

PERFIL IMUNOLÓGICO DE MULHERES SUBMETIDAS À COLECISTECTOMIA LAPAROSCÓPICA CONVENCIONAL E POR PORTAL ÚNICO

Comparative analysis of immunological profiles in women undergoing conventional and single-port laparoscopic cholecystectomy

Marisa de Carvalho **BORGES**¹, Tharsus Dias **TAKEUTI**¹, Guilherme Azevedo **TERRA**¹,
Betânia Maria **RIBEIRO**¹, Virmondos **RODRIGUES-JÚNIOR**², Eduardo **CREMA**¹

Trabalho realizado no ¹Departamento de Cirurgia e ²Departamento de Imunologia, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, Brasil.

DESCRIPTORIOS - Colelitíase. Colecistectomia laparoscópica. Citocinas.

Correspondência:

Eduardo Crema
E-mail: cremaufm@mednet.com.br

Fonte de financiamento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e Fundação de Ensino e Pesquisa de Uberaba
Conflito de interesses: não há

Recebido para publicação: 07/03/2016
Aceito para publicação: 02/06/2016

HEADINGS - Cholelithiasis. Laparoscopic Cholecystectomy. Cytokines.

RESUMO - Racional: O trauma cirúrgico induz resposta de estresse pós-operatório significativo, evidenciado pelos níveis elevados de citocinas, podendo favorecer o surgimento de distúrbios imunológicos. A magnitude de estresse está relacionada ao grau do trauma cirúrgico. **Objetivos:** Avaliar a expressão das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-17) e da anti-inflamatória (IL-4) no pré e pós-operatório de pacientes submetidas à colecistectomia laparoscópica por dois métodos: convencional e por portal único. **Métodos:** Quarenta mulheres com colelitíase sintomática foram operadas, sendo 21 por procedimento laparoscópico convencional e 19 por portal único. As citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-4, e IL-17 presentes no plasma foram quantificadas pelo método de ELISA em dois momentos: no pré-operatório e após 24 h da operação. **Resultados:** A avaliação da resposta imune não mostrou diferença estatisticamente significativa das citocinas IFN- γ e IL-1 β na comparação entre os grupos e tempos analisados. Em relação às citocinas TNF- α e IL-4 os níveis séricos estavam abaixo dos níveis de detecção (10 pg/ml) em ambos os grupos e tempos analisados. Observou-se que as operadas por portal único apresentaram expressão significativa da IL-17A do período pré para o pós-operatório ($p=0,0094$). **Conclusões:** A expressão aumentada da IL-17A no pós-operatório do grupo de portal único pode indicar que o estresse cirúrgico foi maior em comparação ao da colecistectomia laparoscópica convencional.

ABSTRACT - Background: Surgical trauma triggers an important postoperative stress response characterized by significantly elevated levels of cytokines, an event that can favor the emergence of immune disorders which lead to disturbances in the patient's body defense. The magnitude of postoperative stress is related to the degree of surgical trauma. **Aim:** To evaluate the expression of pro-inflammatory (TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , and IL-17) and anti-inflammatory (IL-4) cytokines in patients submitted to conventional and single-port laparoscopic cholecystectomy before and 24 h after surgery. **Methods:** Forty women with symptomatic cholelithiasis, ranging in age from 18 to 70 years, participated in the study. The patients were divided into two groups: 21 submitted to conventional laparoscopic cholecystectomy and 19 to single-port laparoscopic cholecystectomy. **Results:** Evaluation of the immune response showed no significant difference in IFN- γ and IL-1 β levels between the groups or time points analyzed. With respect to TNF- α and IL-4, serum levels below the detection limit (10 pg/ml) were observed in the two groups and at the time points analyzed. Significantly higher postoperative expression of IL-17A was detected in patients submitted to single-port laparoscopic cholecystectomy when compared to preoperative levels ($p=0.0094$). **Conclusions:** Significant postoperative expression of IL-17 was observed in the group submitted to single-port laparoscopic cholecystectomy when compared to preoperative levels, indicating that surgical stress in this group was higher compared to the conventional laparoscopic cholecystectomy.

INTRODUÇÃO

A colecistolitíase predomina nas mulheres na proporção de 2:1 e numerosas são as condições que contribuem para seu surgimento¹³. A colecistectomia laparoscópica tornou-se a intervenção cirúrgica padrão para doentes com doença biliar benigna. As vantagens quando comparadas à laparotomia são múltiplas e conhecidas^{1,7,25,26}. A utilização de uma única incisão umbilical para remover a vesícula biliar foi interessante inovação e, desde a sua descrição por Navarra et al., a colecistectomia laparoscópica com incisão única ganhou impulso²¹.

O trauma cirúrgico induz resposta de estresse pós-operatório significativo, evidenciado pelos níveis elevados de citocinas, favorecendo surgimento de distúrbios imunológicos que resultam em perturbações no organismo suas defesas¹². A magnitude do estresse pós-operatório está relacionada ao grau de trauma cirúrgico. Resposta

hiperinflamatória não controlada pode levar à imunossupressão sistêmica e contribuir aumento da morbimortalidade⁸.

