde a glicemia no pré-operatório tinha um valor acima do recomendado ($118,48 \pm 56,25\text{mg/dL}$) e diminuiu para $82,32 \pm 11,58\text{mg/dL}$ (valor dentro da faixa de normalidade).

Em relação ao perfil lipídico também ocorreram alterações. O colesterol total estava em valor limítrofe para ser considerado elevado ($197,61 \pm 38,34\text{mg/dL}$) e reduziu para valor adequado ($162,82 \pm 35,23\text{mg/dL}$). Os triglicerídeos estavam ligeiramente acima do valor desejado ($158,66 \pm 65,35\text{mg/dL}$) passando para adequação ($96,80 \pm 33,21\text{mg/dL}$). E o HDL aumentou de $48,75 \pm 14,77\text{mg/dL}$ para $52,95 \pm 12,29\text{mg/dL}$ no pós-operatório. Genio *et al.* observou pacientes submetidos à cirurgia bariátrica e realizou a avaliação sanguínea em um período após o procedimento. Os achados foram que os níveis de colesterol total reduziram significativamente, o mesmo ocorrendo com os triglicerídeos e com aumento do HDL. Os pacientes acompanhados neste estudo, igualmente, tiveram uma redução estatisticamente significativa do colesterol total e dos triglicerídeos. Conforme Schiavo, Lunardelli e Oliveira, existe uma relação aproximadamente inversa entre os níveis de triglicerídeos e de HDL, de modo que elevados níveis de triglicerídeos tendem a estar associados a baixos níveis de HDL.

Evidências atuais encontradas na literatura atestam a associação da perda de peso com uma redução dos fatores de risco para desenvolver co-morbidades e melhora das condições de saúde (Sjöström L, Lindroos AK, Peltonen M, *et al.*, 2004;

Sjöström L, Narbro K, Sjöström CD, *et al.*, 2007; Buchwald H, Estok R, Fahrbach K, *et al.*, 2009; Mottin CC, Padoin AV, Schroer CE, *et al.*, 2008; Christou NV, Sampalis JS, Liberman M, *et al.*, 2004; Lee WJ, Huang MT, Wang W, *et al.*, 2004).

De forma concomitante a melhora dos parâmetros acima avaliados ocorreu um aumento significativo ($p=0,0069$) na expressão da SIRT-1 nas biópsias hepáticas pós-operatórias quando comparadas às transoperatórias. Quando analisamos separadamente, esse aumento somente foi significativo entre as mulheres ($p=0,0094$). Porém, o inverso aconteceu com a AMPK, estando seus níveis significativamente diminuídos ($p= 0,0028$) nas biópsias realizadas pelo menos um ano após a cirurgia. E observando por gêneros, essa diminuição somente foi significativa entre os homens ($p=0,0017$).

Na literatura encontramos alguns estudos com aspectos semelhantes, como a pesquisa de Clark *et al.* (2012), que investigou a associação entre a expressão do gene da SIRT-1 com polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) em tecido adiposo subcutâneo e obesidade, em um estudo de caso-controle em adultos e crianças francesas, onde a baixa expressão do gene da SIRT-1 foi associada à obesidade. Zillikens *et al.* (2009) também investigaram se a variação genética da SIRT-1 é associada à obesidade, através do IMC e risco para desenvolver obesidade. Foi detectado que duas variantes comumente encontradas da SIRT-1 (rs7895833 e rs1467568) são associadas com IMC mais baixo em duas populações holandesas independentes e que pessoas portadoras dessas variantes têm de 13 a 18% menos risco de desenvolver obesidade e ganham menos peso com o passar dos anos.

Além desses, no estudo de Zarrabeitia *et al.* (2012), o objetivo foi testar a hipótese de que polimorfismos da SIRT-1 avaliados em sangue periférico estão associados com IMC menor e densidade mineral óssea. Não foi encontrada associação significativa entre genótipos e densidade mineral óssea. Somente nos homens dois polimorfismos (rs3740051 e rs12049646) tendiam ser associados com IMC menor. Os achados sugeriram que variantes comuns do gene da SIRT-1 influenciam o IMC, mas não a densidade mineral óssea. Seguindo na mesma linha, Zheng *et al.* (2012), exploraram se variações alélicas comuns do gene da SIRT-1 estavam associadas com excesso de peso em uma coorte chinesa. Foram avaliados os polimorfismos da SIRT-1 em leucócitos de sangue periférico. O preconizado pela *World Health Organization* (2003) é que o indivíduo seja classificado como sobrepeso com IMC a partir de 30kg/m^2 , mas neste trabalho, foram utilizados pontos

de corte diferentes, sendo considerado sobrepeso $IMC > 23\text{kg/m}^2$. Esta classificação é aplicável às populações do Pacífico ocidental de acordo com a OMS (WPRO criteria, World Health Organization, 2000), segundo os autores do estudo. O genótipo rs7894483TT foi associado a menores valores de IMC.

Já Wang *et al.* (2011), em um estudo experimental, utilizaram camundongos com uma mutação nula específica hepática da SIRT-1 e identificaram uma via de sinalização envolvendo a SIRT-1. A deficiência da SIRT-1 hepática causou uma produção excessiva de glicose hepática, hiperglicemia crônica, e diminuição da produção de ROS. Enquanto isso, Jin *et al.* (2011), também em estudo experimental, analisaram o possível papel da SIRT-1 nas alterações no metabolismo de glicose e lipídeos em fígados de camundongos com mais de 22-24 meses. Os fígados desses animais mais velhos tiveram uma redução da expressão de SIRT-1 e não apresentaram um bom controle da regulação da SIRT-1 após a hepatectomia parcial. A diminuição da SIRT-1 nos fígados de camundongos mais novos (4-6 meses) resultou em alterações similares às aquelas observadas em fígados de camundongos mais velhos, porém a normalização da SIRT-1 nos fígados de camundongos mais velhos corrige os níveis de glicose e triglicérides após a hepatectomia parcial. A normalização dos níveis de SIRT-1 em camundongos mais velhos também melhorou a regeneração hepática. O estudo mostrou um crítico papel da redução da SIRT-1 em disfunções hepáticas associadas à idade e forneceu uma potencial ferramenta para a correção das funções hepáticas em pacientes mais velhos após ressecções cirúrgicas.

Em 2010, Chen *et al.*, de forma experimental, tiveram como objetivo determinar a expressão da SIRT-1 e SIRT-4 no fígado e pâncreas de ratos alimentados com diferentes dietas e analisar a associação destas proteínas com resistência à insulina e esteatose hepática não alcoólica. O tratamento com restrição calórica aumentou a expressão da SIRT-1 no pâncreas e fígado, enquanto dieta hiperlipídica e com elevada frutose causaram uma diminuição. Os dados obtidos sugeriram que SIRT-1 e SIRT-4 estão envolvidas no desenvolvimento de resistência à insulina e esteatose hepática não alcoólica.

Rodgers & Puigserver (2007) realizaram um estudo experimental com camundongos com o objetivo de demonstrar *in vivo* que SIRT-1 hepática tem relação com a glicose hepática e sistêmica, homeostase lipídica e do colesterol. Neste trabalho, a diminuição da SIRT-1 no fígado causou moderada hipoglicemia,

aumento da glicose sistêmica e sensibilidade à insulina e diminuição da produção de glicose. A diminuição da SIRT-1 também diminuiu os níveis séricos de colesterol e aumentou ácidos graxos livres hepáticos e o teor de colesterol. O aumento da expressão de SIRT-1 reverteu a maioria das alterações causadas pela diminuição dos níveis de SIRT-1 e dependeu da presença da PGC-1. Os resultados indicaram que a SIRT-1 hepática é um importante fator na regulação do metabolismo da glicose e lipídeos em resposta à privação de nutrientes. Já Wang *et al.* (2012) sugerem que a AMPK pode ser modulada pela restrição calórica e que esta enzima age como um principal ditador para os efeitos da restrição calórica na sensibilização da insulina no músculo esquelético, em um estudo experimental com camundongos.

Além disso, em 2010, Peng *et al.*, em um trabalho experimental, utilizaram um modelo de camundongos, onde demonstrou-se que a dieta rica em gordura induz à esteatose e que a cirurgia bariátrica de *bypass* gástrico leva a uma continuada perda de peso e melhora da esteatose. Ainda confirmou-se que esta cirurgia diminui os triglicerídeos hepáticos e a sinalização hepática lipogênica. Ainda demonstrou-se que as proteínas AMPK e SIRT-1 tem seus níveis aumentados no fígado de ratos obesos submetidos à cirurgia bariátrica de *bypass* gástrico.

Até o presente momento foram encontrados na literatura modelos experimentais comparando alterações na expressão de SIRT-1 e AMPK, avaliando as suas relações com peso, IMC e/ou alguns biomarcadores, conforme os estudos descritos acima. O presente estudo encontrou maior expressão de SIRT-1 em biópsias hepáticas realizadas um ano após a cirurgia bariátrica. Esse achado tem relação muito provável com a redução dos níveis séricos de glicose e alterações no perfil lipídico dos pacientes, o que vem sendo demonstrado nos estudos previamente discutidos.

As evidências experimentais sugerindo aumento da expressão da AMPK após o procedimento cirúrgico são escassas, limitadas a um único artigo (Peng *et al.*, 2010). O presente estudo mostrou redução significativa da expressão de AMPK um ano após o procedimento cirúrgico. Considerando o conhecimento ainda incipiente da atividade desses sistemas complexos de regulação metabólica, esse achado precisa ser confirmado em estudos posteriores com grupos maiores de pacientes. Uma hipótese para explicar para tal achado nas biópsias transoperatórias poderia envolver o estresse oxidativo dos pacientes com síndrome metabólica, que potencialmente depletam ATP, além da liberação de citocinas, fator de necrose

tumoral alfa e adipocinas, enquanto as modificações metabólicas decorrentes da cirurgia bariátrica possam reduzir a expressão da AMPK ao longo do tempo nos seres humanos pela diminuição do estresse metabólico. Os resultados deste trabalho vêm a acrescentar e confirmar os resultados anteriormente obtidos, porém, desta vez em tecido humano e relacionando com a cirurgia bariátrica, como ainda não foi constatado pela literatura. Houve correlação entre as variáveis peso, IMC, colesterol total e triglicerídeos no pós-operatório ($p < 0,005$), o que já foi encontrado em vários estudos, cabendo considerar que o cálculo do IMC é realizado a partir do peso dividido pela altura do indivíduo elevada ao quadrado, o que torna a correlação entre as duas variáveis esperada. O presente estudo não evidenciou correlação entre SIRT-1 e/ou AMPK com qualquer das outras variáveis estudadas. Esse achado tem interpretação de valor limitado devido ao número pequeno de pacientes. Ainda assim, é possível que a expressão dessas enzimas, especialmente se avaliada pelo método imunistoquímico não tenha significado estatístico por limitações relacionadas ao método e também por serem estas proteínas componentes de sistemas complexos ainda pouco conhecidos. Ressalvamos que o termo sistema complexo aqui utilizado deriva da matemática, que o define como qualquer sistema que envolva um número de elementos arranjados em estrutura que pode existir em diferentes escalas e não são passíveis de descrição por uma regra única (Joslyn e Rocha, 2000). Um sistema complexo também pode ser definido como uma rede de componentes heterogêneos que interagem de forma não linear (Rocha, 1999, Service, 1999).

A partir dos resultados, que deverão ser confirmados em estudos posteriores, será igualmente necessária a verificação dos achados por método molecular quantitativo. Além de outra necessidade, que é a avaliação de variações genéticas de SIRT-1 e AMPK.

CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos no presente estudo podemos concluir que:

- A expressão da SIRT-1 aumentou de forma significativa nas biópsias hepáticas pós-operatórias em comparação às realizadas no transoperatório;
- A expressão da AMPK diminuiu de forma significativa nas biópsias hepáticas pós-operatórias em comparação às realizadas no transoperatório;
- Os dados complementares peso e IMC, além dos parâmetros bioquímicos glicose, colesterol total e triglicerídeos apresentaram melhora significativa no período pós-operatório, quando comparadas aos valores do momento pré-operatório;
- O HDL apresentou melhora no pós-operatório, mas a diferença não foi estatisticamente significativa;
- Não houve relação significativa entre as expressões de SIRT-1 e AMPK com as demais variáveis nesse estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baur JA, Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov.* 2006 Jun;5(6):493-506. Epub 2006 May 26.
- Bavaresco M, Paganini S, Lima TP, Salgado W Jr, Ceneviva R, Dos Santos JE et al. Nutritional Course of Patients Submitted to Bariatric Surgery. *Obes Surg.* 2008.
- Bordone L, Guarente L. Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6(4):298-305.
- Bordone L, Motta MC, Picard F, Robinson A, Jhala US, Apfeld J, McDonagh T, Lemieux M, McBurney M, Szilvasi A, Easlson EJ, Lin SJ, Guarente L. Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic beta cells. *PLoS Biol.* 2006 Feb;4(2):e31. Epub 2005 Dec 27.
- Buchwald H, Avidor Y, Braunwald E et al. Bariatric Surgery: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2004;292(14):1724-8.
- Buchwald H, Estok R, Fahrbach K, et al. Weight and type 2 diabetes after bariatric surgery: systematic review and metaanalysis. *Am J Med.* 2009;122:248–56.
- Cakir I, Perello M, Lansari O, Messier NJ, Vaslet CA, Nillni EA. Hypothalamic Sirt1 regulates food intake in a rodent model system. *PLoS One.* 2009;4(12):e8322.
- Camins A, Sureda FX, Junyent F, Verdaguer E, Folch J, Pelegri C et al. Sirtuin activators: Designing molecules to extend life span. *Biochim Biophys Acta.* 2010.
- Cantó C, Auwerx J. Calorie restriction: is AMPK a key sensor and effector? *Physiology (Bethesda).* 2011 Aug;26(4):214-24.
- Carneiro G, Faria AN, Ribeiro Filho FF, Zanella MT, et al. Influência da distribuição da gordura corporal sobre a prevalência de hipertensão arterial e outros fatores de risco cardiovascular em indivíduos obesos. *Rev Assoc Med Bras* 2003; 49(3):306-11.
- Chen, D., et al., Tissue-specific regulation of SIRT1 by calorie restriction. *Genes Dev,* 2008. 22(13): p. 1753-7.
- Chen YR, Fang SR, Fu YC, Zhou XH, Xu MY, Xu WC. Calorie restriction on insulin resistance and expression of SIRT1 and SIRT4 in rats. *Biochem Cell Biol.* 2010 Aug;88(4):715-22. doi: 10.1139/O10-010.
- Christou NV, Sampalis JS, Liberman M, Look D, Auger S, MacLean APH, MacLean LD. Surgery Decreases Long-term Mortality, Morbidity and Health Care use in Morbidly Obese Patients. *Ann Surg* 2004;240(3):416-24.

