

LUCIANA MELA UMEDA

**BENEFÍCIOS PRECOSES DA CIRURGIA DO *BYPASS*
GÁSTRICO EM Y DE ROUX: IMPLICAÇÕES DO GLP-1 E
ADIPONECTINA NA MELHORA DO PERFIL METABÓLICO
DE PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 2**

Tese Apresentada à Universidade Federal de
São Paulo – Escola Paulista de Medicina para
obtenção do Título de Doutor em Ciências

São Paulo

2011

LUCIANA MELA UMEDA

**BENEFÍCIOS PRECOSES DA CIRURGIA DO *BYPASS*
GÁSTRICO EM Y DE ROUX : IMPLICAÇÕES DO GLP-1 E
ADIPONECTINA NA MELHORA DO PERFIL METABÓLICO
DE PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 2**

Tese Apresentada à Universidade Federal de
São Paulo – Escola Paulista de Medicina para
obtenção do Título de Doutor em Ciências

Orientadora:

Profa. Dra. Maria Teresa Zanella (UNIFESP)

Co-Orientadora:

Profa. Dra. Glaucia Carneiro (UNIFESP)

São Paulo

2011

Umeda, Luciana Mela

Benefícios Precoces da Cirurgia do Bypass Gástrico em Y de Roux: Implicações do GLP-1 e Adiponectina na Melhora do Perfil Metabólico de Pacientes com Diabetes Mellitus tipo 2. – Luciana Mela Umeda-São Paulo, 2011.

ix, 53 p

Tese (Doutorado)-Universidade Federal de São Paulo-Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Endocrinologia.

Título em inglês: Early benefits from Roux-en-Y gastric bypass surgery: implications of GLP-1 and adiponectin in the improvement of metabolic profile in the patients with type 2 diabetes mellitus

1. Obesidade; 2. Diabetes mellitus tipo 2; 3. *Bypass* gástrico em Y de Roux;
4. Glicemia; 5. Sensibilidade à insulina; 6. GLP-1;
7. Adiponectina; 8. Hipertrigliceridemia pós prandial.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
DISCIPLINA DE ENDOCRINOLOGIA

Chefe do Departamento de Medicina:

Prof. Dr. Reinaldo Salomão

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Endocrinologia Clínica:

Prof. Dra. Regina Celia Mello Santiago Moisés

LUCIANA MELA UMEDA

**BENEFÍCIOS PRECOSES DA CIRURGIA DO *BYPASS*
GÁSTRICO Y DE ROUX: IMPLICAÇÕES DO GLP-1 E
ADIPONECTINA NA MELHORA DO PERFIL METABÓLICO DE
PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO2**

Presidente da Banca:

Profa. Dra. Maria Teresa Zanella

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Laércio Gomes Lourenço

Prof. Dr. Marcos Antônio Tambascia

Profa. Dra. Maria Elisabeth Rossi da Silva

Profa. Dra. Rosana Bento Radominski

Suplentes:

Profa. Dra. Bianca de Almeida Pititto

Profa. Dra. Cíntia Cercato

"O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada.

Caminhando e semeando, no fim terás o que colher".

Cora Coralina

Essa tese é dedicada:

Primeiramente à Deus, por me proporcionar uma família digna, lar e amigos sinceros, que foram fundamentais na confecção e término dessa tese.

À minha mãe, Evangeli Mela Umeda, pelas constantes demonstrações de compreensão e carinho. Obrigada por ser a flor mais rara do meu jardim!

Ao meu pai, Julio Umeda, por sempre incentivar o estudo e a perseverança.

Aos meus avós, Odette Dentine Mela e Francisco Orlando Mela (in Memoriam), que sempre acreditaram no meu potencial, dando incentivo e amor. Saudades!

Ao meu marido Wilson dos Santos Junior. Agradeço diariamente por ter encontrado uma pessoa tão especial, que preenche nossos dias de amor e carinho. Wil, peço desculpas pelos artigos espalhados pela casa, pela bagunça das calopsitas e da impressora barulhenta até altas horas da madrugada!