Como a técnica da colecistectomia é a mesma para ambas as abordagens, laparoscópica convencional e portal único, surge a hipótese de que qualquer diferença na resposta sistêmica pode ser atribuída à diferença no tamanho e quantidade das incisões¹⁵. Foi descrito por McGregor et al. que a redução no tamanho total da incisão produzido pela cirurgia laparoscópica por portal único poderia resultar em estresse sistêmico reduzido²⁰.

Na literatura não foram encontrados trabalhos que avaliassem a expressão de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-17A) e anti-inflamatória (IL-4) antes e após a colecistectomia laparoscópica convencional e por portal único. O presente estudo teve por objetivo avaliar essas diferenças nos grupos submetidas às duas técnicas cirúrgicas.

MÉTODOS

Este estudo foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro – nº do Parecer 2503 e todas as pacientes assinaram consentimento livre e esclarecido. É prospectivo transversal e realizado na Disciplina de Cirurgia do Aparelho Digestivo, Hospital das Clínicas, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, Brasil. Participaram 40 mulheres com colecistolitíase sintomática com idade entre 18 e 70 anos. Elas foram divididas em dois grupos: 21 operadas por colecistectomia laparoscópica convencional e 19 por portal único. Os dados foram registrados em ficha de avaliação que continham informações antropométricas (peso, altura, IMC), de fatores de risco para colecistolitíase e de tempo (min) dos procedimentos cirúrgicos.

Os critérios de inclusão foram: pacientes sintomáticas, idade acima de 18 anos, capacidade de compreender o propósito do estudo, consentimento informado por escrito. Os de exclusão foram: grávidas, com IMC > 35 kg/m², portadoras de doenças sistêmicas, uso de medicamentos que alterassem a resposta imunológica, suspeita ou comprovação de cirrose hepática, coagulopatia (contagem de plaquetas abaixo de 50.000/ul), medicação dupla em antagonistas de plaqueta (ácido acetilsalicílico e clopidogrel), pancreatite aguda, icterícia, estase da bile no interior da vesícula biliar, doenças hemolíticas, infecção biliar, cirrose biliar primária, distúrbios gastrointestinais, ressecção ou desvio ileal e fibrose cística com insuficiência pancreática.

Colecistectomia laparoscópica convencional

As pacientes foram posicionadas em decúbito dorsal horizontal em proclive sob anestesia geral e controlados no peroperatório com cardioscópio, pressão arterial não invasiva, oximetria de pulso e capnografia.

A operação foi realizada com pneumoperitônio feito pela técnica fechada através de agulha de Verres e mantido a 12 mm Hg. Empregou-se a utilização de quatro trocarteres: um de 10 mm para colocação da ótica; um de 5 mm no flanco direito para tração cranial da vesícula; um no hipocôndrio direito de 5 mm e outro no epigástrico do lado esquerdo do ligamento redondo de 10 mm para dissecação e hemostasia.

Após boa exposição do triângulo das vias biliares com a tração lateral e inferior do infundíbulo da vesícula o ducto cístico foi dissecado, clipado e seccionado. Após, a artéria cística foi identificada, dissecada, clipada e seccionada. A vesícula foi removida através de uma bolsa plástica. (Figura 1).

Colecistectomia laparoscópica por portal único

O posicionamento dos pacientes e da equipe cirúrgica, bem como a anestesia e posição do monitor foram semelhantes às empregadas na colecistectomia laparoscópica convencional.

Realizou-se incisão transumbilical horizontal de 2 cm, dissecação e abertura da aponeurose e peritônio, e colocação do portal único (silc port). Foi confeccionado o pneumoperitônio e mantido em 12 mmHg, e colocação de trocarteres através do portal único, sendo dois de 5mm e um de 10 mmHg para introdução da ótica de 30°. Foram utilizados materiais de laparoscopia convencional.

Após boa exposição do triângulo das vias biliares com auxílio de um fio passado no infundíbulo da vesícula, procedeu-se a dissecação, clipagem e secção do ducto cístico e da artéria cística com os mesmos materiais empregados na laparoscopia convencional.



FIGURA 1- Colecistectomia laparoscópica convencional

Para a clipagem utilizou-se a troca do trocar de 5 mm por um de 10 mm introduzido na posição. Em seguida, a vesícula era dissecada do leito hepático do infundíbulo para o fundo da vesícula (Figura 2).



FIGURA 2 - Colecistectomia laparoscópica por portal único

Coleta de sangue para dosagens das citocinas

As amostras foram coletadas de todas as pacientes no pré-operatório e após 24 h dos procedimentos cirúrgicos, em jejum noturno de 12 h. O sangue coletado imediatamente foi centrifugado a 5000 RPM e o sobrenadante aspirado e acondicionado em tubos plásticos de 1,5 ml estéril, sendo estocados à -70°C.

As citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-4, (BD Pharmingen-USA) e IL-17 (R&D-EUA) presentes no plasma foram quantificadas pelo método de ELISA. Placas de 96 poços de alta afinidade (Nunc-Dinamarca) foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais específicos para cada citocina, 100 μ L por poço, na concentração de 1mg/ml em tampão de sensibilização (pH 9,5), incubadas overnight em 4°C. Após, o conteúdo era desprezado e as placas bloqueadas com PBS contendo 2%

de albumina bovina (Sigma-EUA), 200µL por poço, 4 h, à temperatura ambiente. Em seguida, o PBS-BSA era desprezado, e nas fileiras 1 a 10 adicionavam as amostras diluídas 1:2 em PBS-BSA 1%, volume final de 200µl por poço. Nas fileiras 11 e 12 eram realizadas as diluições das citocinas recombinantes, obedecendo diluição seriada de 1:2 em PBS-BSA 1%, volume final de 100µl, com concentração inicial recomendada pelo fabricante de cada citocina recombinante. Os poços H11 e H12 eram utilizados como branco, recebendo apenas 100 µl de PBS-BSA 1%. As placas eram incubadas overnight, a 4°C e a seguir lavadas com solução de PBS contendo 0,05% de Tween (Sigma-EUA) e adicionado anticorpo de revelação específico a cada citocina, conjugado com biotina, todos do mesmo fabricante do respectivo anticorpo de sensibilização, na concentração de 1mg/ml em PBS-BSA 1%, 80µl por poço. Após incubação de 4 h, à 37°C, as placas eram novamente lavadas com PBS-Tween 0,05%, adicionando 100µl de estreptoavidina conjugada com peroxidase por poço e incubadas por 3 h, à 37° C. Por último, as placas eram novamente lavadas em PBS-Tween 0,05% adicionando-se o tampão de revelação OPD (Sigma-EUA), 100µl por poço, sendo colocadas a reagir ao abrigo da luz em temperatura ambiente. Os resultados foram obtidos a partir da medida das absorbâncias, em comprimento de onda de 450 nm, obtidas em leitor automático de ELISA. A concentração das citocinas foi determinada a partir de regressão linear com as absorbâncias obtidas na curva da citocina recombinante e expressas em pg/ml.

Análise estatística

Foi realizada utilizando-se Excel 2007 for Windows, Statview (Abaccus-Eua) e Graphpadprism 5.0 (Graphpad software – EUA). A verificação da distribuição normal das variáveis quantitativas foi feita pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. As variáveis contínuas que apresentaram distribuição normal foram expressas em média± desvio-padrão e aquelas que apresentaram distribuição não normal expressas em mediana e percentis. As variáveis que apresentaram distribuição normal e variância homogênea foram analisadas pelos testes de t de Student para comparação de dois grupos. As que não apresentaram distribuição normal ou não tinham variância homogênea foram analisadas pelos testes de Mann-Whitney para comparação de dois grupos independentes. A análise dos dados correspondentes às medidas repetidas foi avaliada pelo teste de Wilcoxon quando amostras não paramétricas, teste de “t” pareado quando amostras paramétricas e ANOVA para medidas repetidas quando mais que duas amostras paramétricas. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando p<0,05.

RESULTADOS

A Tabela 1 mostra a média±desvio-padrão das variáveis de idade e antropométricas dos grupos estudados. A altura (m) foi estatisticamente significativa na comparação entre os grupos (p=0,0220).

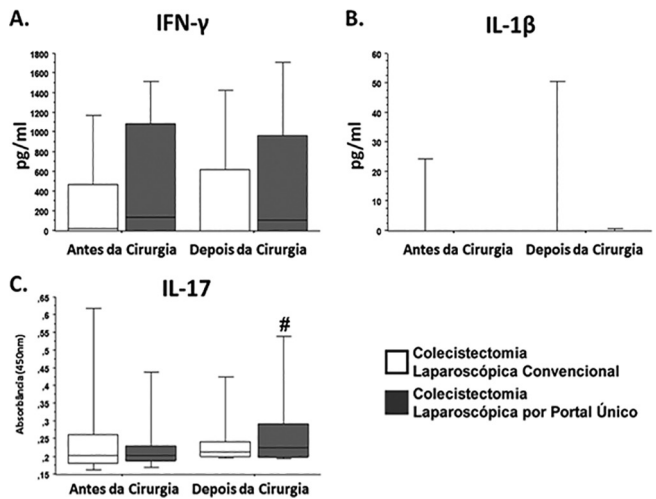
TABELA 1 - Variáveis de idade e antropométricas dos grupos estudados

Variáveis	CLC	CLPU	Valor p
Idade	38,38±11,72	34,21±10,51	NS
Peso (kg)	69,40±16,76	64,81±9,63	NS
Altura (m)	1,57±0,07	1,62±0,04	p=0,0220
IMC (kg/m ²)	27,90±6,52	24,52±3,67	NS

CLC=colecistectomia laparoscópica convencional; CLPU=colecistectomia por portal único; NS=não significante; IMC=índice de massa corpórea. Comparação entre sexo pelo teste exato de Fisher e das variáveis numéricas expressas em média±desvio-padrão pelo teste t de Student.