Chung S, Yao H, Caito S, Hwang JW, Arunachalam G, Rahman I. Regulation of SIRT1 in cellular functions: role of polyphenols. *Arch Biochem Biophys*. 2010;501(1):79-90.

Clark SJ, Falchi M, Olsson B, Jacobson P, Cauchi S, Balkau B, Marre M, Lantieri O, et al. Association of sirtuin 1 (SIRT1) gene SNPs and transcript expression levels with severe obesity. *Obesity (Silver Spring)*. 2012 Jan;20(1):178-85. doi: 10.1038/oby.2011.200. Epub 2011 Jul 14.

Cohen, HY., et al., Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science*, 2004. 305(5682): p. 390-2.

El-Atat F, Aneja A, Mcfarlane S, Sowers J. Obesity and hypertension. *Endocrinol Metab Clin N Am* 2003;32:823-854.

Evans JD, Scott MH. Intra-gastric balloon in the treatment of patients with morbid obesity. *Br J Surg* 2001;88(9):1245-48.

Expert Panel on the Identification, evolution, and treatment of overweight in adults - Clinical Guidelines: executive summary. *Am J Clin N* 1998;68:899-917.

Fay JR, Steele V, Crowell JA. Energy homeostasis and cancer prevention: the AMP-activated protein kinase. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2009 Apr;2(4):301-9. Epub 2009 Mar 31.

Fobi MAL, Lee H, Igwe D, Felahy B, Stanczyk M, Tambi J. Transected silastic ring vertical Gastric Bypass with jejunal interposition, a gastrostomy site marker (Fobi pouch operation for obesity). In: Mervin Dietel, Update: Surgery for the morbidly obese patient, Toronto, Canada 2000 Ed: FD- Communications, p.203-26.

Fisher BL, Barber AE. Gastric Bypass procedures. In: Mervin Dietel, Update: Surgery for the morbidly obese patient, Toronto, Canada 2000 Ed: FD- Communications, p.139-45.

Flanagan Jr L. Understanding the function of the small gastric pouch. In: Mervin Dietel, Update: Surgery for the morbidly obese patient, Toronto, Canada 2000 Ed: FD- Communications, p.147-60.

Fulco M, Cen Y, Zhao P, Hoffman EP, McBurney MW, Sauve AA, Sartorelli V. Glucose restriction inhibits skeletal myoblast differentiation by activating SIRT1 through AMPK-mediated regulation of Nampt. *Dev Cell*. 2008 May;14(5):661-73.

Gan L, Mucke L. Paths of convergence: sirtuins in aging and neurodegeneration. *Neuron*. 2008 Apr 10;58(1):10-4.

Genio F, Alfonsi L, Marra M, Finelli C, Genio G, Rossetti G, Genio A, Contaldo F, Pasanisi F. Metabolic and Nutritional Status Changes After 10% Weight Loss in Severely Obese Patients Treated with Laparoscopic Surgery vs Integrated Medical Treatment. *Obes Surg* 2007;17:1592.

Garrido Jr AB, Oliveira MR, Berti LV, Elias AA, Pareja JC, Matsuda M, Gama-Rodrigues JJ. Derivações Gastrojejunais. In: Garrido Jr AB ed. Cirurgia da Obesidade. São Paulo: Editora Atheneu, p.155-61.

Gómez-Valadés AG, Méndez-Lucas A, Vidal-Alabró A, Blasco FX, Chillón M, Bartrons R et al. Pck1 gene silencing in the liver improves glycemia control, insulin sensitivity, and dyslipidemia in db/db mice. *Diabetes*. 2008;57(8):2199-210.

Guarente L. Sirtuins as potential targets for metabolic syndrome. *Nature*. 2006 Dec 14;444(7121):868-74.

Hardie DG. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:774–85.

Hardie DG. Sensing of energy and nutrients by AMP-activated protein kinase. *Am J Clin Nutr*. 2011 Apr;93(4):891S-6. Epub 2011 Feb 16.

Howitz, K.T., et al., Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*, 2003. 425(6954): p. 191-6.

Hursting SD, Berger NA. Energy balance, host-related factors, and cancer progression. *J Clin Oncol*. 2010;28(26):4058-65.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009. Antropometria e Estado Nutricional de Crianças, Adolescentes e Adultos no Brasil. Rio de Janeiro: IBGE, 2010.

Irion LC, Prolla JC, Hartmann AA, Irion KL, Da Silva VD. Angiogenesis in non-small cell lung cancer: microvessel area in needle biopsy in vascular tumor density. *Anal Quant Cytol Histol*. 2008 Apr;30(2):83-91

Jin J, Iakova P, Jiang Y, Medrano EE, Timchenko NA. The reduction of SIRT1 in livers of old mice leads to impaired body homeostasis and to inhibition of liver proliferation. *Hepatology*. 2011 Sep 2;54(3):989-98. doi: 10.1002/hep.24471. Epub 2011 Jul 27.

Joslyn, C. and Rocha, L. (2000). Complex system may also be considered as any system which involves a number of elements, arranged in structure which can exist in any scales. These go through the processes of change that are not describable by a single rule nor are reducible to only one level of explanation. Towards semiotic [agent-based models](#) of socio-technical organizations, Proc. AI, Simulation and Planning in High Autonomy Systems (AIS 2000) Conference, Tucson, Arizona, pp. 70-79.

Kume S, Uzu T, Kashiwagi A, Koya D. SIRT1, a calorie restriction mimetic, in a new therapeutic approach for type 2 diabetes mellitus and diabetic vascular complications. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2010;10(1):16-24.

Kwon HS, Ott M. The ups and downs of SIRT1. *Trends Biochem Sci*. 2008 Nov;33(11):517-25. Epub 2008 Sep 18.

Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, Messadeq N, Milne J, Lambert P, Elliott P, Geny B, Laakso M, Puigserver P, Auwerx J. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell*. 2006 Dec 15;127(6):1109-22. Epub 2006 Nov 16.

Lee WJ, Huang MT, Wang W, et al. Effects of obesity surgery on the metabolic syndrome. *Arch Surg*. 2004;139:1088–92.

Leite MAM, Rodrigues MPF. Procedimentos Cirúrgicos – Introdução Histórica. In: Garrido Jr AB ed. *Cirurgia da Obesidade*. São Paulo: Editora Atheneu, 2002 p.141-8.

Lin SJ, P.A. Defossez, and L. Guarente, Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*, 2000. 289(5487): p. 2126-8.

Lin SJ, Ford E, Haigis M, Liszt G, Guarente L. Calorie restriction extends yeast life span by lowering the level of NADH. *Genes Dev*. 2004 Jan 1;18(1):12-6.

Longo VD. Linking sirtuins, IGF-I signaling, and starvation. *Exp Gerontol*. 2009;44(1-2):70-4.

Marceau P, Hould FS, Potvin M, Lebel S, Biron S. Biliopancreatic diversion with Duodenal Switch procedure. In: Mervin Dietel, Update: Surgery for the morbidly obese patient, Toronto, Canada 2000 Ed: FD- Communications, p.259-65.
Payne JH, DeWind LT. Surgical treatment of obesity. *Am J Surg* 1969;118:141-47.

Michan S, Sinclair D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J*. 2007 May 15;404(1):1-13.

Milne JC, Denu JM. The Sirtuin family: therapeutic targets to treat diseases of aging. *Curr Opin Chem Biol*. 2008 Feb;12(1):11-7. Epub 2008 Mar 7.

Ministério da Saúde. Acessado na página da internet <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/default.cfm> em maio de 2010.

Moretto M, Kupski C, da Silva VD, Padoin AV, Mottin CC. Effect of bariatric surgery on liver fibrosis. *Obes Surg*. 2012 Jul;22(7):1044-9.

Mottin CC, Padoin AV, Schroer CE, et al. Behavior of type 2 diabetes mellitus in morbid obese patients submitted to gastric bypass. *Obes Surg*. 2008;18:179–81.

Nedachi T, Kadotani A, Ariga M, Katagiri H, Kanzaki M. Ambient glucose levels qualify the potency of insulin myogenic actions by regulating SIRT1 and FoxO3a in C2C12 myocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008 Apr;294(4):E668-78. Epub 2008 Jan 29.

Outeiro TF, Marques O, Kazantsev A. Therapeutic role of sirtuins in neurodegenerative disease. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Jun;1782(6):363-9. Epub 2008 Mar 7.

Peng Y, Rideout DA, Rakita SS, Gower WR Jr, You M, Murr MM. Does LKB1 mediate activation of hepatic AMP-protein kinase (AMPK) and sirtuin1 (SIRT1) after Roux-en-Y gastric bypass in obese rats? *J Gastrointest Surg*. 2010;14(2):221-8.

Picard F, et al.. Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature*. 2004 Jun 17;429(6993):771-6. Epub 2004 Jun 2.

Powell MJ, Casimiro MC, Cordon-Cardo C, He X, Yeow WS, Wang C, McCue PA, McBurney MW, Pestell RG. Disruption of a Sirt1-dependent autophagy checkpoint in the prostate results in prostatic intraepithelial neoplasia lesion formation. *Cancer Res*. 2011 Feb 1;71(3):964-75. Epub 2010 Dec 28.

Qiao L, Shao J. SIRT1 regulates adiponectin gene expression through Foxo1-C/enhancer-binding protein alpha transcriptional complex. *J Biol Chem*. 2006 Dec 29;281(52):39915-24. Epub 2006 Nov 6.

Qiu X, Brown KV, Moran Y, Chen D. Sirtuin regulation in calorie restriction. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1804(8):1576-83.

Rizzolli J, Mottin CC et al. Redução de Peso e Evolução das Comorbidades no Acompanhamento Pós-Operatório de 80 Pacientes Submetidos à Cirurgia Bariátrica no Centro da Obesidade Mórbida do HSL-PUCRS.. In: IV CBCO, 2001, São Paulo. *Boletim de Cirurgia da Obesidade*, 2001;2:6.

Rizzolli J et al. Hipertensão arterial sistêmica em uma coorte de pacientes com obesidade mórbida submetidos à cirurgia bariátrica: Fatores relacionados a manutenção da Hipertensão após redução de peso. In: 26º Congresso Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia, 2004, Florianópolis. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*. São Paulo : Tec Art Editora Ltda, 2004;48:S628-S628.

Rizzolli J et al. Redução do Excesso de Peso e Evolução do Perfil lipídico após 12 meses de Cirurgia Bariátrica. In: 26º Congresso Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia, 2004, Florianópolis. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*. São Paulo : Tec Art Editora Ltda, 2004;48:S635-S635.

Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature*. 2005 Mar 3;434(7029):113-8.

Rocha, LM. BITS: Computer and Communications News. Computing, Information, and Communications Division. Los Alamos National Laboratory. November 1999.

Rodgers JT, Puigserver P. Fasting-dependent glucose and lipid metabolic response through hepatic sirtuin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jul 31;104(31):12861-6. Epub 2007 Jul 23.

Santomauro AC, Ugolini MR, Santomauro AT, Souto RP. Metformina e AMPK: um antigo fármaco e uma nova enzima no contexto da síndrome metabólica. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2008;52(1):120-125.

Schiavo M, Lunardelli A, Oliveira JR.. Influência da dieta na concentração sérica de triglicérides. *Jornal Bras de Patologia e Medicina Clínica e Laboratorial.* 2003;39(4):283-8.

Silva JP, Wahlestedt C. Role of Sirtuin 1 in metabolic regulation. *Drug Discov Today.* 2010;15(17-18):781-91.

Sjöström L, Lindroos AK, Peltonen M, Torgerson J, Bouchard C et al. Lifestyle, Diabetes, and Cardiovascular Risk factors 10 years after Bariatric Surgery. *N Engl J Med* 2004;351(26):2683-93.

Sjöström L, Narbro K, Sjöström CD, et al. Effects of bariatric surgery on mortality in Swedish obese subjects. *N Engl J Med.* 2007;357:741–52.

Scopinaro N, Adami GF, Marinari GM, Traverso E, Papadia F, Camerini G. Biliopancreatic diversion: Two decade of experience. In: Mervin Dietel, Update: Surgery for the morbidly obese patient, Toronto, Canada 2000 Ed: FD-Communications, p.227-58.

Scopinaro N, Marinari GM, Camerini G, Adami GF, Papadia F, Petrolesi F et al. Energy and Nitrogen absorption after biliopancreatic diversion. *Obes Surg* 2000;10:436-41.

Service RF. Complex systems. Exploring the systems of life. *Science.* 1999 Apr 2;284(5411):80-1, 3.

Sociedade Brasileira de Cirurgia Bariátrica e Metabólica (SBCBM). Acessado na página da internet <http://www.sbc.org.br> em maio de 2011.

Sociedade Brasileira de Cirurgia Bariátrica e Metabólica (SBCBM). Pesquisa Obesidade 2007. Acessado na página da internet <http://www.sbc.org.br> em maio de 2011.

Steinberg GR, Kemp BE. AMPK in health and disease. *Physiol Rev.* 2009;89:1025–78.

Swinburn BA, Sacks G, Hall KD, et al. The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. *Lancet* 2011;378:804-14.

Viollet B, Lantier L, Devin-Leclerc J, Hebrard S, Amouyal C, Mounier R, Foretz M, Andreelli F. Targeting the AMPK pathway for the treatment of Type 2 diabetes. *Front Biosci.* 2009 Jan 1;14:3380-400.

Voelter-Mahlknecht S, Mahlknecht U. Cloning, chromosomal characterization and mapping of the NAD-dependent histone deacetylases gene sirtuin 1. *Int J Mol Med.* 2006 Jan;17(1):59-67.

Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature*. 2000 Nov 16;408(6810):307-10.

Wang RH, Kim HS, Xiao C, Xu X, Gavrilova O, Deng CX. Hepatic Sirt1 deficiency in mice impairs mTorc2/Akt signaling and results in hyperglycemia, oxidative damage, and insulin resistance. *J Clin Invest*. 2011 Nov;121(11):4477-90. doi: 10.1172/JCI46243. Epub 2011 Oct 3.

Westphal CH, Dipp MA, Guarente L. A therapeutic role for sirtuins in diseases of aging? *Trends Biochem Sci*. 2007 Dec;32(12):555-60. Epub 2007 Nov 5.

Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med*. 1991 Jan 3;324(1):1-8.