Aos meus familiares queridos: Sônia, Mauro, Milene, tio Wirso, tia Irene e Carmeluce.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Maria Teresa Zanella por orientar essa tese e semear o gosto pela pesquisa. Com ela aprendi a confiar nos meus resultados e descobrir através do estudo, o sentido profundo dos dados encontrados. Agradeço por sua dedicação, paciência e incentivo.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Glaucia Carneiro por ser uma pessoa tão solícita, paciente e motivada. Agradeço pela sua amizade e pela ajuda na interpretação e avaliação estatística dos dados.

Ao Prof. Dr. Carlos Haruo Arasaki por ter realizado o procedimento cirúrgico nos pacientes, e ter acreditado no resultado das nossas pesquisas.

Ao Prof. Dr. Bruno Geloneze Neto pela receptividade e auxílio durante as minhas visitas à UNICAMP. Agradeço por ter auxiliado na realização do primeiro artigo desta tese.

À Profa. Dra. Eliana Aparecida da Silva responsável por incentivar a escolha da minha área de pesquisa e pelas discussões no ambulatório de obesidade.

À Profa. Dra. Bianca de Almeida Pititto por sua amizade e motivação na realização desta tese.

À Dra. Andrea Pereira por sua amizade, carinho e por despertar o interesse pela área de nutrologia.

Ao Prof. Dr. Fernando Flexa Ribeiro Filho por suas sugestões, opiniões e ajuda no manejo do programa SPSS.

Ao Prof. Dr. Marcelo Batista pelo incentivo ao estudo e pelas discussões de artigos no ambulatório.

Aos professores da disciplina de endocrinologia, principalmente o Prof. Dr. Sérgio Atala Dib.

Aos Professores da disciplina de nefrologia: Prof. Dr. Artur Beltrame, Prof. Dr. Oswaldo Kolmann Junior, Profa. Dra. Frida Plavinik.

À Profa. Dra. Mônica Ribeiro Maués por sua simpatia, amizade e companheirismo nas atividades da pós-graduação que estávamos envolvidas.

À amiga Maria Isabel Rodrigues de Matos pela amizade e confiança. Com você, aprendi a importância da psicologia na patogênese da obesidade.

À amiga Mônica Recusani pelo constante auxílio nas atividades da pós-graduação, sempre competente e carinhosa.

Aos amigos que fiz no ambulatório de obesidade: Lydía Mariosa Sebba, Adriana Falcão, Rodolfo Leão, Douglas Barbieri, Patrícia L Zach, Andreia Hirota, Luciana Tock, Graciela Bussiki Correa da Costa, Sylvia MV Lobo, Simone Matsuda e Suelen Lima.

Ao grupo de nutrição do ambulatório de obesidade por enriquecer a nossa equipe multidisciplinar.

À Aparecida Filomena P Ferraz (Mena) pelas dosagens de insulina.

À Antônio Ramos Calixto da LIMED (UNICAMP) pelo auxílio nas dosagens de GLP-1 e glucagon.

Aos amigos e amigas que sempre deram apoio na realização desta tese: Sílvia Ii, Fernanda Ii, Beatriz Oruê, Renata Z A Fideli, Alessandra C Gushi, Luciana Machado, Fernando Valente e Renato Zilli.

Aos funcionários do Centro integrado de Hipertensão e Metabologia Cardiovascular pelos anos de dedicação e cooperação: Nárcia E Kolmann, Ednir C Apostólico, Elza R Silva, Marta Aparecida Correia, Viviane A Camilo, Marídia S Cangirana, Paula de Mauro, Ane Caroline F Dantas, Isabel Regina Valentin, Rosimeire B Arcoverde e Camila Recusani.

Às secretárias da pós-graduação: Amaryllis Salsano e Yeda Queiroga pelo apoio e paciência.

Aos pacientes que fizeram parte dos protocolos de estudo. Agradeço pela confiança e pelas constantes demonstrações de carinho. Espero que a cirurgia realizada tenha proporcionado uma expectativa de vida melhor para vocês! Obrigada!