TABELA 2 - Fatores de risco para colecistolitíase das pacientes submetidas à colecistectomia laparoscópica convencional e por portal único

Fatores de risco para colelitíase	Colecistectomia laparoscópica convencional		Colecistectomia laparoscópica por portal único		p
	n	%	n	%	
Sedentarismo					
Sim	19	90,5%	17	89,5%	0,91
Não	2	9,5%	2	10,5%	
Diabete melito tipo II					
Sim	0	0,0%	1	5,3%	0,28
Não	21	100,0%	18	94,7%	
Dieta rica em gorduras					
Sim	16	76,2%	10	52,6%	0,11
Não	5	23,8%	9	47,4%	
Etilismo - moderado a severo					
Sim	2	9,5%	1	5,3%	0,6
Não	19	90,5%	18	94,7%	
Uso de contraceptivos orais					
Sim	8	38,1%	11	57,9%	0,21
Não	13	61,9%	8	42,1%	
Multigestação (3 ou +)					
Sim	9	42,9%	6	31,6%	0,46
Não	12	57,1%	13	68,4%	
Perda ponderal rápida					
Sim	2	9,5%	2	10,5%	0,91
Não	19	90,5%	17	89,5%	
Obesidade					
Sim	6	28,6%	1	5,3%	0,1
Não	6	28,6%	10	52,6%	
Não (Sobrepeso)	9	42,9%	8	42,1%	
Hiperlipidemia					
Sim	9	42,9%	1	5,3%	0,0061
Não	12	57,1%	18	94,7%	
Hereditariedade					
Sim	8	38,1%	11	57,9%	0,21
Não	13	61,9%	8	42,1%	



Nota: As barras representam a média e as linhas representam o erro padrão da média; *p<0,05 IFN-γ e IL-1β=comparação das duas operações em um mesmo momento pré e pós (teste de t de student); #= p<0,05 comparando a mesma operação no pré e no pós (teste de t de Student pareado); IL-17^a= comparação dos dois tipos em um mesmo momento, pré e pós (Mann-Whitney); # p<0,05 comparando a mesma operação no pré e pós (Wilcoxon)

FIGURA 3 - Resultados da avaliação imunológica na análise das citocinas IFN-γ, IL-1β e IL-17A

A média quanto ao tempo entre o início e o final dos procedimentos cirúrgicos no grupo convencional foi de 62,15±27,75 min e no de portal único de 60,12±18,16 min. A média quanto ao tempo entre a indução/anestesia e o final dos procedimentos cirúrgicos no grupo convencional foi de 83,16±29,20 min e no

grupo por portal único de 80,50±18,37 min.

Quanto aos fatores de risco para colelitíase questionados no protocolo inicial constatou-se que não houve diferença estatística significativa entre os grupos estudados para: sedentarismo, diabetes melito tipo II, dieta rica em gordura, etilismo, uso de contraceptivos orais, multigestações, perda ponderal rápida, obesidade e hereditariedade. No entanto, hiperlipidemia (colesterol, triglicérides ou ambos) no sangue foi significante maior no grupo convencional ($p=0,0061$, Tabela 2).

Avaliação imunológica

O nível sérico do IFN- γ no grupo convencional no período pré-operatório para o pós-operatório apresentou média de 336,13±117,31 pg/ml para 355,93 ±127,70 pg/ml. O nível sérico do IFN- γ no grupo de portal único no período pré-operatório para o pós-operatório apresentou média de 472,11±143,17 pg/ml para 503,42±156,47 pg/ml. Quando comparados os níveis séricos do IFN- γ no grupo convencional vs portal único no pré-operatório os resultados da média foram respectivamente 336,13±117,31 pg/ml vs 472,11±143,17 pg/ml. Quando comparados os níveis séricos do IFN- γ no grupo convencional vs portal único no pós-operatório os resultados da média foram respectivamente 355,93±127,70 pg/ml vs 503,42±156,47 pg/ml (Figura 3).

O nível sérico da IL-1 β no grupo convencional no período pré-operatório para o pós-operatório apresentou média de 12,02±9,42 pg/ml para 16,40±11,53 pg/ml. O nível sérico da IL-1 β no grupo submetido portal único no período pré-operatório para o pós-operatório apresentou média de 8,90±8,90 pg/ml para 9,21±9,13 pg/ml. Quando comparados os níveis séricos da IL-1 β no grupo convencional vs portal único no pré-operatório os resultados da média foram respectivamente 12,02±9,42 pg/ml vs 8,90±8,90 pg/ml. Quando comparados os níveis séricos da IL-1 β no grupo convencional vs portal único no pós-operatório os resultados da média foram respectivamente 16,40±11,53 pg/ml vs 9,21± 9,13 pg/ml (Figura 2).

A IL-17A no grupo convencional no período pré-operatório para o pós-operatório apresentou média de 0,27±0,03 nm para 0,26 ± 0,02 nm. A IL-17A no grupo portal único no período pré-operatório para o pós-operatório, apresentou média de 0,24±0,02 nm para 0,28±0,03nm ($p=0,0094$). A IL-17A no grupo convencional vs portal único no pré-operatório os resultados da média foram respectivamente 0,27±0,03 nm vs 0,24±0,02 nm. A IL-17A no grupo convencional vs portal único no pós-operatório os resultados da média foram respectivamente 0,26±0,02 nm vs 0,28±0,03 nm (Figura 2)

Em relação às citocinas TNF- α e IL-4 os níveis séricos estavam abaixo dos níveis de detecção (10 pg/ml) em ambos os grupos e tempos analisados.

DISCUSSÃO

A colelitíase é a mais comum das doenças do trato digestivo e vários estudos¹⁷ relataram que as mulheres são três vezes mais passíveis de desenvolver cálculos biliares do que os homens, e essa diferença entre os gêneros inicia-se na puberdade e persiste durante toda a idade fértil.