Winder WW, Hardie DG. AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes. *Am J Physiol*. 1999; 277:E1-10.

World Health Organization (2000) Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser894:i-xii, 1-253*.

World Health Organization. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Report of a WHO Study Group. *WHO Technical Report Series, Geneva, 2003;916*.

Yamamoto H, Schoonjans K, Auwerx J. Sirtuin functions in health and disease. *Mol Endocrinol*. 2007 Aug;21(8):1745-55. Epub 2007 Apr 24.

Yang T, Fu M, Pestell R, Sauve AA. SIRT1 and endocrine signaling. *Trends Endocrinol Metab*. 2006;17(5):186-91.

Yi J, Luo J. SIRT1 and p53, effect on cancer, senescence and beyond. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Aug;1804(8):1684-9. Epub 2010 May 13.

You M, Liang X, Ajmo JM, Ness GC. Involvement of mammalian sirtuin 1 in the action of ethanol in the liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008;294(4):892-8.

Zarrabeitia MT, Valero C, Martín-Escudero JC, Olmos JM, Bolado-Carrancio A, de Sande-Nacarino EL, Rodríguez-Rey JC, Sainz J, Riancho JA. Association study of sirtuin 1 polymorphisms with bone mineral density and body mass index. *Arch Med Res*. 2012 Jul;43(5):363-8. doi: 10.1016/j.arcmed.2012.06.012. Epub 2012 Jul 21.

Zheng J, Chen LL, Xiao F, Hu X, Deng X, Li H. Three single nucleotide variants of the SIRT1 gene are associated with overweight in a Chinese population: a case control study. *Endocr J*. 2012;59(3):229-37. Epub 2012 Jan 7.

Zillikens MC, van Meurs JB, Rivadeneira F, Amin N, Hofman A, Oostra BA, Sijbrands EJ, Witteman JC, Pols HA, van Duijn CM, Uitterlinden AG. SIRT1 genetic variation is related to BMI and risk of obesity. *Diabetes*. 2009 Dec;58(12):2828-34. doi: 10.2337/db09-0536. Epub 2009 Sep 9.

Zschoernig B, Mahlkecht U. Sirtuin 1: regulating the regulator. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;376(2):251-5.

ARTIGO ORIGINAL EM PORTUGUÊS

Expressão da Proteína Quinase Ativada por AMP e Sirtuina 1 em Pacientes Submetidos à Cirurgia Bariátrica

Nathalia Molina Duval da Silva¹, Thomas Dalbem Prates¹, Laura Valduga Pozza¹, Cláudio Cora Mottin², Myriam Moretto², Alexandre Vontobel Padoin², Vinicius Duval da Silva¹

¹Serviço de Patologia e ²Centro da Obesidade e Síndrome Metabólica do Hospital São Lucas da PUCRS, Porto Alegre, Brasil.

Dados para correspondência:

Vinicius Duval da Silva

Serviço de Patologia do Hospital São Lucas da PUCRS

Avenida Ipiranga, nº 6690 – Porto Alegre, RS, Brasil

CEP: 90610-000

Telefone: +55 51 33203220

E-mail: vinids@pucrs.br

RESUMO

Introdução e Objetivo: a sirtuina-1 (SIRT-1) e a proteína quinase ativada por AMP (AMPK) desempenham importantes papéis metabólicos. A modulação das suas atividades é considerada possibilidade preventiva e terapêutica da obesidade e comorbidades associadas. O objetivo foi avaliar a expressão da AMPK e SIRT-1 em amostras histológicas hepáticas de pacientes no transoperatório e após a realização da cirurgia bariátrica. Avaliar a associação entre a expressão dessas proteínas com o peso, Índice de Massa Corporal (IMC) e parâmetros bioquímicos (glicose, colesterol total, HDL e triglicerídeos).

Métodos: a expressão das proteínas foi verificada através de imunistoquímica e quantificada por método de microscopia por análise de imagem digital. As demais informações foram acessadas em banco de dados.

Resultados: biópsias hepáticas de 44 pacientes submetidos à cirurgia bariátrica foram analisadas. A média do peso pré-operatório para o pós-operatório reduziu e conseqüentemente o IMC médio, retirando os pacientes da classificação de obesidade grau III para sobrepeso. As médias dos parâmetros bioquímicos apresentaram melhora, com exceção do HDL, que não teve alteração significativa. Em relação à SIRT-1 foram encontradas médias de $128.80\mu\text{m}^2$ nas biópsias do transoperatório e de $306.68\mu\text{m}^2$ nas biópsias realizadas um ano após ($p= 0.0069$). Já a AMPK teve médias de $4166.10\mu\text{m}^2$ e $2718.70\mu\text{m}^2$, respectivamente ($p=0.0028$).

Conclusões: a expressão da SIRT-1 aumentou e a da AMPK diminuiu nas biópsias hepáticas pós-operatórias, ambas de forma significativa. O padrão de expressão encontrado acompanhou os resultados de melhorias no peso, IMC e perfil de biomarcadores que são associados ao desenvolvimento de co-morbidades, verificados também verificados após o período de um ano.

Palavras-chave: Sirtuina-1, AMPK, Obesidade e Síndrome Metabólica.

INTRODUÇÃO

A sirtuina-1 (SIRT-1) é uma proteína descrita recentemente, identificada como o homólogo humano da Sir2 (em inglês, *silent information regulator 2*). Esta proteína é amplamente transcrita em tecidos de mamíferos, tendo seus níveis aumentados após a restrição calórica ou jejum, em locais como fígado, músculo esquelético e tecido adiposo [1,2].

A expressão da SIRT-1, bem como sua atividade estão relacionadas aos níveis de nutrientes, por este motivo ela é considerada um sensor metabólico. Desta forma, ela desempenha um papel fundamental na regulação de processos metabólicos e fisiológicos críticos [3] como, por exemplo, no metabolismo da glicose, dos lipídios [4], e na secreção de insulina [5], assim como na regulação do consumo de oxigênio e na capacidade mitocondrial [1].

A proteína quinase ativada por AMP (AMPK) também é um sinalizador celular metabólico [6], que participa do processo da homeostase energética celular e corporal, pois media a adaptação celular a variações nutricionais e ambientais [7]. A sua ativação determina uma ampla variedade de efeitos fisiológicos, principalmente nas vias metabólicas dos lipídios e da glicose, que ocorre através do estresse celular (consequência de situações como a privação alimentar e a prática de exercícios) além da sua expressão ser regulada por determinados hormônios e nutrientes [8,9].

A obesidade é uma doença crônica metabólica de prevalência crescente, que vem adquirindo proporções epidêmicas, representando um dos principais problemas de saúde pública. Tratamentos que preconizam modificações do estilo de vida e tratamento farmacológico, muitas vezes são pouco eficazes, então a indicação do tratamento cirúrgico se impõe e a cirurgia bariátrica vem sendo utilizada cada vez mais com o principal objetivo de perda de peso e conseqüente melhoria da qualidade de vida para estes pacientes, minimizando os riscos da mortalidade precoce [10,11].

No período pós-cirúrgico as co-morbidades melhoram de forma significativa, com melhora importante do perfil lipídico e redução significativa nos níveis e incidência da Diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Diversos estudos demonstram melhora nos níveis de glicemia, triglicerídeos, redução da incidência de DM2, melhora da hipercolesterolemia, entre outras conseqüências positivas [11,12-15].

Diante dos importantes papéis metabólicos da SIRT-1 e AMPK, torna-se cada vez mais evidente que modular as suas atividades através de drogas seja, no futuro, uma possível alternativa na prevenção e terapêutica de patologias como a obesidade, resistência à insulina, DM2 e em desordens metabólicas associadas [8,16-18].

Estudos em tecido humano são necessários para definir o papel exato da SIRT-1 e da AMPK na fisiopatologia de doenças humanas prevalentes como a obesidade e, além disso, são muito escassos na literatura mundial até o momento. Esse é o primeiro estudo na literatura a avaliar a expressão destas enzimas em pacientes submetidos à cirurgia bariátrica. O objetivo deste estudo foi analisar a expressão da AMPK e SIRT-1 em amostras histológicas hepáticas de pacientes no transoperatório e após a realização de cirurgia bariátrica, e verificar uma possível associação entre a expressão destas enzimas, peso, Índice de Massa Corporal (IMC) e parâmetros bioquímicos (glicose, colesterol total, HDL e triglicerídeos).

MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizado um estudo de coorte histórico, onde os dados foram coletados a partir de amostras já existentes do banco de dados do Serviço de Patologia do HSL da PUCRS de biópsias hepáticas de pacientes que foram submetidos à cirurgia bariátrica no Centro da Obesidade e Síndrome Metabólica do mesmo hospital, no período de 2006 a 2010.

A identificação, quantificação e comparação da expressão da AMPK e da SIRT-1 foram verificadas nas amostras histológicas de fígado oriundas das biópsias hepáticas às quais os pacientes foram submetidos no transoperatório e no mínimo ano após a realização da cirurgia bariátrica, por ser este o período de maior redução ponderal após o procedimento. A execução da biópsia hepática nestes dois momentos é uma prática de rotina do Centro da Obesidade e Síndrome Metabólica.

Os dados complementares (peso, IMC, glicose, colesterol total, HDL e triglicerídeos) foram obtidos do banco de dados dos pacientes do Centro da Obesidade e Síndrome Metabólica.

Foram incluídas no estudo as amostras histológicas de biópsias hepáticas de pacientes obesos mórbidos operados no Centro da Obesidade e Síndrome Metabólica do HSL da PUCRS entre 2006 e 2010. Outro critério de inclusão foi a

realização de biópsia hepática no transoperatório e a repetição deste procedimento no mínimo um ano após a cirurgia.

Foram excluídos da pesquisa o material dos pacientes que abandonaram o segmento pelo Centro da Obesidade e Síndrome Metabólica do HSL da PUCRS. Outros critérios de exclusão foram biópsia hepática com material insuficiente para avaliação histológica, pacientes com uso crônico de álcool (acima de 20g/dia) ou com a presença de HBsAg e/ou anti-HCV positivos.

A expressão da AMPK e da SIRT-1 foi verificada através de imunistoquímica e quantificada por meio de análise de imagem digital pelo programa Image Pro Plus 4.5.1 (Media Cybernetics, Rockville, EUA).

Análise imunistoquímica

Foram realizados ensaios imunistoquímicos com o anticorpo monoclonal AMPK e SIRT-1 nas biópsias hepáticas. Foram realizados cortes em parafina com espessura de 4µm e preparadas lâminas para execução da técnica imunistoquímica. Estas foram submetidas à recuperação antigênica em banho-maria por 30 minutos a 99°C, utilizando tampão Tris/EDTA, pH 9 (20mM Tris/0,65 mM EDTA). O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com solução de peridrol a 3% (H₂O₂ em álcool metílico) por 30 minutos. Os cortes foram imersos em solução salina a 5% em tampão PBS (“phosphate-binding saline”) por 30 minutos para diminuir a coloração de fundo (*background*). As secções foram então incubadas com anticorpo monoclonal SIRT-1 (Anti-SIRT1 antibody [E104], Abcam, Cambridge, EUA) com diluição de 1:30 e AMPK (Anti-AMPK alpha 1 antibody [Y365]) com diluição de 1:100. O sistema de detecção utilizado foi o kit Dako LSAB + peroxidase (Streptoavidina). Os cortes foram revelados utilizando-se cromógeno 3,3´diaminoazobenzidina (DAB), e tampão PBS em solução a 0,002% de peróxido de hidrogênio e contra-corados com hematoxilina, sendo desidratados, clarificados e montados com bálsamo e lamínula. Todo método imunistoquímico foi realizado em sistema automatizado Dako AutoStainer Link 48 (DAKO Corp., Carpinteria, EUA), com padronização, controles positivos e negativos das reações.

Análise digital das imagens

As lâminas foram analisadas sem qualquer conhecimento prévio da evolução clínica dos pacientes e da classificação histopatológica anterior. Foi utilizado um sistema de análise digital composto por microscópio óptico Zeiss Axioskop 40 (Oberkochen, Alemanha), com lentes neofluares, conectado através de uma vídeo-câmera Roper Scientific (Media Cybernetics, Rockville, EUA) a um microcomputador Pentium IV 2.2 GHz com 512 MB de memória RAM, disco rígido de 160 GB e placa de captura Image Pro Capture kit (Media Cybernetics, Rockville, EUA). Para a análise digital das imagens foi utilizado o programa Image Pro Plus versão 4.5 (Media Cybernetics, Rockville, EUA), que permite a captura digital da imagem e marcação e contagem da área de interesse. As imagens foram capturadas no formato TIFF (True Image Format File) sem compressão. A captura das imagens foi realizada no Laboratório de Anatomia Patológica do HSL da PUCRS. Foram capturadas imagens de pelo menos dez campos aleatórios não sobrepostos de cada lâmina histológica com magnificação de 100X. As lâminas com positividade focal para os marcadores tiveram os campos selecionados pelo método de *hot spot* [19]. O tamanho médio das biópsias, realizadas por agulha, variou entre 2 e 4 mm². A seleção de cores foi realizada de forma interativa através da concordância ente três observadores treinados e, após, aplicada à leitura de todas as amostras pelo sistema de análise de imagens digital automatizado [20].

Análise dos dados

Os dados foram digitados no programa Excel (Microsoft, Redmond, EUA) e posteriormente exportados para o programa IBM SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*, IBM, Armonk, EUA) v.19.0 para análise estatística. As variáveis quantitativas foram descritas pela média e o desvio padrão e comparadas entre grupos pelo teste *t de Student* para amostras independentes (distribuição simétrica).

Para avaliação da expressão imunoistoquímica da SIRT-1 e AMPK foi utilizado o teste não paramétrico de Wilcoxon.

Foi considerado um nível de significância de 5% e calculados intervalos de confiança de 95%. A avaliação de correlação entre as variáveis foi realizada pelo teste de Pearson.

Este estudo foi revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

RESULTADOS

As biópsias hepáticas de 44 pacientes submetidos à cirurgia bariátrica atenderam aos critérios de inclusão e exclusão, sendo essas analisadas. 31 (70,5%) eram de mulheres e 13 (29,5%) eram de homens. A média de idade dos pacientes foi de $37,18 \pm 11,26$ anos.