SUMÁRIO

Dedicatória	vi
Agradecimentos	vii
1. Considerações Iniciais	01
2. Objetivos	08
3. Artigo 1	10
4. Artigo 2	17
5. Resultados e Conclusões	36
6. Anexos	39

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Obesidade, um estado de resistência à insulina por excelência, é um dos principais fatores de risco para diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) e dislipidemia, aumentando assim a mortalidade por doenças cardiovasculares ⁽¹⁾.

O acúmulo de gordura visceral leva ao aumento de adipocitocinas inflamatórias e elevação de ácidos graxos livres na circulação, músculo e fígado que, por sua vez, são responsáveis pela resistência à insulina ⁽²⁾.

Sabe-se que perdas de 5 a 10% do peso corporal promovem melhoras significativas dos parâmetros metabólicos ^(3,4). Entretanto, mudanças do estilo de vida e terapias medicamentosas são pouco eficazes nos pacientes obesos graves para promover redução e manutenção do peso.

A cirurgia bariátrica é o tratamento mais efetivo para perda e manutenção de peso em longo prazo, apresentando resultados favoráveis nos fatores de risco cardiovascular com melhora dos perfis glicêmico e lipídico e da resistência à insulina em pacientes obesos.

Melhora ou mesmo remissão do DMT2 tem sido observada nas diversas modalidades cirúrgicas atuais realizadas em indivíduos com índice de massa corporal (IMC) igual ou superior a 35 kg/m².

No estudo Greenville ⁽⁵⁾, 608 pacientes foram acompanhados por até 14 anos após a cirurgia do *bypass* gástrico. Desses pacientes, 146 eram diabéticos, sendo que 83% permaneceram com controle glicêmico satisfatório no período de seguimento do estudo. Apenas 22% dos diabéticos não apresentaram remissão da doença, sendo que a maioria tinha idade mais avançada e apresentava longo histórico de evolução da doença.

Outro estudo clássico, o Swedish Obesity Subjects (SOS) ⁽⁶⁾, recrutou 4.047 obesos submetidos à cirurgia bariátrica e utilizou técnicas restritivas, mistas e

disabsortivas ou permaneceram no tratamento clínico para obesidade, tendo sido este considerado como grupo controle. Os resultados demonstraram que a prevalência de DMT2 era de 8% no grupo controle versus 1% no grupo cirurgia após 2 anos de seguimento. No acompanhamento de 10 anos, 24% do grupo controle apresentava diabetes, contra 7% no grupo cirúrgico.

As várias modalidades cirúrgicas apresentam diferentes impactos na perda de peso e controle do DMT2. Nas cirurgias restritivas, ocorre perda de aproximadamente 10 a 20% do peso inicial, sendo que a melhora do controle glicêmico e da resistência à insulina se correlacionaram com a perda de peso adquirida após o procedimento ⁽⁷⁾. Nas cirurgias que envolvem o desvio do trânsito alimentar, como a derivação ou “bypass” gastrojejunal em Y de Roux (BGYR) e derivação biliopancreática (DBP), ocorre restrição calórica e diferentes graus de disabsorção. Na cirurgia do BGYR, a técnica empregada é mais restritiva e menos disabsortiva (mista) e no DBP prevalece a disabsorção. Nessas duas técnicas, a melhora da sensibilidade à insulina ocorre precocemente, poucos dias após o ato operatório ⁽⁸⁾.

Buchwald ⁽⁹⁾, em uma meta-análise realizada em 2004, demonstrou uma perda média do excesso de peso de 46,2%, 59,5% e 63,3% para banda gástrica ajustável, BGYR e DBP e, em termos de remissão do diabetes, 56,7%, 80,3% e 95,1% para as mesmas técnicas respectivamente. O estudo reforça a superioridade das cirurgias que envolvem o desvio do trato gastrointestinal no controle glicêmico nos pacientes obesos com DMT2.