A idade e variáveis antropométricas, como o peso e o IMC, estão intimamente relacionados com a presença de cálculos biliares. Neste trabalho foi realizada comparação da idade e variáveis antropométricas dos grupos submetidos à colecistectomia laparoscópica convencional e por portal único. A idade e as variáveis peso e IMC não mostraram diferenças estatisticamente significativas na comparação entre os grupos, embora todos os resultados revelassem valores maiores no grupo convencional. Nesse grupo também os valores do IMC confirmaram sobrepeso das pacientes. A altura foi significativa na comparação entre os grupos.

O perfil lipídico exerce importante influência sobre o risco

de desenvolvimento de cálculos biliares. Baixos níveis de HDL e elevados níveis séricos de triglicerídeos estão relacionados ao aumento do risco da formação de cálculos¹¹. Pesquisa transversal realizada por Atamanalp et al., com 75 pacientes portadores de cálculos vesiculares detectaram concentrações séricas de colesterol total e LDL estatisticamente superior entre os pacientes quando comparados ao grupo controle². Em contrapartida, em estudo de coorte realizado com 2089 pacientes, foi observada forte associação inversa entre colelitíase e a concentração plasmática de colesterol²³. No presente estudo, os níveis séricos de LDL, colesterol total e triglicerídeos foram observados em 42,9% das submetidas à técnica convencional e em 5,3% ao portal único.

Quanto a média de tempo dos procedimentos cirúrgicos os achados na literatura mostram ser ele maior na realização do portal único. Sharma et al., compararam a média de tempo e seus achados para a colecistectomia por múltiplos portais foi de 26 min (15-40 min) e para portal único 61 min (40-120 min)²⁸. Outros autores referiram 60 min (33-190 min) na convencional e 73 min (entre 35-136 min) no portal único, resultado este significativamente maior³³ sendo que esta tendência foi também publicada por outros autores²⁹ como o inverso³². Neste estudo não foi observada diferença estatisticamente significativa quando comparados os tempos médios entre início e fim dos procedimentos. No entanto, pôde-se observar tempo cirúrgico inferior no portal único.

Segundo Giraldo et al.²⁶, o sexo feminino possui maior resposta imunológica tanto celular quanto humoral, maior resistência às infecções e maior propensão a doenças autoimunes, por provável ação dos hormônios sexuais femininos. Trastulli et al., relataram que respostas hiperinflamatórias descontroladas causadas por trauma cirúrgico podem levar à imunossupressão sistêmica, contribuindo para maior morbimortalidade. Níveis elevados circulantes das citocinas parecem estar implicados no aparecimento de complicações e retardo da recuperação pós-operatória, sendo que a atenuação desse quadro estaria associada à diminuição da frequência de fatores complicadores³¹.

Técnicas de procedimentos cirúrgicos minimamente invasivos resultam na redução no tamanho da ferida operatória, menor lesão de parede abdominal, músculos e aponeuroses e, portanto, menor dano tecidual. Na videocirurgia há menor manipulação e tração por afastadores de órgãos abdominais, não há o uso de compressas sobre vísceras e necessidade de afastamento da parede abdominal. Esses fatores podem estar relacionados com a redução na magnitude e duração dos níveis séricos de citocinas observadas após as operações laparoscópicas, em particular a colecistectomia¹⁴.

O TNF- α e a IL-1 são os maiores mediadores da resposta de fase aguda em humanos e são responsáveis pela atividade das manifestações extra-hepáticas, elevação das prostaglandinas, taquicardia e catabolismo acelerado³⁰. Os níveis séricos dos receptores de IL-1 estão significativamente mais baixos após a videolaparoscopia, indicando menor grau de resposta inflamatória ao trauma⁹. Após procedimentos cirúrgicos, trauma ou durante as infecções, o TNF- α atua como mediador mais precoce e potente da resposta inflamatória. Embora sua meia-vida plasmática seja de apenas 20 min, sua expressão pode provocar mudanças metabólicas e hemodinâmicas importantes e ativar distalmente outras citocinas. O TNF- α é potente indutor de metabolismo muscular e caquexia, por estimular a lipólise e inibir a lipoproteína lipase. Outras ações do TNF- α consistem em ativar a coagulação, estimular a expressão ou liberação de moléculas de adesão, PGE2, fator ativador de plaquetas, glicocorticóides e eicosanóides, e influenciar a apoptose celular²⁴.

O IFN- γ é produzido por três tipos de células: CD4⁺ Th1, CD8⁺ Th1 e NK. O IFN- γ , juntamente com duas citocinas, IL-12 e IL-18, desempenha papel fundamental na execução de diferenciação entre células TCD4⁺ para o fenótipo Th1. O IFN- γ também inibe a diferenciação de linfócitos em células com o fenótipo Th2. Como estas secretam citocinas contraregulatórias

- IL-4 e IL-10 - o efeito do IFN- γ diminui a produção das citocinas pelas células Th2 estimulando ainda mais o desenvolvimento de resposta inflamatória contra patógeno invasor. O IFN- γ também induz a expressão ou ativação de um número de proteínas-chave envolvidas na resposta imunológica inata contra micróbios³.