A Tabela 1 mostra que a média do peso pré-operatório foi de $127,29 \pm 27,10$ kg, reduzindo-se para $82,00 \pm 19,94$ kg no pós-operatório. Com essa redução de $45,28 \pm 13,17$ kg o IMC médio também reduziu de $45,53 \pm 9,60$ kg/m² para $29,31 \pm 7,08$ kg/m² no pós-operatório, retirando os pacientes da classificação de obesidade grau III para sobrepeso. As médias dos parâmetros bioquímicos também apresentaram melhora: a glicose passou de $118,48 \pm 56,25$ mg/dL para $82,32 \pm 11,58$ mg/dL, o colesterol total reduziu de $197,61 \pm 38,34$ mg/dL para $162,82 \pm 35,23$ mg/dL, os triglicerídeos foram de $158,66 \pm 65,35$ mg/dL para $96,80 \pm 33,21$ mg/dL e o HDL aumentou de $48,75 \pm 14,77$ mg/dL para $52,95 \pm 12,29$ mg/dL no pós-operatório.

Foram calculados outros dados em relação à diferença das médias das variáveis entre o momento pré e pós-operatório. São eles: o peso, que reduziu $45,28 \pm 13,17$ kg; o IMC, que reduziu $16,22 \pm 4,75$ kg/m²; a glicose, que reduziu $36,15 \pm 48,08$ mg/dL; o colesterol total, que reduziu $34,79 \pm 30,24$ mg/dL; o HDL, que aumentou $4,20 \pm 14,01$ mg/dL e os triglicerídeos, que reduziram $61,86 \pm 61,53$ mg/dL.

Conforme pode ser observado na Tabela 2, o peso, IMC e parâmetros bioquímicos demonstraram diferença significativa, com exceção do HDL, que não apresentou diferença significativa entre os momentos pré e pós-operatório.

Os resultados da quantificação de SIRT-1 (Tabela 3) mostraram aumento da sua expressão. Entre os homens foram encontradas medianas (p25-p75) de $0\mu\text{m}^2$ nas biópsias realizadas durante a cirurgia e de 0 a $421,6\mu\text{m}^2$ nas biópsias realizadas um ano após o procedimento cirúrgico, sem diferença significativa ($p=0,0625$). A média foi incluída na tabela 3, mesmo considerando a assimetria dos dados, pois apenas a biópsia de um paciente expressou SIRT-1. A média entre os homens foi de

32,43 e 210,48 μm^2 , respectivamente. Oito pacientes não tiveram expressão de SIRT-1 em ambas as biópsias.

Entre as mulheres, foram observadas medianas (p25-p75) de 0 a 421,6 μm^2 e 0 e 782,7 μm^2 nas biópsias realizadas durante a cirurgia e um ano após o procedimento cirúrgico, respectivamente, observando-se diferença significativa ($p=0,0094$), com médias de 169,21 e 407,67 μm^2 . Nove pacientes não tiveram expressão de SIRT-1 em ambas as biópsias.

A análise dos 44 pacientes teve médias de 128,8 e 306,68 μm^2 com medianas (p25-p75) de 0 a 421,6 μm^2 e 0 a 743,3 μm^2 respectivamente, com diferença significativa ($p=0,0069$).

A avaliação da correlação entre as variáveis apresentou significado estatístico entre as variáveis peso, IMC, colesterol total e triglicérides no pós-operatório ($p<0,005$).

A avaliação da AMPK (Tabela 4) mostrou redução de sua expressão, com medianas de 1920,2 a 7604,9 μm^2 nas biópsias realizadas durante a cirurgia e de 595,05 a 3656,9 μm^2 nas biópsias realizadas um ano após o procedimento cirúrgico entre os homens, com diferença significativa ($p=0,0017$) e médias de 4608,4 e 2161,9 μm^2 durante e após e um ano após o procedimento cirúrgico. Entre as mulheres, foram observadas médias de 3980,6 e 2952,2 μm^2 e medianas de 1853,328 a 7466,093 μm^2 , com redução para 790,47 a 5627,75 μm^2 nas biópsias realizadas durante a cirurgia e um ano após o procedimento cirúrgico, respectivamente. Porém entre as mulheres não houve diferença significativa ($p=0,1018$). Todas as pacientes tiveram expressão de AMPK em ambas as biópsias.

A análise dos 44 pacientes teve médias de 4166,1 μm^2 e medianas de 2254,03 a 6938,7 μm^2 na biópsia transoperatória e médias de 2718,7 μm^2 e medianas (p25-p75) de 946,5 a 3482,2 μm^2 na biópsia realizada um ano após o procedimento cirúrgico, com diferença significativa ($p=0,0028$).

A figura 1 apresenta um campo com a positividade nuclear da SIRT-1 em hepatócitos. As marcações foram realizadas por 3,3'-diaminoazobenzidina (DAB), com coloração amarronzada. Microscópico. A figura 2 mostra a positividade citoplasmática para AMPK em hepatócitos.

DISCUSSÃO

Decorrências da perda de peso estão ligadas à melhoria do perfil de biomarcadores relacionados com co-morbidades. Neste trabalho a média do peso reduziu $45,28 \pm 13,17$ kg entre o período pré e pós-operatório, com uma conseqüente diminuição da média do IMC de $45,53 \pm 9,60$ kg/m² para $29,31 \pm 7,08$ kg/m² no pós-operatório. Esse resultado retirou os pacientes da classificação de obesidade grau III para sobrepeso. Alguns exemplos de melhoria são: a redução na concentração plasmática de glicose, insulina, triglicerídeos e lipoproteínas de baixa densidade (LDL); aumento na concentração plasmática de HDL e redução da pressão sanguínea sistólica e diastólica [21].

Lee *et al.* [22], avaliaram os efeitos da cirurgia bariátrica em pacientes com síndrome metabólica. Foi observada uma redução substancial da pressão sistólica e diastólica, níveis de colesterol total, triglicerídeos e glicemia, em concordância com os achados deste estudo, onde a glicemia no pré-operatório tinha um valor acima do recomendado ($118,48 \pm 56,25$ mg/dL) e diminuiu para $82,32 \pm 11,58$ mg/dL (valor dentro da faixa de normalidade).

Em relação ao perfil lipídico também ocorreram alterações. O colesterol total estava em valor limítrofe para ser considerado elevado ($197,61 \pm 38,34$ mg/dL) e reduziu para valor adequado ($162,82 \pm 35,23$ mg/dL). Os triglicerídeos estavam ligeiramente acima do valor desejado ($158,66 \pm 65,35$ mg/dL) passando para adequação ($96,80 \pm 33,21$ mg/dL). E o HDL aumentou de $48,75 \pm 14,77$ mg/dL para $52,95 \pm 12,29$ mg/dL no pós-operatório. Genio *et al.* [23] observou pacientes submetidos à cirurgia bariátrica e realizou a avaliação sanguínea em um período após o procedimento. Os achados foram que os níveis de colesterol total reduziram significativamente, o mesmo ocorrendo com os triglicerídeos e com aumento do HDL. Os pacientes acompanhados neste estudo, igualmente, tiveram uma redução estatisticamente significativa do colesterol total e dos triglicerídeos. Conforme Schiavo, Lunardelli e Oliveira [24], existe uma relação aproximadamente inversa entre os níveis de triglicerídeos e de HDL, de modo que elevados níveis de triglicerídeos tendem a estar associados a baixos níveis de HDL.

Evidências atuais encontradas na literatura atestam a associação da perda de peso com uma redução dos fatores de risco para desenvolver co-morbidades e melhora das condições de saúde [12,14,22].

De forma concomitante a melhora dos parâmetros acima avaliados ocorreu um aumento significativo ($p=0,0069$) na expressão da SIRT-1 nas biópsias hepáticas pós-operatórias quando comparadas às transoperatórias. Quando analisamos separadamente, esse aumento somente foi significativo entre as mulheres ($p=0,0094$). Porém, o inverso aconteceu com a AMPK, estando seus níveis significativamente diminuídos ($p= 0,0028$) nas biópsias realizadas pelo menos um ano após a cirurgia. E observando por gêneros, essa diminuição somente foi significativa entre os homens ($p=0,0017$).

Na literatura encontramos alguns estudos com aspectos semelhantes, como a pesquisa de Clark *et al.* (2012) [25], que investigou a associação entre a expressão do gene da SIRT-1 com polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) em tecido adiposo subcutâneo e obesidade, em um estudo de caso-controle em adultos e crianças francesas, onde a baixa expressão do gene da SIRT-1 foi associada à obesidade. Zillikens *et al.* (2009) [26] também investigaram se a variação genética da SIRT-1 é associada à obesidade, através do IMC e risco para desenvolver obesidade. Foi detectado que duas variantes comumente encontradas da SIRT-1 (rs7895833 e rs1467568) são associadas com IMC mais baixo em duas populações holandesas independentes e que pessoas portadoras dessas variantes têm de 13 a 18% menos risco de desenvolver obesidade e ganham menos peso com o passar dos anos.

Além desses, no estudo de Zarrabeitia *et al.* (2012) [27], o objetivo foi testar a hipótese de que polimorfismos da SIRT-1 avaliados em sangue periférico estão associados com IMC menor e densidade mineral óssea. Não foi encontrada associação significativa entre genótipos e densidade mineral óssea. Somente nos homens dois polimorfismos (rs3740051 e rs12049646) tendiam ser associados com IMC menor. Os achados sugeriram que variantes comuns do gene da SIRT-1 influenciam o IMC, mas não a densidade mineral óssea. Seguindo na mesma linha, Zheng *et al.* (2012) [28], exploraram se variações alélicas comuns do gene da SIRT-1 estavam associadas com excesso de peso em uma coorte chinesa. Foram avaliados os polimorfismos da SIRT-1 em leucócitos de sangue periférico. O preconizado pela *World Health Organization* (2003) [29] é que o indivíduo seja classificado como sobrepeso com IMC a partir de 30kg/m^2 , mas neste trabalho, foram utilizados pontos de corte diferentes, sendo considerado sobrepeso $\text{IMC} > 23\text{kg/m}^2$. Esta classificação é aplicável às populações do Pacífico ocidental de

acordo com a OMS (WPRO criteria, World Health Organization, 2000) [30], segundo os autores do estudo. O genótipo rs7894483TT foi associado a menores valores de IMC.

Já Wang *et al.* (2011) [31] utilizaram camundongos com uma mutação nula específica hepática da SIRT-1 e identificaram uma via de sinalização envolvendo a SIRT-1. A deficiência da SIRT-1 hepática causou uma produção excessiva de glicose hepática, hiperglicemia crônica, e diminuição da produção de ROS. Enquanto isso, Jin *et al.* (2011) [32] estudaram o possível papel da SIRT-1 nas alterações no metabolismo de glicose e lipídeos em fígados de camundongos com mais de 22-24 meses. Os fígados desses animais mais velhos tiveram uma redução da expressão de SIRT-1 e não apresentaram um bom controle da regulação da SIRT-1 após a hepatectomia parcial. A diminuição da SIRT-1 nos fígados de camundongos mais novos (4-6 meses) resultou em alterações similares às aquelas observadas em fígados de camundongos mais velhos, porém a normalização da SIRT-1 nos fígados de camundongos mais velhos corrige os níveis de glicose e triglicerídeos após a hepatectomia parcial. A normalização dos níveis de SIRT-1 em camundongos mais velhos também melhorou a regeneração hepática. O estudo mostrou um crítico papel da redução da SIRT-1 em disfunções hepáticas associadas à idade e forneceu uma potencial ferramenta para a correção das funções hepáticas em pacientes mais velhos após ressecções cirúrgicas.

Em 2010, Chen *et al.*[33], tiveram como objetivo determinar a expressão da SIRT-1 e SIRT-4 no fígado e pâncreas de ratos alimentados com diferentes dietas e analisar a associação destas proteínas com resistência à insulina e esteatose hepática não alcoólica. O tratamento com restrição calórica aumentou a expressão da SIRT-1 no pâncreas e fígado, enquanto dieta hiperlipídica e com elevada frutose causaram uma diminuição. Os dados obtidos sugeriram que SIRT-1 e SIRT-4 estão envolvidas no desenvolvimento de resistência à insulina e esteatose hepática não alcoólica.

Rodgers & Puigserver (2007) [34] realizaram um estudo com camundongos com o objetivo de demonstrar *in vivo* que SIRT-1 hepática tem relação com a glicose hepática e sistêmica, homeostase lipídica e do colesterol. Neste trabalho, a diminuição da SIRT-1 no fígado causou moderada hipoglicemia, aumento da glicose sistêmica e sensibilidade à insulina e diminuição da produção de glicose. A diminuição da SIRT-1 também diminuiu os níveis séricos de colesterol e aumentou

ácidos graxos livres hepáticos e o teor de colesterol. O aumento da expressão de SIRT-1 reverteu a maioria das alterações causadas pela diminuição dos níveis de SIRT-1 e dependeu da presença da PGC-1. Os resultados indicaram que a SIRT-1 hepática é um importante fator na regulação do metabolismo da glicose e lipídeos em resposta à privação de nutrientes. Já Wang *et al.* (2011) [31] sugerem que a AMPK pode ser modulada pela restrição calórica e que esta enzima age como um principal ditador para os efeitos da restrição calórica na sensibilização da insulina no músculo esquelético, em um estudo com camundongos.

Além disso, em 2010, Peng *et al.* [8], utilizaram um modelo de camundongos, onde demonstrou-se que a dieta rica em gordura induz à esteatose e que a cirurgia bariátrica de *bypass* gástrico leva a uma continuada perda de peso e melhora da esteatose. Ainda confirmou-se que esta cirurgia diminui os triglicerídeos hepáticos e a sinalização hepática lipogênica. Ainda demonstrou-se que as proteínas AMPK e SIRT-1 tem seus níveis aumentados no fígado de ratos obesos submetidos à cirurgia bariátrica de *bypass* gástrico.

Até o presente momento foram encontrados na literatura modelos experimentais comparando alterações na expressão de SIRT-1 e AMPK, avaliando as suas relações com peso, IMC e/ou alguns biomarcadores, conforme os estudos descritos acima. O presente estudo encontrou maior expressão de SIRT-1 em biópsias hepáticas realizadas um ano após a cirurgia bariátrica. Esse achado tem relação muito provável com a redução dos níveis séricos de glicose e alterações no perfil lipídico dos pacientes, o que vem sendo demonstrado nos estudos previamente discutidos.