Enfatizando a cirurgia do BGYR, foco desta tese, várias teorias tentam explicar a melhora precoce do diabetes nos pacientes operados por essa modalidade cirúrgica.

A restrição calórica a qual os pacientes são submetidos no pós-operatório seria uma possível hipótese. A dieta hipocalórica levaria a um aumento da neoglicogênese intestinal que promoveria uma redução da produção hepática de glicose, melhorando a resistência hepática à insulina e o controle glicêmico ⁽¹⁰⁾. Cummings et al ⁽¹¹⁾ propõe que o aumento do trânsito intestinal causado pelo desvio cirúrgico do trato intestinal e a presença de alimentos não digeridos no intestino distal (principalmente no íleo) aumentaria a secreção de hormônios intestinais como o peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1) e o peptídeo YY (PYY), que atuam ao nível do sistema nervoso central, causando efeitos anorexígenos. O GLP-1, através de sua ação insulínica e na redução dos níveis de glucagon, teria ações benéficas no controle glicêmico dos pacientes com DM2. Outra explicação para a melhora do controle glicêmico, inicialmente estudada por Rubino ⁽¹²⁾, seria a existência de um fator desconhecido no duodeno que causaria resistência à insulina. A exclusão duodenal do trânsito alimentar após a cirurgia poderia reverter esse efeito.

Outro efeito benéfico da cirurgia ocorre no perfil lipídico. A meta-análise de Buchwald ⁽⁹⁾ revelou que a cirurgia bariátrica promove nítida melhora do perfil lipídico em mais de 70% dos pacientes operados.

Sabemos que os indivíduos obesos e diabéticos apresentam adiposidade visceral, responsável por abundante oferta de ácidos graxos livres na circulação e que no fígado, promove elevação da síntese de triglicérides, detectado no jejum e pós alimentação ⁽¹⁴⁾ contribuindo para o processo aterosclerótico.

O aumento da hipertrigliceridemia pós-prandial em diabéticos poderia ser atribuído à redução da ação da lipase lipoproteica (LPL) e aumento da produção hepática de triglicérides ⁽¹⁵⁾.

Sabe-se que os níveis de adiponectina, adipocitocina com efeitos anti-aterogênicos, anti-inflamatórios e sensibilizadora da insulina, estão diminuídos em indivíduos com obesidade, resistência à insulina e DMT2^(16,17). Qiao e colaboradores⁽¹⁸⁾, em estudos experimentais em ratos, demonstraram que a adiponectina atuaria aumentando a depuração de triglicérides do plasma, através da ação sobre a LPL. Haveria assim, uma associação direta entre a diminuição da ação da LPL, baixos níveis de adiponectina e hipertrigliceridemia pós-prandial.

Em humanos as relações entre os níveis de adiponectina e a hipertrigliceridemia ainda não estão bem estabelecidas.

Embora existam vários estudos demonstrando em longo prazo os benefícios da cirurgia bariátrica sobre o perfil lipídico e no metabolismo da glicose sérica, analisando suas relações com a secreção de GLP-1 e insulina, são poucos os trabalhos que avaliam as alterações precoces dos mecanismos metabólicos e hormonais.