A IL-17 é produzida preferencialmente por linfócitos T ativados e estimula fibroblastos, células endoteliais, macrófagos e células epiteliais a produzirem múltiplos mediadores pró-inflamatórios, como IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , ativação da NOS2, metaloproteinases e quimiocinas, resultando na indução de inflamação e aumentando a expressão da molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1)²⁷. A IL-17A tem papel na proteção de organismos contra bactérias extracelulares e fungos devido à capacidade de recrutar neutrófilos para as áreas de infecção, evidenciando papel patológico em vários modelos de doenças autoimunes, como a encefalite autoimune experimental e a artrite reumatóide²².

Comparando as respostas imunológicas dos pacientes submetidos à colecistectomia laparoscópica vs laparotômica, autores observaram que as respostas imunitárias humorais da IL-4 sintetizadas por células Th2 permanecem inalteradas por via laparoscópica e aberta, sugerindo que as funções celulares de Th2 e as respostas imunitárias humorais são alteradas apenas por trauma cirúrgico importante^{6,19}. Contrariando esses achados, Decker et al., 1996, notaram aumento da secreção de IL-4 pelas células T após colecistectomia laparotômica¹⁰.

No presente estudo, as citocinas IFN- γ e IL-1 β não apresentaram diferença estatisticamente significativa na comparação entre os grupos e tempos analisados. Na comparação entre as duas técnicas estes resultados mostraram que os níveis séricos do IFN- γ no pré e no pós-operatório foram maiores no grupo por portal único mostrando aumento da resposta inflamatória nesse grupo. No entanto, observou-se redução dos níveis séricos do IFN- γ no pós-operatório desse procedimento, demonstrando que o trauma cirúrgico não desencadeou aumento dos níveis dessa citocina.

A obesidade é caracterizada pela ativação de processos inflamatórios em locais metabolicamente ativos, como fígado, tecido adiposo e células imunes¹⁸. A consequência dessa resposta é o aumento nos níveis circulantes de citocinas pró-inflamatórias, adipocinas e outros marcadores inflamatórios. No presente estudo um paciente (5,3%) com obesidade grau I e oito (42,1%) com sobrepeso eram do grupo portal único. Esses resultados podem ter contribuído para maior expressão do IFN- γ no pós-operatório do grupo submetido a esse procedimento. Também se observou que as pacientes com portal único apresentaram expressão significativa da IL-17A do período pré-operatório para o pós-operatório. Esses resultados mostraram que apesar do trauma nesse procedimento cirúrgico ser menor, a expressão aumentada da IL-17A no pós-operatório pode indicar que o estresse cirúrgico neste procedimento foi maior que na convencional.

Em relação às citocinas TNF- α e IL-4 os níveis séricos estavam abaixo dos níveis de detecção (10 pg/ml) em ambos os grupos e tempos analisados.

Cada paciente pode modificar a resposta inflamatória para o mesmo tipo de trauma. Doenças de características imunológicas como artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico, doença de Crohn, diabetes melito e asma brônquica podem alterar os níveis séricos de IL-6. O uso de medicamentos de características imunossupressoras ou anti-inflamatórias, como corticosteroides, geralmente utilizados no tratamento de doenças inflamatórias crônicas ou imunológicas, modificam a resposta imunológica celular e humoral, o que compromete a análise sérica de marcadores inflamatórios nesses pacientes⁵. No presente estudo apenas um (5,3%) paciente do grupo portal único era diabética e não foram incluídas na pesquisa pacientes que faziam uso de medicamentos que pudessem alterar a resposta imunológica.

Brune et al., tinham como objetivo avaliar a imunossupressão após a operação laparoscópica vs laparotômica. Os resultados mostraram diminuição significativa de IFN- γ (48,3%), TNF- α (36,6%) e IL-2 (36,8%) respectivamente no pós-operatório da laparotomia, mas não depois da operação laparoscópica. Esses resultados indicaram supressão grave de citocinas pró-inflamatórias do tipo Th1 após laparotomia. Em contraste, a IL-4 e a IL-10 não mostraram mudanças significativas em qualquer dos grupos, sugerindo que a resposta de células Th2 e a atividade anti-inflamatória dessas citocinas permaneceu normal⁶.

Berguer et al., avaliaram a produção de algumas citocinas intracelulares pelas células T após colecistectomia laparoscópica. Os autores concluíram que a operação laparoscópica provocou trauma ligeiro, mas não ativou a produção do IFN- γ intracelular pelas células T e a resposta de citocinas IL-4 e IL-10 no pós-operatório⁴. Han et al., relataram que a resposta ao estresse é igual na colecistectomia laparoscópica convencional e por portal único¹⁶. Mc Gregor et al., comparando a colecistectomia laparoscópica com multiportais vs portal único tinham como objetivo investigar se a redução do tamanho das incisões induziria diminuição da resposta ao estresse cirúrgico. Concluíram que não existe diferença no estresse sistêmico pós-operatório ao avaliarem os níveis séricos de IL-6, mediador importante para o reparo tecidual e da proteína C reativa (PCR) entre as duas técnicas cirúrgicas avaliadas; no entanto, observaram que o grupo de portal único apresentou recuperação melhor com menor número de intercorrências médicas e complicações da ferida cirúrgica²⁰.

No presente estudo, as citocinas IFN- γ e IL-1 β não apresentaram significância estatística na comparação entre os grupos e tempos analisados. Na comparação entre as duas técnicas cirúrgicas os resultados mostraram que os níveis séricos do IFN- γ no pré e no pós-operatório foram maiores no grupo portal único mostrando aumento da resposta inflamatória nesse grupo. No entanto observou-se redução dos níveis séricos do IFN- γ no pós-operatório das pacientes submetidas a esse procedimento, demonstrando que o trauma cirúrgico não desencadeou aumento dos níveis dessa citocina.