As evidências experimentais sugerindo aumento da expressão da AMPK após o procedimento cirúrgico são escassas, limitadas a um único artigo [8]. O presente estudo mostrou redução significativa da expressão de AMPK um ano após o procedimento cirúrgico. Considerando o conhecimento ainda incipiente da atividade desses sistemas complexos de regulação metabólica, esse achado precisa ser confirmado em estudos posteriores com grupos maiores de pacientes. Uma hipótese para explicar para tal achado nas biópsias transoperatórias poderia envolver o estresse oxidativo dos pacientes com síndrome metabólica, que potencialmente depletam ATP, além da liberação de citocinas, fator de necrose tumoral alfa e adipocinas, enquanto as modificações metabólicas decorrentes da cirurgia bariátrica possam reduzir a expressão da AMPK ao longo do tempo nos seres humanos pela

diminuição do estresse metabólico. Os resultados deste trabalho vêm a acrescentar e confirmar os resultados anteriormente obtidos, porém, desta vez em tecido humano e relacionando com a cirurgia bariátrica, como ainda não foi constatado pela literatura. Houve correlação entre as variáveis peso, IMC, colesterol total e triglicerídeos no pós-operatório ($p < 0,005$), o que já foi encontrado em vários estudos, cabendo considerar que o cálculo do IMC é realizado a partir do peso dividido pela altura do indivíduo elevada ao quadrado, o que torna a correlação entre as duas variáveis esperada. O presente estudo não evidenciou correlação entre SIRT-1 e/ou AMPK com qualquer das outras variáveis estudadas. Esse achado tem interpretação de valor limitado devido ao número pequeno de pacientes. Ainda assim, é possível que a expressão dessas enzimas, especialmente se avaliada pelo método imunoistoquímico não tenha significado estatístico por limitações relacionadas ao método e também por serem estas proteínas componentes de sistemas complexos ainda pouco conhecidos. Ressalvamos que o termo sistema complexo aqui utilizado deriva da matemática, que o define como qualquer sistema que envolva um número de elementos arranjados em estrutura que pode existir em diferentes escalas e não são passíveis de descrição por uma regra única [35]. Um sistema complexo também pode ser definido como uma rede de componentes heterogêneos que interagem de forma não linear [13,36].

A partir dos resultados, que deverão ser confirmados em estudos posteriores, será igualmente necessária a verificação dos achados por método molecular quantitativo. Além de outra necessidade, que é a avaliação de variações genéticas de SIRT-1 e AMPK.

Com os resultados obtidos no presente estudo podemos concluir que:

- A expressão da SIRT-1 aumentou de forma significativa nas biópsias hepáticas pós-operatórias em comparação às realizadas no transoperatório;
- A expressão da AMPK diminuiu de forma significativa nas biópsias hepáticas pós-operatórias em comparação às realizadas no transoperatório;
- Os dados complementares peso e IMC, além dos parâmetros bioquímicos glicose, colesterol total e triglicerídeos apresentaram melhora significativa no período pós-operatório, quando comparadas aos valores do momento pré-operatório;
- O HDL apresentou melhora no pós-operatório, mas a diferença não foi estatisticamente significativa;

- Não houve relação significativa entre as expressões de SIRT-1 e AMPK com as demais variáveis nesse estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Hursting SD, Berger NA. Energy balance, host-related factors, and cancer progression. *J Clin Oncol*. 2010;28(26):4058-4065.
- [2] Yang T, Fu M, Pestell R, Sauve AA. SIRT1 and endocrine signaling. *Trends Endocrinol Metab*. 2006;17(5):186-191.
- [3] Chung S, Yao H, Caito S, Hwang JW, Arunachalam G, Rahman I. Regulation of SIRT1 in cellular functions: role of polyphenols. *Arch Biochem Biophys* 2010;501(1):79-90.
- [4] Picard F, Kurtev M, Chung N, Ngarm A, Senawong T, Oliveira RM, et al. Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature*. 2004;429(6993):771-776.
- [5] Guarente L. Sirtuins as potential targets for metabolic syndrome. *Nature*. 2006;444(7121):868-874.
- [6] Hardie DG. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:774–785.
- [7] Viollet B, Lantier L, Devin-Leclerc J, Hebrard S, Amouyal C, Mounier R et al. Targeting the AMPK pathway for the treatment of Type 2 diabetes. *Front Biosci*. 2009;14:3380-3400.
- [8] Peng Y, Rideout DA, Rakita SS, Gower WR Jr, You M, Murr MM. Does LKB1 mediate activation of hepatic AMP-protein kinase (AMPK) and sirtuin1 (SIRT1) after Roux-en-Y gastric bypass in obese rats? *J Gastrointest Surg*. 2010;14(2):221-228.
- [9] Steinberg GR, Kemp BE. AMPK in health and disease. *Physiol Rev*. 2009;89:1025–1078.
- [10] Sociedade Brasileira de Cirurgia Bariátrica e Metabólica (SBCBM). Acessado na página da internet <http://www.sbc.org.br> em maio de 2011.
- [11] Bavaresco M, Paganini S, Lima TP, Salgado W Jr, Ceneviva R, Dos Santos JE et al. Nutritional Course of Patients Submitted to Bariatric Surgery. *Obes Surg* 2010;20(6):716-721.
- [12] Sjöström L, Lindroos AK, Peltonen M, Torgerson J, Bouchard C, Carlsson B, et al. Lifestyle, Diabetes, and Cardiovascular Risk factors 10 years after Bariatric Surgery. *N Engl J Med* 2004;351(26):2683-2693.
- [13] Service RF. Complex systems. Exploring the systems of life. *Science*. 1999;284(5411):80-83.
- [14] Mottin CC, Padoin AV, Schroer CE, Barancelli FT, Glock L, Repetto G. Behavior of type 2 diabetes mellitus in morbid obese patients submitted to gastric bypass. *Obes Surg*. 2008;18:179–181.
- [15] Moretto M, Kupski C, da Silva VD, Padoin AV, Mottin CC. Effect of bariatric surgery on liver fibrosis. *Obes Surg*. 2012;22(7):1044-1049.
- [16] Santomauro AC, Ugolini MR, Santomauro AT, Souto RP. Metformina e AMPK: um antigo fármaco e uma nova enzima no contexto da síndrome metabólica. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2008;52(1):120-125.

- [17] Camins A, Sureda FX, Junyent F, Verdaguer E, Folch J, Pelegri C et al. Sirtuin activators: Designing molecules to extend life span. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1799(10-12):740-749.
- [18] Hardie DG. Sensing of energy and nutrients by AMP-activated protein kinase. *Am J Clin Nutr*. 2011;93(4):891-896.
- [19] Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med*. 1991;324(1):1-8.
- [20] Irion LC, Prolla JC, Hartmann AA, Irion KL, Da Silva VD. Angiogenesis in non-small cell lung cancer: microvessel area in needle biopsy in vascular tumor density. *Anal Quant Cytol Histol*. 2008;30(2):83-91.
- [21] Expert Panel on the Identification, evolution, and treatment of overweight in adults - Clinical Guidelines: executive summary. *Am J Clin N* 1998;68:899-917. [22] Lee WJ, Huang MT, Wang W, Lin CM, Chen TC, Lai IR. Effects of obesity surgery on the metabolic syndrome. *Arch Surg*. 2004;139:1088-92.
- [23] Genio F, Alfonsi L, Marra M, Finelli C, Genio G, Rossetti G et al. Metabolic and Nutritional Status Changes After 10% WeightLoss in Severely Obese Patients Treated with LaparoscopicSurgery vs Integrated Medical Treatment. *Obes Surg* 2007;17(12):1592-1598.
- [24] Schiavo M, Lunardelli A, Oliveira JR. Influência da dieta na concentração sérica de triglicérides. *Jornal Bras de Patologia e Medicina Clínica e Laboratorial*. 2003;39(4):283-8.
- [25] Clark SJ, Falchi M, Olsson B, Jacobson P, Cauchi S, Balkau B et al. Association of sirtuin 1 (SIRT1) gene SNPs and transcript expression levels with severe obesity. *Obesity (Silver Spring)*. 2012;20(1):178-185.
- [26] Zillikens MC, van Meurs JB, Rivadeneira F, Amin N, Hofman A, Oostra BA et al. SIRT1 genetic variation is related to BMI and risk of obesity. *Diabetes*. 2009;58(12):2828-2834.
- [27] Zarrabeitia MT, Valero C, Martín-Escudero JC, Olmos JM, Bolado-Carrancio A, de Sande-Nacarino EL et al. Association study of sirtuin 1 polymorphisms with bone mineral density and body mass index. *Arch Med Res*. 2012;43(5):363-368.
- [28] Zheng J, Chen LL, Xiao F, Hu X, Deng X, Li H. Three single nucleotide variants of the SIRT1 gene are associated with overweight in a Chinese population: a case control study. *Endocr J*. 2012;59(3):229-237.
- [29] World Health Organization. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Report of a WHO Study Group. WHO Technical Report Series, Geneva, 2003;916.
- [30] World Health Organization (2000) Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. World Health Organ Tech Rep Ser894:i-xii, 1-253.
- [31] Wang RH, Kim HS, Xiao C, Xu X, Gavrilova O, Deng CX. Hepatic Sirt1 deficiency in mice impairs mTorc2/Akt signaling and results in hyperglycemia, oxidative damage, and insulin resistance. *J Clin Invest*. 2011;121(11):4477-4490.
- [32] Jin J, Iakova P, Jiang Y, Medrano EE, Timchenko NA. The reduction of SIRT1 in livers of old mice leads to impaired body homeostasis and to inhibition of liver proliferation. *Hepatology*. 2011;54(3):989-998.
- [33] Chen YR, Fang SR, Fu YC, Zhou XH, Xu MY, Xu WC. Calorie restriction on insulin resistance and expression of SIRT1 and SIRT4 in rats. *Biochem Cell Biol*. 2010;88(4):715-722.

[34] Rodgers JT, Puigserver P. Fasting-dependent glucose and lipid metabolic response through hepatic sirtuin 1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104(31):12861-12866.

[35] Joslyn, C. and Rocha, L. Complex system may also be considered as any system which involves a number of elements, arranged in structure which can exist in any scales. These go through the processes of change that are not describable by a single rule nor are reducible to only one level of explanation. Towards semiotic agent-based models of socio-technical organizations, *Proc. AI, Simulation and Planning in High Autonomy Systems (AIS 2000) Conference*, Tucson, Arizona, pp. 70-79.

[36] Rocha, LM. BITS: Computer and Communications News. Computing, Information, and Communications Division. Los Alamos National Laboratory. November 1999.

TABELAS

Tabela 1 - Perfil dos pacientes no pré e pós-operatório (N=44).

Variáveis	Média	Desvio-padrão
Idade (anos)	37,18	11,26
Peso pré-operatório (kg)	127,29	27,10
Peso pós-operatório (kg)	82,00	19,94
IMC pré-operatório (kg/m ²)	45,53	9,60
IMC pós-operatório (kg/m ²)	29,31	7,08
Glicose pré-operatória (mg/dL)	118,48	56,25
Glicose pós-operatória (mg/dL)	82,32	11,58
Colesterol total pré-operatório (mg/dL)	197,61	38,34
Colesterol total pós-operatório (mg/dL)	162,82	35,23
HDL pré-operatório (mg/dL)	48,75	14,77
HDL pós-operatório (mg/dL)	52,95	12,29
Triglicerídeos pré-operatório (mg/dL)	158,66	65,35
Triglicerídeos pós-operatório (mg/dL)	96,80	33,21

Tabela 2 - Análise das diferenças pareadas entre o pré e pós-operatório.

Variáveis	Diferença das médias	Desvio-padrão	p
Peso pré e pós-operatório	45,28	13,17	,000
IMC pré e pós-operatório	16,22	4,75	,000
Glicose pré e pós-operatória	36,15	48,08	,000
Colesterol total pré e pós-operatório	34,79	30,24	,000
HDL pré e pós-operatório	4,20	14,01	0,053
Triglicerídeos pré e pós-operatório	61,86	61,53	,000

Tabela 3 – Quantificação da SIRT-1 nas biópsias hepáticas em μm^2 .

	N	Média	Mediana	N Pós-	Média	Mediana	p
	Transoperatório		(p25-p75)	operatório		(p25-p75)	
Homens	13	32,43	0	13	210,48	0 a 506,3	0,0625
Mulheres	31	169,21	0 a 421,6	31	407,69	0 a 782,7	0,0094*
Total	44	128,8	0 a 421,6	44	306,68	0 a 743,3	0,0069*

* p significativo

Tabela 4 – Quantificação da AMPK nas biópsias hepáticas em μm^2 .

	N	Média	Mediana	N Pós-	Média	Mediana	p
	Transoperatório		(p25-p75)	operatório		(p25-p75)	
Homens	13	4608,4	1920,2 a 7604,9	13	2161,9	595,05 a 3656,9	0,0017*
Mulheres	31	3980,6	1853,328 a 7466,093	31	2952,2	790,47 a 5627,75	0,1018
Total	44	4166,1	2254,03 a 6938,7	44	2718,7	946,5 a 3482,2	0,0028*

* p significativo

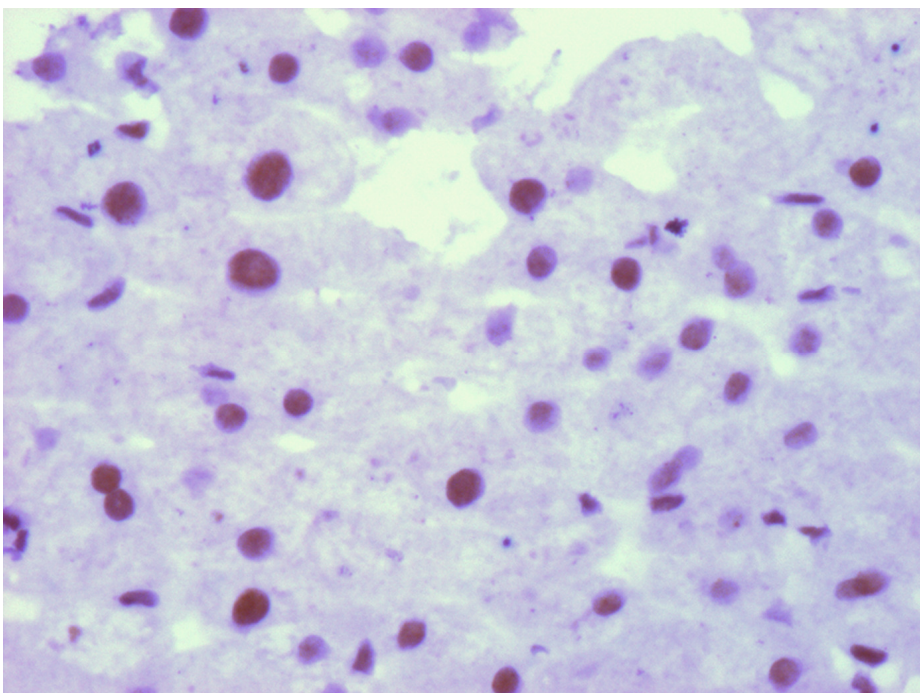
FIGURAS

Figura 1. Parênquima hepático mostrando positividade nuclear na maior parte dos hepatócitos da imagem. SIRT-1, DAB, 100X.