Referências

1. Ferrannini E, Natali A, Bell P, Cavallo-Perin P, Lalic N, Mingrone G. Insulin resistance and hypersecretion in obesity. European Group for the Study of Insulin Resistance. *J Clin Invest.* 1997 Sep 1;100(5):1166-73.
2. Itani SI, Ruderman NB, Schmieder F, Boden G. Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and I κ B- α . *Diabetes.* 2002 Jul;51(7):2005-11
3. Look AHEAD Research Group, Pi-Sunyer X, Blackburn G, Brancati FL et al. Reduction in weight and cardiovascular disease risk factors in individuals with type 2 diabetes: one-year results of the look AHEAD trial. *Diabetes Care.* 2007 Jun;30(6):1374-83
4. Look AHEAD Research Group, Wadden TA, West DS, Delahanty L et al. The Look AHEAD study: a description of the lifestyle intervention and the evidence supporting it. *Obesity (Silver Spring).* 2006 May;14(5):737-52.
5. Pories WJ, MacDonald KG Jr, Morgan EJ et al. Surgical treatment of obesity and its effect on diabetes: 10-y follow-up. *Am J Clin Nutr.* 1992 Feb;55(2 Suppl):582S-585S
6. Sjöström L, Lindroos AK, Peltonen M et al. Lifestyle, diabetes, and cardiovascular risk factors 10 years after bariatric surgery. *N Engl J Med.* 2004 Dec 23;351(26):2683-9
7. Dixon JB, O'Brien PE, Playfair J. Adjustable gastric banding and conventional therapy for type 2 diabetes: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2008 Jan 23;299(3):316-23.
8. Pories WJ, Swanson MS, MacDonald KG et al. Who would have thought it? An operation proves to be the most effective therapy for adult-onset diabetes mellitus. *Ann Surg.* 1995 Sep;222(3):339-50; discussion 350-2.
9. Buchwald H, Avidor Y, Braunwald E et al. Bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. *JAMA.* 2004 Oct 13;292(14):1724-37.

10. Isbell JM, Tamboli RA, Hansen EN et al. The importance of caloric restriction in the early improvements in insulin sensitivity after Roux-en-Y gastric bypass surgery. *Diabetes Care*. 2010 Jul;33(7):1438-42
11. Cummings DE, Overduin J, Foster-Schubert KE. Gastric bypass for obesity: mechanisms of weight loss and diabetes resolution. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 Jun;89(6):2608-15.
12. Rubino F, Forgione A, Cummings DE, Vix M, Gnuli D, Mingrone G, Castagneto M, Marescaux J. The mechanism of diabetes control after gastrointestinal bypass surgery reveals a role of the proximal small intestine in the pathophysiology of type 2 diabetes. *Ann Surg*. 2006 Nov;244(5):741-9.
13. Kolovou GD, Anagnostopoulou KK, Daskalopoulou SS, Mikhailidis DP, Cokkinos DV. Clinical relevance of postprandial lipaemia. *Curr Med Chem*. 2005;12(17):1931-45.
14. Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, Tataranni PA. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 May;86(5):1930-5.
15. Daimon M, Oizumi T, Saitoh T et al. Decreased serum levels of adiponectin are a risk factor for the progression to type 2 diabetes in the Japanese Population: the Funagata study. *Diabetes Care*. 2003 Jul;26(7):2015-2
16. Lam KS, Xu A. Adiponectin: protection of the endothelium. *Curr Diab Rep*. 2005 Aug;5(4):254-9.
17. Qiao L, Zou C, van der Westhuyzen DR, Shao J. Adiponectin reduces plasma triglyceride by increasing VLDL triglyceride catabolism. *Diabetes*. 2008 Jul;57(7):1824-33.

2. OBJETIVOS

Os objetivos dos nossos estudos foram analisar, através da realização da avaliação pré-operatória e do seguimento de 7, 30 e 90 dias após cirurgia:

1. As alterações na produção do GLP-1, insulina, glucagon e suas relações com o controle glicêmico.
2. As inter-relações entre os níveis séricos de adiponectina e triglicérides durante a ingestão alimentar e suas relações com a sensibilidade e secreção de insulina.

3. ARTIGO 1

OBES SURG
DOI 10.1007/s11695-011-0412-3

CLINICAL RESEARCH

Early Improvement in Glycemic Control After Bariatric Surgery and Its Relationships with Insulin, GLP-1, and Glucagon Secretion in Type 2 Diabetic Patients

Luciana Mela Umeda · Eliana A. Silva ·
Glaucia Carneiro · Carlos H. Arasaki ·
Bruno Geloneze · Maria Teresa Zanella

© Springer Science+Business Media, LLC 2011

Abstract

Background The surgical treatment of obesity ameliorates metabolic abnormalities in patients with type 2 diabetes. The objective of this study was to evaluate the early effects of Roux-en-Y gastric bypass (RYGB) on metabolic and hormonal parameters in patients with type 2 diabetes (T2DM).