Quanto a IL-1 β , a comparação entre as duas técnicas mostrou que os níveis séricos da IL-1 β no pré e no pós-operatório foram maiores no grupo convencional mostrando níveis séricos da IL-1 β aumentados no pós-operatório em comparação ao pré-operatório. Apesar desses resultados não serem significativos estatisticamente, sugerem aumento das atividades quimiotáticas e fagocitárias, aumento da expressão de moléculas de adesão pelas células endoteliais e consequente aumento da atividade e coagulação.

CONCLUSÃO

A IL-17 apresentou expressão significativa no pós-operatório em relação ao pré-operatório no grupo submetido à colecistectomia laparoscópica por portal único, indicando que o estresse cirúrgico nesse grupo foi maior em comparação com a colecistectomia laparoscópica convencional.

REFERÊNCIAS

1. Abaid RA, Ceconello I, Zilberstein B. Simplified laparoscopic cholecystectomy with two incisions. *Arq Bras Cir Dig*. 2014 Apr-Jun;27(2):154-6.
2. Atamanalp SS, Keles MS, Atamanalp RS, Acemoglu H, Laloglu E. The effects of serum cholesterol, LDL, and HDL levels on gallstone cholesterol concentration. *Pak J Med Sci*. 2013 Jan;29(1):187-90. doi: 10.12669/pjms.291.2798.
3. Aune TM, Collins PL, Collier SP, Henderson MA, Chang S. Epigenetic Activation and Silencing of the Gene that Encodes IFN- γ . *Front Immunol*. 2013 May 16;4:112. doi: 10.3389/fimmu.2013.00112. eCollection 2013.