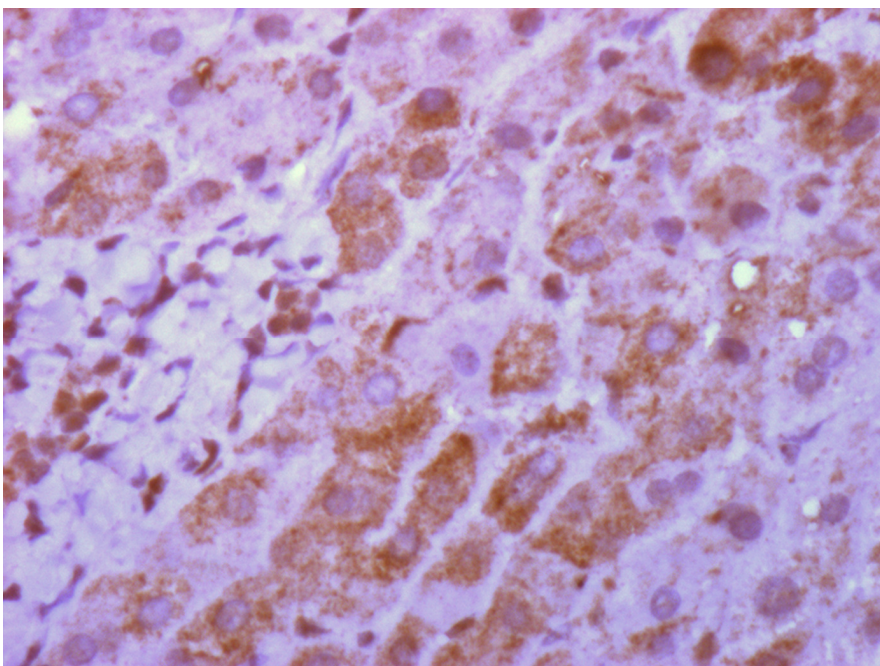


Figura 2. Parênquima hepático mostrando positividade citoplasmática na maior parte dos hepatócitos da imagem. AMPK, DAB, 100X.

ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS

Expression of AMP- Activated Protein Kinase and Sirtuin-1 in Patients Undergoing
Bariatric Surgery

Nathalia Molina Duval da Silva¹, Thomas Dalbem Prates¹, Laura Valduga Pozza¹,
Cláudio Cora Mottin², Myriam Moretto², Alexandre Vontobel Padoin², Vinicius Duval
da Silva¹

¹Serviço de Patologia e ²Centro da Obesidade e Síndrome Metabólica do Hospital
São Lucas da PUCRS, Porto Alegre, Brasil.

Vinicius Duval da Silva

Serviço de Patologia do Hospital São Lucas da PUCRS

Avenida Ipiranga, nº 6690 – Porto Alegre, RS, Brasil

CEP: 90610-000

Phone number: +55 51 33203220

E-mail address: vinids@pucrs.br

ABSTRACT

Introduction and Objective: Sirtuin-1 (SIRT-1) and AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) play important roles in metabolism. The modulation of their activities is considered possible preventive and therapeutic management of obesity and related co-morbidities. The objective of this study was to evaluate the expression of AMPK and SIRT-1 in liver biopsy samples from patients during and after bariatric surgery. We also aimed at evaluating the association between the expression of these proteins with weight, Body Mass Index (BMI) and biochemical parameters (glucose level, total cholesterol, HDL and triglycerides levels).

Methods: The expression of proteins was verified by immunohistochemistry and quantified by microscope digital image processing. Other information was accessed in the database.

Results: Liver biopsies from 44 patients undergoing bariatric surgery were analyzed. The average postoperative weight was lower than the preoperative weight, and consequently, the average BMI was reduced as well. As a result, the patients, who used to have grade 3 obesity, were classified as overweight. The average biochemical parameters showed improvement, except for HDL levels, which had no significant change. Regarding SIRT-1, intraoperative biopsies showed $128.80\mu\text{m}^2$ and biopsies performed one year later presented mean $306.68\mu\text{m}^2$ ($p = 0.0069$). AMPK presented mean $4166.10\mu\text{m}^2$ $2718.70\mu\text{m}^2$, respectively ($p = 0.0028$).

Conclusions: Expression of SIRT-1 increased and expression of AMPK decreased in postoperative liver biopsies, both significantly. The expression pattern found accompanied improvements in weight, BMI, and biomarker profile, which is associated with the development of co-morbidities, were also checked after one year.

Keywords: Sirtuin-1, AMPK, Obesity and Metabolic Syndrome.

INTRODUCTION

Sirtuin-1 (SIRT-1) is a recently described protein, identified as the human homolog of Sir2 (Silent Information Regulator 2). This protein is widely transcribed in mammalian tissues, and their levels are increased after caloric restriction or fasting, in places such as the liver, skeletal muscle and adipose tissue [1,2].

Expression of SIRT-1 as well as its activity is related to the nutrient levels, so it is considered a metabolic sensor. Consequently, it plays a key role in the regulation of critical metabolic and physiological processes [3] such as glucose and lipid metabolism [4], insulin secretion [5], as well as in the regulation of oxygen consumption and mitochondrial capacity [1].

AMP-activated protein kinase (AMPK) is also a sensor of the cellular metabolism [6] which takes part in the body and cellular energy homeostasis, for it regulates cellular adaptation to nutritional and environmental variations [7]. Its activation causes a variety of physiological effects, especially in pathways of lipid and glucose, which occurs by cellular stress (due to conditions such as starvation and exercise). In addition, its expression is regulated by specific hormones, and nutrients [8,9].

Obesity is a chronic metabolic disease of increasing prevalence that has reached epidemic proportions, representing a major public health problem. Treatments that advocate changes in lifestyle and pharmacological therapy are often ineffective, so indication for surgical treatment is necessary, and bariatric surgery has been used increasingly for the main purpose of weight loss and, consequently, improvement in quality of life for these patients, minimizing the risk of early mortality [10,11].

In the postoperative period comorbidities improve significantly, with significant improvement of lipid profile and significant reduction in the levels and incidence of Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM). Several studies have shown improvement in blood glucose levels, triglycerides, decrease in the incidence of T2DM, improvement in hypercholesterolemia, among other positive outcomes [11:12-15].

Given the important metabolic roles of SIRT-1 and AMPK, it becomes increasingly apparent that modulating their activity with drugs may be a future alternative for the prevention and treatment of diseases such as obesity, insulin resistance, T2DM and associated metabolic disorders [8,16-18].

Further studies in human tissue are needed to define the exact role of SIRT-1 and AMPK in the physiopathology of prevalent human diseases such as obesity. Such studies are rare in the literature to date. This is the first study to evaluate the expression of these enzymes in patients undergoing bariatric surgery. The aim of this study was to analyze the expression of AMPK and SIRT-1 in liver histological samples from patients during and after bariatric surgery, and to verify a possible association among the expression of these enzymes, weight, Body Mass Index (BMI) and biochemical parameters (glucose, total cholesterol, HDL and triglycerides).

MATERIALS AND METHODS

We conducted a historical cohort study, in which data were collected from samples in the database of the Pathology Service of the HSL PUCRS of liver biopsies from patients who underwent bariatric surgery Center of Obesity and the Metabolic Syndrome same hospital from 2006 to 2010.

Identification, quantification and comparison of the expression of AMPK and SIRT-1 were observed in histological samples from liver biopsies. Patients underwent this biopsy during the intraoperative phase and at least one year after bariatric surgery, since this is the period of greater weight reduction after the procedure. The implementation of liver biopsy in these two phases is a routine practice of the Center of Obesity and Metabolic Syndrome.

Additional data (weight, BMI, glucose, total cholesterol, HDL, and triglycerides) were obtained from the database of patients of the Center of Obesity and Metabolic Syndrome.

In this study we included histological samples of liver biopsies from morbidly obese patients operated at Center of Obesity and Metabolic Syndrome - PUCRS (Centro da Obesidade e Síndrome Metabólica do HSL da PUCRS) between 2006 and 2010. Another criterion for inclusion was a liver biopsy during surgery and another one at least one year after surgery.

We excluded from the study material patients who abandoned the treatment by the Centre of Obesity and Metabolic Syndrome HSL PUCRS. Other exclusion criteria were liver biopsy with insufficient material for histological assessment, patients with chronic alcohol use (above 20g/day) or with the presence of HBsAg and / or anti-HCV positive.

Expression of AMPK and SIRT-1 was verified by immunohistochemistry and quantified by digital image analysis by Image Pro Plus 4.5.1 (Media Cybernetics, Rockville, USA).

Immunohistochemistry

All slides contained identified tissue samples and positive and negative control tissue and were cut on a Leica RM 2125 RT microtome (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) set to 4 um thick sectioning and submitted to antigen retrieval in water bath at 99oC for 30 minutes with Tris / EDTA buffer, pH 9 (20 mM Tris / 0.65 mM EDTA). Thirty minutes immersion in 3% H₂O₂ / methyl alcohol solution blocked endogenous peroxidase activity. The sections were then immersed in 5% saline solution/PBS buffer for further 30 minutes to reduce background staining and then incubated with monoclonal SIRT-1 (Anti-[E104], Abcam, Cambridge, USA) dilution 1:30 and monoclonal AMPK (Anti-AMPK alpha 1 antibody [Y365]) dilution 1: 100 antibodies. The detection system used was Dako LSAB Peroxidase kit. DAB, PBS buffer solution and 0.002% H₂O₂ stained the slides along with hematoxin counterstain. All procedures were performed on an automated Dako Autostainer Link 48 (DAKO Corp., Carpinteria, USA).

Digital Image Analysis

The slides were analyzed without any prior knowledge of the clinical evolution of patients and their previous histopathological classification . We used a digital analysis system composed of Zeiss Axioskop 40 Microscope (Oberkochen, Germany), Plan-Neofluar, connected via Roper Scientific camera (Media Cybernetics, Rockville, USA) to a Pentium IV 2.2 GHz with 512 MB of RAM, 160 GB hard drive and Image Pro Capture Kit (Media Cybernetics, Rockville, USA). For the digital image analysis, we used Image Pro Plus version 4.5 (Media Cybernetics, Rockville, USA), which enables digital image capture, marking, and counting of the area of interest. The images were captured in TIFF (True Image File Format) without any compression. Image capturing was performed at the Laboratory of Pathology, HSL PUCRS. Images of at least ten non-overlapping random fields of each histological slide were captured with a magnification of 100X. Slides with focal positivity for the markers had its fields selected by hot spot method [19]. The average size of biopsies performed by needle ranged from 2 to 4 mm². Color selection was performed interactively through the agreement among three trained observers, and

then applied to reading of all samples by the system of automated digital image analysis [20].

Data Analysis

Data were entered in Excel (Microsoft, Redmond, USA) and subsequently exported to the IBM SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, IBM, Armonk, USA) v.19.0 for statistical analysis. Quantitative variables were described by mean and standard deviation and compared between groups by Students' t test for independent samples (symmetrical distribution).

Nonparametric Wilcoxon test was used to evaluate the immunohistochemical expression of SIRT-1 and AMPK.

We considered a significance level of 5% and estimate confidence intervals of 95%. Assessment of correlation between variables was performed by Pearson test.

This study was reviewed and approved by the Ethics Committee of Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

RESULTS

Liver biopsies from 44 patients undergoing bariatric surgery met the inclusion and exclusion criteria. Out of these 44 patients, 31 (70.5%) were women and 13 (29.5%) were men. The average age of the patients was 37.18 ± 11.26 years old.

According to Table 1, the average preoperative weight, 127.29 ± 27.10 kg, decreased to 82.00 ± 19.94 kg in the postoperative phase. Along with this decrease of 45.28 ± 13.17 kg, the average BMI decreased from 45.53 ± 9.60 kg / m² to 29.31 ± 7.08 kg / m² in the postoperative phase. Consequently, patients who had been previously classified as grade 3 obesity became overweight. The average values of the biochemical parameters also improved: glucose level decreased from 118.48 ± 56.25 mg / dL to 82.32 ± 11.58 mg / dL, total cholesterol level decreased from 197.61 ± 38.34 mg / dL to $162, 82 \pm 35.23$ mg / dL, triglycerides levels lowered from 158.66 ± 65.35 mg / dL to 96.80 ± 33.21 mg / dL, and HDL-C level increased from 48.75 ± 14.77 mg / dL to $52.95 \pm 12, 29$ mg/dL in the postoperative phase.

Other data were calculated in relation to the means of the difference between the pre-and postoperative phases. They are: weight, which decreased 45.28 ± 13.17 kg, BMI, which was reduced to 16.22 ± 4.75 kg / m²; glucose level, which decreased 36.15 ± 48.08 mg / dL, total cholesterol, reduced to 34.79 ± 30.24 mg / dL, HDL,

which increased to 14.01 ± 4.20 mg / dL and triglycerides levels, reduced to 61.86 ± 61.53 mg / dL.

As can be seen in Table 2, weight, BMI and biochemical parameters showed significant differences, except for HDL level, which showed no significant difference between pre-and postoperative phases.

Results of the measurement showed increased expression of SIRT-1 (Table 3). Among men we found median (p25-p75) of $0 \mu\text{m}^2$ biopsies performed during surgery and 0 to $421.6 \mu\text{m}^2$ in biopsies performed one year after surgery, with no significant difference ($p = 0.0625$). This average was included in Table 3, despite data asymmetry, due to the fact that only one patient's biopsy expressed SIRT-1. The average for men was 32.43 and $210.48 \mu\text{m}^2$, respectively. Eight patients had expression of SIRT-1 in both biopsies.

Among women, we observed median (p25-p75) 0 to $421.6 \mu\text{m}^2$ and 0 to $782.7 \mu\text{m}^2$ in biopsies performed during surgery and one year after surgery, respectively. A significant difference ($p = 0, 0094$), with averages of 169.21 and $407.67 \mu\text{m}^2$ was detected. Nine patients had no expression of SIRT-1 in neither biopsies.

The analysis of 44 patients averaged 128.8 and $306.68 \mu\text{m}^2$ with median (p25-p75) 0 to $421.6 \mu\text{m}^2$ and 0 to $743.3 \mu\text{m}^2$ respectively, with significant difference ($p = 0.0069$).

The evaluation of the correlation between variables showed statistical significance between variables weight, BMI, total cholesterol and triglycerides postoperatively ($p < 0.005$).