Methods Ten patients with T2DM (BMI, 39.7 ± 1.9) were evaluated before and 7, 30, and 90 days after RYGB. A meal test was performed, and plasma insulin, glucose, glucagon, and glucagon-like-peptide 1 (GLP-1) levels were measured at fasting and postprandially.

Results Seven days after RYGB, a significant reduction was observed in HOMA-IR index from 7.8 ± 5.5 to 2.6 ± 1.7 ; $p < 0.05$ was associated with a nonsignificant reduction in body weight. The insulin and GLP-1 curves began to show a peak at 30 min after food ingestion, while there was a progressive decrease in glucagon and blood glucose levels throughout the meal test. Thirty and 90 days after RYGB, along with progressive weight loss, blood glucose and hormonal changes remained in the same direction and became more expressive with the post-meal insulin curve

suggesting recovery of the first phase of insulin secretion and with the increase in insulinogenic index, denoting improvement in β -cell function. Furthermore, a positive correlation was found between changes in GLP-1 and insulin levels measured at 30 min after meal ($r=0.6$; $p=0.000$).

Conclusion Our data suggest that the RYGB surgery, beyond weight loss, induces early beneficial hormonal changes which favor glycemic control in type 2 diabetes.

Keywords RY gastric bypass · Type 2 diabetes · GLP-1 · Insulin · Glucagon

Introduction

Obesity is a chronic, progressive, and multifactorial disease that has reached epidemic proportions globally in adults and children. Lifestyle changes that are associated with the pharmacological treatment of obesity may not always be effective in patients with severe obesity. These changes promote weight loss between 5% and 10% of the initial weight, and approximately 100% of the patients regain in 5 years. Surgical treatment is the most effective treatment for weight loss and maintenance, and it reduces obesity-related complications, particularly type 2 diabetes [1].

Surgeries involving intestinal bypass have beneficial effects for diabetics. Approximately 84% of diabetic patients who undergo Roux-en-Y gastric bypass (RYGB) experience complete remission of the disease [2]. Important decreases in glucose levels appear earlier, and these effects seem to be independent of weight loss, which is a secondary effect. Many studies have demonstrated that RYGB surgery promotes changes in intestinal hormones, such as increasing glucagon-like peptide 1 (GLP-1) levels in response to food intake, increasing insulin secretion,

L. M. Umeda (✉) · E. A. Silva · G. Carneiro · M. T. Zanella
Department of Medicine, Division of Endocrinology,
Universidade Federal de São Paulo,
Rua Leandro Dupret 365,
CEP 04025011, Vila Clementino, São Paulo, Brazil
e-mail: lu.umedaterra@terra.com.br

C. H. Arasaki
Department of Surgery, Division of Gastroenterology,
Universidade Federal São Paulo,
Vila Clementino, São Paulo, Brazil

B. Geloneze
Department of Medicine, Division of Endocrinology,
Universidade de Campinas,
Campinas, São Paulo, Brazil

Published online: 11 May 2011

 Springer

reducing glucagon secretion, improving glycemic control, and reducing appetite [3–7].

There are a few prospective studies that have evaluated the early effects of bariatric surgery by analyzing glycemic control a few days after surgery and before a massive weight loss occurs. The objective of this study was to evaluate the early hormonal influence after bariatric surgery on metabolic profile in patients with type 2 diabetes and obesity at levels II and III.

Patients and Methods

The following criteria were required for patients to be recruited in this study from Obesity and Hypertension Outpatient Clinic at the Hospital do Rim e Hipertensão, Universidade Federal de São Paulo: diagnosed with type 2 diabetes, 25 to 65 years of age, obesity at levels II and III, and the use of oral anti-diabetic medication. The diabetes diagnosis was confirmed according to American Diabetes Association criteria. Patients were excluded from the study for the following reasons: using a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor or a GLP-1 agonist therapy; with a severe psychiatric disease; cancer, renal, cardiac or hepatic failures; alcohol or drug abuse or severe pulmonary disease. Patients taking insulin therapy and with uncontrolled blood pressure (systolic BP ≥ 160 mmHg) were also excluded.