4. Berger MY, van der Velden JJ, Lijmer JG, de Kort H, Prins A, Bohnen AM. Abdominal symptoms: do they predict gallstones? A systematic review. *Scand J Gastroenterol*. 2000 Jan;35(1):70-6.
5. Boo YJ, Kim WB, Kim J, Song TJ, Choi SY, Kim YC, Suh SO. Systemic immune response after open versus laparoscopic cholecystectomy in acute cholecystitis: a prospective randomized study *Scand J Clin Lab Invest*. 2007;67(2):207-14.
6. Brune IB, Wilke W, Hensler T, Holzmann B, Siewert JR. Downregulation of T helper type 1 immune response and altered pro-inflammatory and anti-inflammatory T cell cytokine balance following conventional but not laparoscopic surgery. *Am J Surg*. 1999 Jan;177(1):55-60.
7. Castro PM1, Akerman D1, Munhoz CB1, Sacramento Id1, Mazzurana M1, Alvarez GA1. Laparoscopic cholecystectomy versus minilaparotomy in cholelithiasis: systematic review and meta-analysis. *Arq Bras Cir Dig*. 2014 Apr-Jun;27(2):148-53.
8. Chalhoub V, Pottecher J, Asehnoune K, Mazoit JX, Duranteau J, Benhamou D. Cytokine response and reactive oxygen species production after low- and intermediate-risk surgery. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2011 May;55(5):549-57. doi: 10.1111/j.1399-6576.2011.02419.x.
9. Decker D, Lindemann C, Low A, Bidlingmaier F, Hirner A, von Ruecker A. Changes in the cytokine concentration (IL-6, IL-8, IL-1ra) and their cellular expression of membrane molecules (CD25, CD30, HLA-DR) after surgical trauma. *Zentralbl Chir*. 1997;122(3):157-63; discussion 163-4.
10. Decker D, Schondorf M, Bidlingmaier F, Hirner A, von Ruecker AA. Surgical stress induces a shift in the type-1/type-2 T-helper cell balance, suggesting down-regulation of cell-mediated and up-regulation of antibody-mediated immunity commensurate to the trauma. *Surgery*. 1996 Mar;119(3):316-25.
11. Di Ciaula A, Wang DQ, Garruti G, Wang HH, Grattagliano I, de Bari O, Portincasa P. Therapeutic reflections in cholesterol homeostasis and gallstone disease: a review. *Curr Med Chem*. 2014;21(12):1435-47.
12. Finnerty CC, Mabvuure NT, Ali A, Kozar RA, Herndon DN. The surgically induced stress response. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2013 Sep;37(5 Suppl):21S-9S. doi: 10.1177/0148607113496117.
13. Galyani Moghaddam T, Fakheri H, Abdi R, KhoshBavar Rostami F, Bari Z. The incidence and outcome of pregnancy-related biliary sludge/stones and potential risk factors. *Arch Iran Med*. 2013 Jan;16(1):12-6. doi: 013161/AIM.005.
14. Giraldo E, Hinchado MD, Garcia JJ, Ortega E. Influence of gender and oral contraceptives intake on innate and inflammatory response. Role of neuroendocrine factors. *Mol Cell Biochem*. 2008 Jun;313(1-2):147-53. doi: 10.1007/s11010-008-9752-2.
15. Glaser F, Sannwald GA, Buhr HJ, Kuntz C, Mayer H, Klee F, Herfarth C. General stress response to conventional and laparoscopic cholecystectomy. *Ann Surg*. 1995 Apr;221(4):372-80.
16. Han HJ, Choi SB, Kim WB, Lee JS, Boo YJ, Song TJ, Suh SO, Choi SY. Surgical stress response and clinical outcomes of single port laparoscopic cholecystectomy: prospective nonrandomized study. *Am Surg*. 2012 Apr;78(4):485-91.
17. Jørgensen LN, Rosenberg J, Al-Tayar H, Assaadzadeh S, Helgstrand F, Bisgaard T. Randomized clinical trial of single- versus multi-incision laparoscopic cholecystectomy. *Br J Surg*. 2014 Mar;101(4):347-55. doi: 10.1002/bjs.9393.
18. Karalis KP, Giannogonas P, Kodela E, Koutmani Y, Zoumakis M, Teli T. Mechanisms of obesity and related pathology: linking immune responses to metabolic stress. *FEBS J*. 2009 Oct;276(20):5747-54. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07304.x.
19. Keus F, Gooszen HG, Van Laarhoven CJ. Systematic review: open, small-incision or laparoscopic cholecystectomy for symptomatic cholelithiasis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2009 Feb 15;29(4):359-78. doi: 10.1111/j.1365-2036.2008.03894.x.
20. McGregor CG, Sodergren MH, Aslanyan A, Wright VJ, Purkayastha S, Darzi A, Paraskeva P. Evaluating systemic stress response in single port vs. multi-port laparoscopic cholecystectomy. *J Gastrointest Surg*. 2011 Apr;15(4):614-22. doi: 10.1007/s11605-011-1432-y.
21. Navarra G, La Malfa G, Bartolotta G, Currò G. The invisible cholecystectomy: a different way. *Surg Endosc*. 2008 Sep;22(9):2103. doi: 10.1007/s00464-008-9960-6.
22. Normanton M, Marti LC. Current data on IL-17 and Th17 cells and implications for graft versus host disease. *Einstein (Sao Paulo)*. 2013 Apr-Jun;11(2):237-46.
23. Pagliarulo M, Fornari F, Fraquelli M, Zoli M, Giangregorio F, Grigolon A, Peracchi M, Conte D. Gallstone disease and related risk factors in a large cohort of diabetic patients. *Dig Liver Dis*. 2004 Feb;36(2):130-4.
24. Raeburn CD, Sheppard F, Barsness KA, Arya J, Harken AH. Cytokines for surgeons. *Am J Surg*. 2002 Mar;183(3):268-73. Review.
25. Sales LA, Pinto JO, Queiroz CE, Castro M, Dourado PH, Pinheiro FA. Suprapubic laparoscopic cholecystectomy: technique and preliminary results. *Arq Bras Cir Dig*. 2014 Jan-Mar;27(1):22-5.
26. Sallum RA, Padrão EM, Szachnowicz S, Seguro FC, Bianchi ET, Cecconello I. Prevalence of gallstones in 1,229 patients submitted to surgical laparoscopic treatment of GERD and esophageal achalasia: associated cholecystectomy was a safe procedure. *Arq Bras Cir Dig*. 2015 Apr-Jun;28(2):113-6. doi: 10.1590/S0102-67202015000200007.
27. Sasaki A, Ogawa M, Tono C, Obara S, Hosoi N, Wakabayashi G. Single-port versus multiport laparoscopic cholecystectomy: a prospective randomized clinical trial. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech*. 2012 Oct;22(5):396-9. doi: 10.1097/SLE.0b013e3182631a9a.
28. Sharma A, Soni V, Bajjal M, Khullar R, Najma K, Chowbey PK. Single port versus multiple port laparoscopic cholecystectomy - a comparative study. *Indian J Surg*. 2013 Apr;75(2):115-22. doi: 10.1007/s12262-012-0680-8.
29. Shussman N, Kedar A, Elazary R, Abu Gazala M, Rivkind AI, Mintz Y. Reusable single-port access device shortens operative time and reduces operative costs. *Surg Endosc*. 2014 Jun;28(6):1902-7. doi: 10.1007/s00464-013-3411-8.
30. Silveira FP, Nicoluzzi JE, Saucedo Júnior NS, Silveira F, Nicolletti GM, Maranhão BS. Evaluation of serum levels of interleukin-6 and interleukin-10 in patients undergoing laparoscopic versus conventional cholecystectomy. *Rev Col Bras Cir*. 2012;39(1):33-40.
31. Trastulli S, Cirocchi R, Desiderio J, Guarino S, Santoro A, Parisi A, Noya G, Boselli C. Systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials comparing single-incision versus conventional laparoscopic cholecystectomy. *Br J Surg*. 2013 Jan;100(2):191-208. doi: 10.1002/bjs.8937.
32. Uras C, Boler DE. Endoloop retraction technique in single-port laparoscopic cholecystectomy: experience in 27 patients. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A*. 2013 Jun;23(6):545-8. doi: 10.1089/lap.2012.0357.
33. Wagner MJ, Kern H, Hapfelmeier A, Mehler J, Schoenberg MH. Single-port cholecystectomy versus multi-port cholecystectomy: a prospective cohort study with 222 patients. *World J Surg*. 2013 May;37(5):991-8. doi: 10.1007/s00268-013-1946-4.