The evaluation of AMPK (Table 4) showed reduced expression, with a median of 1920.2 to $7604.9 \mu\text{m}^2$ in biopsies performed during surgery and 3656.9 to 595.05 in biopsies performed one year after surgery among males, with a meaningful difference ($p = 0.0017$) and average of 4608.4 and $2161.9 \mu\text{m}^2$ during and after one year after surgery. Among women, we observed averages of 3980.6 and $2952.2 \mu\text{m}^2$ and medians 1853.328 to $7466.093 \mu\text{m}^2$, down to 790.47 to $5627.75 \mu\text{m}^2$ in biopsies taken during surgery and one year after surgery, respectively. However, there was no significant difference ($p = 0.1018$) among women. All patients had expression of AMPK in both biopsies.

The analysis of the 44 patients had mean and median $4166.1 \mu\text{m}^2$ to 2254.03 to $6938.7 \mu\text{m}^2$ in intraoperative biopsy and $2718.7 \mu\text{m}^2$ averages and medians (p25-

p75) from 946.5 to 3482.2 μm^2 biopsy in one year after surgery, with a significant difference ($p = 0.0028$).

Figure 1 is a field with a positive nuclear SIRT-1 in hepatocytes. Markings were made by 3,3'-diaminoazobenzidine (DAB), with brownish color. Microscopy. Figure 2 shows cytoplasmic positivity for AMPK in hepatocytes.

DISCUSSION

Consequences of weight loss are linked to improved profile of biomarkers related to comorbidities. In this study the average weight decreased 45.28 ± 13.17 kg between the pre- and postoperative phases, with a resulting decrease in the average BMI from 45.53 ± 9.60 kg / m^2 to 29.31 ± 7.08 kg / m^2 in the postoperative phase. This result led patients from grade III obesity to overweight. Some examples of improvements are: the reduction in plasma glucose, insulin, triglycerides and low density lipoproteins (LDL), an increase in plasma concentrations of HDL and the decrease of systolic and diastolic blood pressure [21].

Lee *et al.* [22], assessed the effects of bariatric surgery in patients with metabolic syndrome. There was a significant decrease in systolic and diastolic blood pressure, levels of total cholesterol, triglycerides, and glycemia, in accordance with the findings in this study, where preoperative glycemia was above the recommended level (118.48 ± 56.25 mg / dL) and decreased to 82.32 ± 11.58 mg / dL (value within the normal range).

Changes also occurred regarding lipid profile. Total cholesterol was borderline value to be considered high (197.61 ± 38.34 mg / dL) and decreased to proper value (162.82 ± 35.23 mg / dL). Triglycerides were slightly above the desired level (158.66 ± 65.35 mg / dL) reaching desired level (96.80 ± 33.21 mg / dL). And HDL increased from 48.75 ± 14.77 mg / dL to 52.95 ± 12.29 mg / dL in postoperative phase. Genie *et al.* [23] observed patients undergoing bariatric surgery and conducted blood evaluation in a period after the procedure. The findings were that the levels of total cholesterol decreased significantly, the same occurring with triglycerides and increased HDL. The patients in this study also had a statistically significant reduction of total cholesterol and triglycerides. According to Schiavo, Lunardelli, and Oliveira [24] there is an approximately inverse relationship between the levels of triglycerides and HDL, so that high triglyceride levels tend to be associated with low levels of HDL.

Current evidence in the literature attest to the association of weight loss with a reduction in risk factors for developing comorbidities and improvement in health conditions [12,14,22].

Along with improvement in the parameters evaluated above there was a significant increase ($p = 0.0069$) in the expression of SIRT-1 in postoperative liver biopsies when compared to intraoperative ones. When analyzed separately, this increase was only significant in women ($p = 0.0094$). However, the reverse happened to AMPK, with levels significantly decreased ($p = 0.0028$) in biopsies taken at least one year after surgery. And considering gender, this decrease was significant only among men ($p = 0.0017$).

In the body of literature we found few studies with similar aspects, as research by Clark *et al.* (2012) [25], who investigated the association of SIRT-1 gene expression to single nucleotide polymorphisms (SNP) in subcutaneous adipose tissue in a case-control study with French adults and children, where lower SIRT-1 gene expression was associated with obesity. Zillikens *et al.* (2009) [26] also investigated whether SIRT-1 genetic variation is related to BMI and risk of obesity. Two common variants in SIRT-1 (rs7895833 and rs1467568) were associated with lower BMI in two independent Dutch populations, and people who carry such variants have 13-18% lower risk of obesity and gain less weight over the years.

Besides the studies above, in Zarrabeitia *et al.* (2012) [27], the goal was to test whether SIRT-1 polymorphisms in peripheral blood are associated with lower BMI and Bone Mineral Density. No significant association between genotypes and Bone Mineral Density was found. Only in males two polymorphisms (rs3740051 and rs12049646) tended to be linked to lower BMI. The findings suggested that common variants of the SIRT-1 gene influence BMI but not BMD. Following the same line, Zheng *et al.* (2012) [28] explored whether common allelic variants in the SIRT-1 gene were associated with excess body weight in a Chinese cohort. SIRT-1 polymorphisms were assessed in peripheral blood leukocytes. According to the World Health Organization (2003) [29], subjects are classified as overweight when their BMI is above $30 \text{ kg} / \text{m}^2$, but in this study subjects were considered overweight when their $\text{BMI} > 23 \text{ kg} / \text{m}^2$. This classification applies to the western Pacific populations according to WHO (WPRO criteria, World Health Organization, 2000) [30], according to the study authors. The rs7894483TT allele was associated with lower BMI.

On the other hand, Wang *et al.* (2011) [31] used mice with a liver-specific null mutation of Sirt1 and identified a signaling pathway involving SIRT-1. The SIRT-1 deficiency caused an excessive hepatic glucose liver, chronic hyperglycemia, and decreased production of ROS. Meanwhile, Jin *et al.* (2011) [32] studied the possible role of SIRT-1 on changes in the metabolism of glucose and lipids in livers of mice over 22-24 months. The livers of these older animals had a reduced expression of SIRT-1 and did not have good control of the regulation of SIRT-1 after partial hepatectomy. The reduction of SIRT-1 in the liver of young mice (4-6 months) resulted in changes similar to those observed in livers of older mice, but normalization of SIRT-1 in the liver of aging mice corrects the levels of glucose and triglycerides after partial hepatectomy. The normalization of SIRT-1 in older mice also improved liver regeneration. The study showed a reduction of the critical role of SIRT-1 in liver disorders associated with age and provided a potential tool for the correction of liver function in older patients after surgical resections.

In 2010, Chen *et al.* [33], aimed to determine the expression of SIRT-1 and SIRT-4 in the liver and pancreas of rats fed different diets and to analyze the association of these proteins with insulin resistance and NAFLD. Treatment with caloric restriction increased the expression of SIRT-1 in the pancreas and liver, while fat diet and high fructose caused a decrease. Data suggested that SIRT-1 and SIRT-4 are involved in the development of insulin resistance and NAFLD.

Rodgers & Puigserver (2007) [34] conducted a study with mice in order to demonstrate *in vivo* that hepatic SIRT-1 is related to systemic and hepatic glucose, lipid and cholesterol homeostasis. In this study, knockdown of SIRT-1 in the liver caused mild hypoglycemia, increased systemic glucose and insulin sensitivity, and decreased glucose production. SIRT-1 knockdown also decreased serum cholesterol levels and increased hepatic free fatty acid and cholesterol content. Overexpression of SIRT-1 reversed many of the changes caused by SIRT-1 knockdown and depended on the presence of PGC-1 alpha. Results also showed that SIRT-1 is an important factor in the regulation of glucose and lipid metabolism in response to nutrient deprivation. Wang *et al.* (2011) [31] suggest that AMPK can be modulated by caloric restriction and that this enzyme acts as a dictator for the main effects of calorie restriction on insulin sensitivity in skeletal muscle, in a study with mice.

Furthermore, in 2010, Peng *et al.* [8] used a mouse model which showed that a diet high in fat which induces fatty liver surgery and bariatric gastric bypass leads to

a continuing weight loss and improves fatty liver. In addition, it was confirmed that this surgery decreases hepatic triglyceride and signaling of hepatic lipogenesis. It was also shown that AMPK and SIRT-1 levels increased in the liver of obese mice undergoing bypass bariatric surgery.

Literature has presented experimental models comparing changes in the expression of SIRT-1 and AMPK, evaluating its relationship with weight, BMI, and / or some biomarkers, according to the studies described above. This study found a higher expression of SIRT-1 in liver biopsies performed one year after bariatric surgery. This finding most likely relates to the reduction of serum glucose and changes in lipid profile of patients, which has been shown in studies previously discussed.

Experimental evidence suggesting increased expression of AMPK after surgery are scarce, limited to a single article [8]. The present study showed significant reduction in expression of AMPK one year after surgery. Considering the incipient knowledge of the activity of these complex systems of metabolic regulation, this finding needs to be confirmed in further studies with larger groups of patients. One hypothesis to account for this finding in the intraoperative biopsies could involve oxidative stress in patients with metabolic syndrome, which potentially deplete ATP, besides the release of cytokines, tumor necrosis factor-alpha and adipokines, while the metabolic changes resulting from bariatric surgery can reduce the expression of AMPK over time in humans by reduction of metabolic stress. The results of this study have to add to and confirm the results obtained previously, but this time in human tissue and relating with bariatric surgery, which has not yet been found in the literature. Correlation between the variables weight, BMI, total cholesterol and triglycerides in the postoperative phase ($p < 0.005$), which has been found in several studies. It is important to take into consideration that BMI is defined as an individual's weight divided by the square of their height, which makes the correlation between the two variables expected. The present study showed no correlation between SIRT-1, and / or AMPK with any of the other variables studied. Interpretation of this finding is of limited value due to the small number of patients. Still, it is possible that expression of these enzymes, especially when evaluated by immunohistochemistry is not statistically significant due to limitations related to the method and also to the fact that these proteins are components of complex systems still poorly understood. We point out that the term complex system used here is

derived from mathematics, which defines it as any system that involves a number of elements arranged in a structure that can exist in different scales and are not amenable to description by a single rule. [35] A complex system may also be defined as a network of heterogeneous components that interact nonlinearly [13,36].

From the results, which should be confirmed in future studies, it will also be necessary to verify the findings by quantitative molecular method, in addition to other need, which is the assessment of genetic variations SIRT-1 and AMPK.

With the results obtained in the present study we conclude that:

- the expression of SIRT-1 increased significantly in postoperative liver biopsies compared to those performed during surgery;
- the expression of AMPK decreased significantly in postoperative liver biopsies compared to those performed during surgery;
- Additional data (weight and BMI), along with biochemical parameters (glucose, total cholesterol and triglycerides) showed significant improvement in the postoperative period when compared to the values of the preoperative period;
- HDL showed improvement in the postoperative phase, but the difference was not statistically significant;
- there was no significant relationship between the expression of SIRT-1 and AMPK with the other variables in this study.

REFERENCES

- [1] Hursting SD, Berger NA. Energy balance, host-related factors, and cancer progression. *J Clin Oncol*. 2010;28(26):4058-4065.
- [2] Yang T, Fu M, Pestell R, Sauve AA. SIRT1 and endocrine signaling. *Trends Endocrinol Metab*. 2006;17(5):186-191.
- [3] Chung S, Yao H, Caito S, Hwang JW, Arunachalam G, Rahman I. Regulation of SIRT1 in cellular functions: role of polyphenols. *Arch Biochem Biophys* 2010;501(1):79-90.
- [4] Picard F, Kurtev M, Chung N, Ngarm A, Senawong T, Oliveira RM, et al. Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature*. 2004;429(6993):771-776.
- [5] Guarente L. Sirtuins as potential targets for metabolic syndrome. *Nature*. 2006;444(7121):868-874.
- [6] Hardie DG. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:774–785.
- [7] Viollet B, Lantier L, Devin-Leclerc J, Hebrard S, Amouyal C, Mounier R et al. Targeting the AMPK pathway for the treatment of Type 2 diabetes. *Front Biosci*. 2009;14:3380-3400.
- [8] Peng Y, Rideout DA, Rakita SS, Gower WR Jr, You M, Murr MM. Does LKB1 mediate activation of hepatic AMP-protein kinase (AMPK) and sirtuin1 (SIRT1) after Roux-en-Y gastric bypass in obese rats? *J Gastrointest Surg*. 2010;14(2):221-228.
- [9] Steinberg GR, Kemp BE. AMPK in health and disease. *Physiol Rev*. 2009;89:1025–1078.
- [10] Sociedade Brasileira de Cirurgia Bariátrica e Metabólica (SBCBM). Acessado na página da internet <http://www.sbcbr.org.br> em maio de 2011.
- [11] Bavaresco M, Paganini S, Lima TP, Salgado W Jr, Ceneviva R, Dos Santos JE et al. Nutritional Course of Patients Submitted to Bariatric Surgery. *Obes Surg* 2010;20(6):716-721.
- [12] Sjöström L, Lindroos AK, Peltonen M, Torgerson J, Bouchard C, Carlsson B, et al. Lifestyle, Diabetes, and Cardiovascular Risk factors 10 years after Bariatric Surgery. *N Engl J Med* 2004;351(26):2683-2693.
- [13] Service RF. Complex systems. Exploring the systems of life. *Science*. 1999;284(5411):80-83.
- [14] Mottin CC, Padoin AV, Schroer CE, Barancelli FT, Glock L, Repetto G. Behavior of type 2 diabetes mellitus in morbid obese patients submitted to gastric bypass. *Obes Surg*. 2008;18:179–181.
- [15] Moretto M, Kupski C, da Silva VD, Padoin AV, Mottin CC. Effect of bariatric surgery on liver fibrosis. *Obes Surg*. 2012;22(7):1044-1049.
- [16] Santomauro AC, Ugolini MR, Santomauro AT, Souto RP. Metformina e AMPK: um antigo fármaco e uma nova enzima no contexto da síndrome metabólica. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2008;52(1):120-125.
- [17] Camins A, Sureda FX, Junyent F, Verdaguer E, Folch J, Pelegri C et al. Sirtuin activators: Designing molecules to extend life span. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1799(10-12):740-749.
- [18] Hardie DG. Sensing of energy and nutrients by AMP-activated protein kinase. *Am J Clin Nutr*. 2011;93(4):891-896.
- [19] Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med*. 1991;324(1):1-8.