The Ethics Committee of the Federal University of Sao Paulo approved this study, and all participants signed an informed consent form.

A multidisciplinary team of nutritionists, psychologists, and endocrinologists evaluated all patients who were selected for the study during six visits before surgery. The nutritional intervention was performed to check and encourage the patients to adhere to the proposed diet at every visit. The psychological evaluation was important to diagnose cases of depression and severe eating disorders, both of which were exclusion criteria for the study. A physical examination was performed at every visit, and waist circumference and BMI determinations were made. The waist circumference was measured at the midpoint between the last rib and the iliac crest.

After withdrawal of anti-diabetic medication for 12 h, patients were made to fast overnight for 12 h, and blood samples were collected for glucose, insulin, and glycated hemoglobin (HbA1c) determinations. A standard liquid meal of 353 kcal (46.8% carbohydrates, 32.2% proteins, and 12.5% lipids) was then given to the patients for blood glucose, insulin, glucagon, and GLP-1 measurements at 0, 30, 60, 90, and 120 min. This procedure was performed before and at 7, 30, and 90 days after the surgery.

Bioelectrical impedance measurements were collected from all patients to evaluate body composition (body water

and lean and fat masses) before and after the surgery (Quantump BIA 101Q Akern RJI Systems, Clinton Township, MI, EUA). The bioelectrical impedance analysis was performed in the morning after fasting overnight and after the first urine.

Surgical Technique

The technique used in this study was RYGB, which combines restrictive and malabsorptive mechanisms. A vertical gastric pouch (20–30 ml) was constructed with surgical staples in the lesser curvature of the stomach. Gastrojejunostomy adjustment was performed using a 32-French tube. Reconstruction was performed by RYGB with an alimentary limb measuring 100 cm and a biliopancreatic limb of 50 cm from the ligament of Treitz.

Metabolic Study

The homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) index was calculated from fasting glucose and insulin levels. The insulinogenic index was calculated as the ratio between the changes in insulin and glucose levels 30 min after the meal test to evaluate the first phase of insulin secretion; according to the formula ($\Delta I_{30}/\Delta G_{30}$).

Analytical Procedure

Plasma insulin levels were determined by an automatic immunoassay system (Auto DELFIA insulin kit, PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Waltham, Massachusetts, USA). Glucose levels were determined by the glucose oxidase method, and HbA1c was determined by high-performance liquid chromatography.

Active GLP-1, which is an indicator of GLP potential action, was measured by enzyme-linked immunosorbent assay immunofluorescence (Linco Research, specific for humans). The assay cross-reactivity with GLP-1 7–36 and GLP-1 7–37 is 100%, but it is not with GLP-1 9–36, glucagon, and GLP-2.

Glucagon concentrations were measured by radioimmunoassay (Linco Research), and the assay cross-reactivity is 100% with glucagon, and its cross-reactivity with oxyntomodulin is less than 0.1%.

Statistical Analyses

All data were analyzed using the software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), version 18.0

OBES SURG

(SPSS Inc, Chicago, IL). The Friedman test and post hoc analysis were used to compare the values of all parameters studied, which were obtained during the meal test before and at 7, 30, and 90 days after surgery. Spearman coefficient was used to determine the correlations between the different variables before and after surgery. Data are expressed as mean±standard deviation, and $p<0.05$ was considered statistically significant.

Results

Clinical and laboratory profiles of the patients before and at 7, 30, and 90 days after RYGB are shown in Table 1. High blood glucose values were observed both at fasting and after a standard meal test (Fig. 1). This was accompanied by a mild increase in postprandial insulin secretion, with values describing a flat curve. No changes in GLP-1 and glucagon levels were observed during the meal test.

No significant reductions in BMI and fat mass were observed 7 days after RYGB; however, a significant decrease in free fat mass was observed, which is presumably linked to fluid loss (Table 1). By this time, reductions in both fasting blood glucose and insulin levels lead to marked reduction in HOMA-IR index. Also, changes occurred in the shape of the blood glucose, insulin, GLP-1, and glucagon curves, delineated by the levels of these variables determined during the meal test (Fig. 1). These

curves began to show peaks in GLP-1 and insulin levels at 30 min after food ingestion and a progressive decrease in glucagon and blood glucose levels throughout the meal test. A positive correlation was observed between changes in the areas under the curves of glucagon and insulin values ($r=0.8$; $p=0.015$). However, the alterations noted in the areas under the curves delineated by the postprandial hormonal and glucose values did not reach statistical significance, and no changes in the insulinogenic index were observed after 7 days of RYGB. Also, no correlations were found between these initial changes and the changes in BMI or fat mass.

Thirty and 90 days after RYGB, blood glucose and hormonal parameters changes continued in the same direction, becoming more expressive and statistically significant. Particularly, an expressive peak of GLP-1 and insulin was observed at 30 min after the meal test. Considering all the observations made during the post-surgical 3-month period, a positive correlation was found between changes in GLP-1 and insulin levels measured at 30 min after meal ingestion ($r=0.6$, $p=0.000$; Fig. 2). As a consequence, the insulinogenic index showed values higher than those observed before surgery, which reflects a recovery in the first phase of insulin, contrasting with a pronounced suppression of the glucagon levels and reductions in blood glucose values observed (Fig. 1). This improvement in glycemic control resulted in progressive reductions in HbA1c while HOMA-IR remained low (Table 1).

Table 1 Subject characteristics before and after RYGB

	Surgery			
	Before	7 days after	30 days after	90 days after
Weight (kg)	103.3±16.4	96.5±16.1	92.0±14.3*	86.0±12.0*
BMI (kg/m ²)	39.7±1.9	37.0±2.1	35.3±1.5*	33.1±1.6*
Waist (cm)	116.1±8.6	113.9±9.7	107.4±9.3*	102.3±8.0*
Fat mass (kg)	42.7±5.1	39.4±4.6	34.3±4.5*	29.0±4.7*
Free fat mass (kg)	60.6±13.0	57±14.5*	57.7±12.39	57.0±11.0*
H2O (kg)	44.5±9.5	42.0±10.4	42.4±9.2	41.8±8.2*
Fasting glucose (mg/dl)	239.5±101.9	158.4±59.4	123.5±33.1*	119.1±45.2*
AUC glucose (mg/dl)	1,106.4±434.1	883.3±404.0	608.6±179.1	511.6±229.9*
Fasting insulin (mcU/ml)	16.5±16.8	6.6±3.4*	8.3±3.0	7.1±2.7
AUC insulin (mcU/ml)	114.5±61.4	86.6±41.2	159.7±76.9	158.0±85.0
Insulin peak (mcU/ml)	17.7±9.9	34.8±17.8	78.8±40.8*	95.4±67.2*
Fasting GLP-1 (pmol/L)	8.8±10.1	6.6±4.0	5.0±4.3*	5.6±2.4
AUC GLP-1 (pmol/L)	37.3±40.5	49.6±21.0	49.4±20.8	62.8±19.9*
GLP-1 peak (pmol/L)	0.6±1.4	12.0±12.0	21.4±15.0*	26.7±14.8*
Fasting glucagon (pg/ml)	78.0±20.5	97.1±39.7	86.8±30.0	86.7±20.4
AUC glucagon (pg/ml)	296.0±75.1	267.6±80.7	247.9±39.4	249.0±64.1
HbA1c%	9.1±2.3	8.1±1.1	7.0±1.0*	6.2±1.3*
HOMA-IR	7.8±5.5	2.6±1.7*	2.6±1.2*	2.1±1.0*
Insulinogenic index	0.5±0.2	0.5±0.3	1.7±1.7*	12.2±23.5*

AUC=area under the curve 0–120 min, insulinogenic index =30 min insulin–fasting insulin/30 min glucose–fasting glucose
* $p<0.05$ ×before surgery