- [20] Irion LC, Prolla JC, Hartmann AA, Irion KL, Da Silva VD. Angiogenesis in non-small cell lung cancer: microvessel area in needle biopsy in vascular tumor density. *Anal Quant Cytol Histol.* 2008;30(2):83-91.
- [21] Expert Panel on the Identification, evolution, and treatment of overweight in adults - Clinical Guidelines: executive summary. *Am J Clin N* 1998;68:899-917. [22] Lee WJ, Huang MT, Wang W, Lin CM, Chen TC, Lai IR. Effects of obesity surgery on the metabolic syndrome. *Arch Surg.* 2004;139:1088–92.
- [23] Genio F, Alfonsi L, Marra M, Finelli C, Genio G, Rossetti G et al. Metabolic and Nutritional Status Changes After 10% WeightLoss in Severely Obese Patients Treated with LaparoscopicSurgery vs Integrated Medical Treatment. *Obes Surg* 2007;17(12):1592-1598.
- [24] Schiavo M, Lunardelli A, Oliveira JR. Influência da dieta na concentração sérica de triglicérides. *Jornal Bras de Patologia e Medicina Clínica e Laboratorial.* 2003;39(4):283-8.
- [25] Clark SJ, Falchi M, Olsson B, Jacobson P, Cauchi S, Balkau B et al. Association of sirtuin 1 (SIRT1) gene SNPs and transcript expression levels with severe obesity. *Obesity (Silver Spring).* 2012;20(1):178-185.
- [26] Zillikens MC, van Meurs JB, Rivadeneira F, Amin N, Hofman A, Oostra BA et al. SIRT1 genetic variation is related to BMI and risk of obesity. *Diabetes.* 2009;58(12):2828-2834.
- [27] Zarrabeitia MT, Valero C, Martín-Escudero JC, Olmos JM, Bolado-Carrancio A, de Sande-Nacarino EL et al. Association study of sirtuin 1 polymorphisms with bone mineral density and body mass index. *Arch Med Res.* 2012;43(5):363-368.
- [28] Zheng J, Chen LL, Xiao F, Hu X, Deng X, Li H. Three single nucleotide variants of the SIRT1 gene are associated with overweight in a Chinese population: a case control study. *Endocr J.* 2012;59(3):229-237.
- [29] World Health Organization. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Report of a WHO Study Group. WHO Technical Report Series, Geneva, 2003;916.
- [30] World Health Organization (2000) Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. World Health Organ Tech Rep Ser894:i-xii, 1-253.
- [31] Wang RH, Kim HS, Xiao C, Xu X, Gavrilova O, Deng CX. Hepatic Sirt1 deficiency in mice impairs mTorc2/Akt signaling and results in hyperglycemia, oxidative damage, and insulin resistance. *J Clin Invest.* 2011;121(11):4477-4490.
- [32] Jin J, Iakova P, Jiang Y, Medrano EE, Timchenko NA. The reduction of SIRT1 in livers of old mice leads to impaired body homeostasis and to inhibition of liver proliferation. *Hepatology.* 2011;54(3):989-998.
- [33] Chen YR, Fang SR, Fu YC, Zhou XH, Xu MY, Xu WC. Calorie restriction on insulin resistance and expression of SIRT1 and SIRT4 in rats. *Biochem Cell Biol.* 2010;88(4):715-722.
- [34] Rodgers JT, Puigserver P. Fasting-dependent glucose and lipid metabolic response through hepatic sirtuin 1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104(31):12861-12866.
- [35] Joslyn, C. and Rocha, L. Complex system may also be considered as any system which involves a number of elements, arranged in structure which can exist in any scales. These go through the processes of change that are not describable by a single rule nor are reducible to only one level of explanation. Towards semiotic agent-based models of socio-technical organizations, *Proc. AI, Simulation*

and Planning in High Autonomy Systems (AIS 2000) Conference, Tucson, Arizona, pp. 70-79.

[36] Rocha, LM. BITS: Computer and Communications News. Computing, Information, and Communications Division. Los Alamos National Laboratory. November 1999.

TABLES

Table 1 – Profile of patients in pre- and postoperative phase (N=44).

Variables	Mean	Standard Deviation
Age (y)	37,18	11,26
Preoperative weight (kg)	127,29	27,10
Postoperative weight (kg)	82,00	19,94
Preoperative BMI (kg/m ²)	45,53	9,60
Postoperative BMI (kg/m ²)	29,31	7,08
Preoperative glucose level (mg/dL)	118,48	56,25
Postoperative glucose level (mg/dL)	82,32	11,58
Preoperative total cholesterol (mg/dL)	197,61	38,34
Postoperative total cholesterol (mg/dL)	162,82	35,23
Preoperative HDL-C level (mg/dL)	48,75	14,77
Postoperative HDL-C (mg/dL)	52,95	12,29
Preoperative triglyceride level (mg/dL)	158,66	65,35
Postoperative triglyceride level (mg/dL)	96,80	33,21

Table 2 – Analysis of difference between pre- and postoperative phases

Variables	Mean Difference	Standard Deviation	p
Pre and postoperative weight	45,28	13,17	,000
Pre and postoperative BMI	16,22	4,75	,000
Pre and postoperative glucose level	36,15	48,08	,000
Pre and postoperative total cholesterol	34,79	30,24	,000
Pre and postoperative HDL-C level	4,20	14,01	0,053
Pre and postoperative triglyceride level	61,86	61,53	,000

Table 3 – Quantification of SIRT-1 in liver biopsies (μm^2)

	N	Mean	Median	N	Mean	Median	p
	Intraoperative		(p25-p75)	Postoperative		(p25-p75)	
	Phase			Phase			
Male	13	32,43	0	13	210,48	0 a 506,3	0,0625
Female	31	169,21	0 a 421,6	31	407,69	0 a 782,7	0,0094*
Total	44	128,8	0 a 421,6	44	306,68	0 a 743,3	0,0069*

* significant p

Table 4 – Quantification of AMPK in liver biopsies μm^2 .

	N	Mean	Median	N	Média	Median	p
	Intraoperative		(p25-	Postoperative		(p25-p75)	
	Phase		p75)	Phase			
Male	13	4608,4	1920,2 a 7604,9	13	2161,9	595,05 a 3656,9	0,0017*
Female	31	3980,6	1853,328 a 7466,093	31	2952,2	790,47 a 5627,75	0,1018
Total	44	4166,1	2254,03 a 6938,7	44	2718,7	946,5 a 3482,2	0,0028*

* significant p

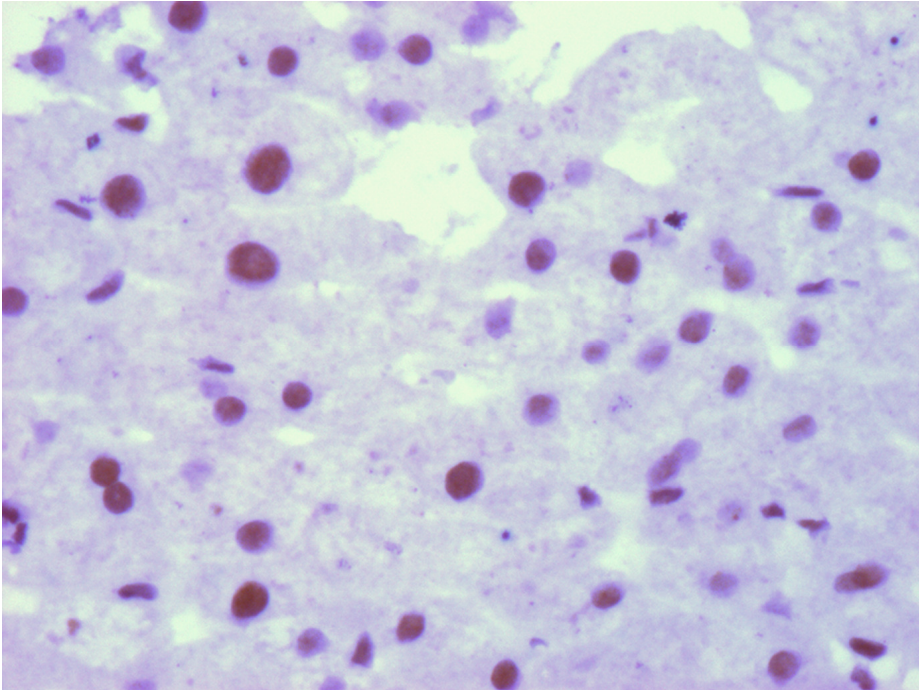
FIGURES

Figure 1. Liver parenchyma shows nuclear positivity in most hepatocytes in image. SIRT-1, DAB, 100X.

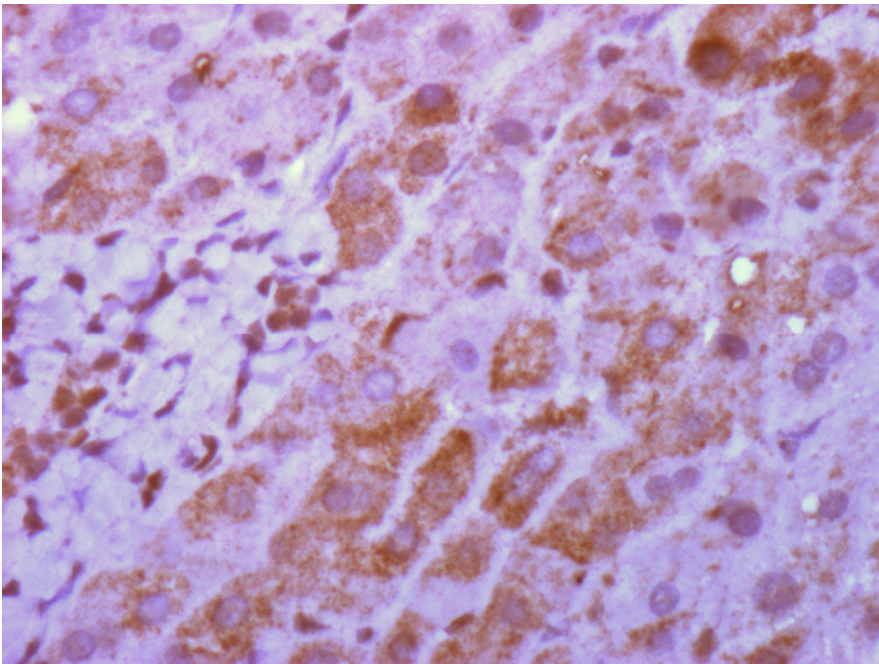


Figure 2. Liver parenchyma shows cytoplasmic positivity of hepatocytes in image. AMPK, DAB, 100X.

ANEXO A

Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE DO
SUL - PUC/RS



PROJETO DE PESQUISA

Título: Expressão da Proteína Quinase Ativada por AMP e Sirtuina 1 em Pacientes Submetidos à Cirurgia Bariátrica

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 05504712.7.0000.5336

Pesquisador: VINICIUS DUVAL DA SILVA

Instituição: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUC/RS

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 97.022

Data da Relatoria: 10/09/2012

Apresentação do Projeto:

O estudo visa analisar a expressão da proteínaquinase AMPK e da SIRT-1 em lâminas de fígado de pacientes submetidos à cirurgia bariátrica no pré e 1 ano após a cirurgia.

Objetivo da Pesquisa:

Verificar e expressão dos protetores do hepatócito AMPK e SIRT-1 em pacientes submetidos à cirurgia bariátrica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos face estudo em lâminas de banco de dados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Importante para avaliação dos benefícios da cirurgia.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados

Recomendações:

Pendências resolvidas

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pendências resolvidas

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Ipiranga, 6681

Bairro: CEP: 90.619-900

UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE

Telefone: (513)320-3345 **Fax:** (513)320-3345 **E-mail:** cep@pucrs.br

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE DO
SUL - PUC/RS



Considerações Finais a critério do CEP:

PORTO ALEGRE, 13 de Setembro de 2012

Assinado por:
Rodolfo Herberto Schneider

Endereço: Av.Ipiranga, 6681

Bairro:

CEP: 90.619-900

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (513)320-3345

Fax: (513)320-3345

E-mail: cep@pucrs.br

ANEXO B

Acordo de confidencialidade do estudo AVABAR/ARPCBB



Ministério da
Ciência e Tecnologia



ARPCBB – AVABAR FINEP1856/07

ESTUDO AVABAR/ARPCBB ACORDO DE CONFIDENCIALIDADE

Declaro que participo, como investigador/co-investigador/participante, do Estudo AVABAR/ARPCBB – Avaliação Retrospectiva e Prospectiva da Cirurgia Bariátrica no Brasil, INFORMAÇÕES CONFIDENCIAIS, contidas no Protocolo do Estudo e resultados obtidos poderão me ser fornecidos.

Estou de acordo que as INFORMAÇÕES CONFIDENCIAIS (protocolo e dados) que me serão reveladas são propriedade exclusiva do PATROCINADOR (Financiadora de Estudos e Projetos – FINEP). Conseqüentemente, concordo que não revelarei para terceiros sem o prévio consentimento por escrito da FINEP (ou representante) e não usarei estas INFORMAÇÕES CONFIDENCIAIS para nenhum outro propósito que não contemple/esteja relacionado à possibilidade de minha participação neste ESTUDO.

Eu também assumo o compromisso de não publicar, seja sob a forma escrita ou oral, qualquer informação relativa àquelas aqui definidas como INFORMAÇÕES CONFIDENCIAIS e/ou ao ESTUDO e seus resultados sem o consentimento prévio por escrito do PATROCINADOR ou representante (Comissão Científica). No caso de autorização de publicação, pela comissão científica do projeto comprometo-me em divulgar o PATROCINADOR como financiador do estudo. Comprometo-me, da mesma forma, a não registrar pedido de patente e de reclamar como meus quaisquer direitos sobre possíveis registros de patentes relativos às INFORMAÇÕES CONFIDENCIAIS.

Nada neste acordo deve constituir em obrigação do PATROCINADOR em manter meus serviços na condução deste ESTUDO ou de compensar-me de alguma maneira, exceto se expressamente acordado com o PATROCINADOR, em contrato específico. Ao término de minha colaboração com o PATROCINADOR, por qualquer motivo (exceto se eu participar deste estudo), todas as INFORMAÇÕES CONFIDENCIAIS que me foram reveladas deverão ser devolvidas ao PATROCINADOR, que permanece o proprietário exclusivo de tais INFORMAÇÕES CONFIDENCIAIS.

Concordo que todas as obrigações legais aqui assumidas devem permanecer vigentes por um período de dez (10) anos, contados a partir da data de assinatura deste Acordo.

Nome: VINÍCIUS DUJAL DA SILVA

Data: 01/03/2012

Endereço: TV TUPUTY, 45 - PORTO ALEGRE, RS - 90050-270

Assinatura: