

AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA DE PACIENTES COM DIABETE MELITO TIPO 2 SUBMETIDOS À CIRURGIA METABÓLICA

Immunological evaluation of patients with type 2 diabetes mellitus submitted to metabolic surgery

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

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

DESCRITORES: Citocinas. Diabete melito. Cirurgia.

Correspondência:

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

Fonte de financiamento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)

Conflito de interesses: não há

Recebido para publicação: 29/05/2015

Aceito para publicação: 31/08/2015

HEADINGS - Cytokines. Diabetes mellitus. Surgery.

RESUMO - Racional: Mecanismos imunológicos e inflamatórios desempenham papel-chave no desenvolvimento e progressão do diabete melito tipo 2. **Objetivo:** Levantar a hipótese de que alterações nos parâmetros imunológicos ocorrem após operação duodenojejunal combinada com interposição ileal sem gastrectomia, e influenciam o metabolismo da insulina das células beta. **Métodos:** Dezesete pacientes com diabete melito tipo 2 sob manejo clínico foram submetidos à cirurgia e amostras de sangue foram coletadas antes e seis meses após para avaliação do perfil de sorológico de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , TNF- α , IL-17A) e anti-inflamatórias (IL-4, IL-10). Além disso, parâmetros antropométricos, glicemia e uso de insulina foram avaliados em cada paciente. **Resultados:** Não ocorreram alterações no padrão de expressão de citocinas pró-inflamatórias observadas antes e depois da operação. Em contraste, houve diminuição significativa na expressão de IL-10, que coincide com redução da dose diária de insulina, com o controle glicêmico e redução do IMC dos pacientes. Apresentação precoce de alimentos para o íleo pode ter induzido a produção das incretinas tais como GLP-1 e PYY, que, juntamente com o controle da glicemia, contribuíram para a perda de peso, remissão do diabete e o bom prognóstico consequente cirúrgico. Além disso, o controle de síndrome metabólica foi responsável pela redução da expressão de IL-10 nestes doentes. **Conclusão:** Baixo grau de inflamação estava presente nesses pacientes no pós-operatório, certamente pelo adequado controle glicêmico e ausência de obesidade, o que contribuiu para bom resultado cirúrgico.

ABSTRACT - Background: Immunological and inflammatory mechanisms play a key role in the development and progression of type 2 diabetes mellitus. **Aim:** To raise the hypothesis that alterations in immunological parameters occur after duodenojejunal bypass surgery combined with ileal interposition without gastrectomy, and influences the insulin metabolism of betacells. **Methods:** Seventeen patients with type 2 diabetes mellitus under clinical management were submitted to surgery and blood samples were collected before and six months after surgery for evaluation of the serum profile of proinflammatory (IFN- γ , TNF- α , IL-17A) and anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-10). In addition, anthropometric measures, glucose levels and insulin use were evaluated in each patient. **Results:** No changes in the expression pattern of proinflammatory cytokines were observed before and after surgery. In contrast, there was a significant decrease in IL-10 expression, which coincided with a reduction in the daily insulin dose, glycemic index, and BMI of the patients. Early presentation of food to the ileum may have induced the production of incretins such as GLP-1 and PYY which, together with glycemic control, contributed to weight loss, diabetes remission and the consequent good surgical prognosis of these patients. In addition, the control of metabolic syndrome was responsible for the reduction of IL-10 expression in these patients. **Conclusion:** These findings suggest the presence of low-grade inflammation in these patients during the postoperative period, certainly as a result of adequate glycemic control and absence of obesity, contributing to a good outcome of surgery.

INTRODUÇÃO

Diabete melito é doença crônica caracterizada por deficiência relativa ou absoluta de insulina, com consequente intolerância à glicose. Atualmente, a Organização Mundial da Saúde estima que cerca de 240 milhões de pessoas sejam diabéticas em todo o mundo e esse número poderá aumentar até 2025 em mais de 50%, com 380 milhões sofrendo dela¹³.

Mecanismos imunológicos e inflamatórios desempenham papel significativo no desenvolvimento e na progressão do diabete melito tipo 2¹⁶. Em seu trabalho Herder et al. 2009, observaram que concentrações elevadas de TGF β -1 indicam risco elevado para a progressão do diabete tipo 2 e relataram que a inflamação subclínica leva à resistência à insulina e a disfunção das células beta pancreáticas¹¹. Segundo Kopp et al. 2003, elevados níveis de proteína C reativa e IL-6, indicam inflamação subclínica crônica e estão associados com a síndrome de resistência à insulina e doenças cardiovasculares¹². Sendo assim, a relação entre resistência insulínica e processo inflamatório é bidirecional, ou seja, qualquer processo inflamatório crônico induz resistência insulínica, e esta, por sua vez, acentua o processo inflamatório⁶.

O tratamento da resistência insulínica inclui uma ampla variedade de opções,

como o tratamento clínico multidisciplinar com o objetivo de perda ponderal, opções farmacológicas e técnicas operatórias bariátricas e metabólicas^{15,17-18}. Na transposição ileal, ocorre a interposição de um segmento do íleo distal para porção mais proximal do tubo digestório, podendo produzir saciedade precoce e trazer benefícios no metabolismo glicídico e na perda ponderal, provavelmente atribuída à interferência de hormônios anorexígenos como o GLP-1 e o PYY, demonstrando ainda efeito incretínico, com maior sensibilidade à insulina a curto e médio prazo⁸.

O emprego do tratamento cirúrgico com a exclusão duodeno-jejunal associada ou não à interposição de segmento ileal tem demonstrado controle clínico dos pacientes com diabetes tipo 2 sem a necessidade do uso de insulina ou hipoglicemiantes orais^{7,3}.

Na literatura não foram encontrados trabalhos que avaliassem a expressão de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , TNF- α , IL-17A) e anti-inflamatórias (IL-4, IL-10) no soro de pacientes com diabetes melito tipo 2 submetidos à cirurgia de exclusão duodenojejunal associada à interposição ileal sem ressecção gástrica.

O presente estudo levanta a hipótese que após a interposição de segmento ileal, possa ocorrer alterações nos parâmetros imunológicos expressos pela produção de citocinas no soro, capazes de influenciar o metabolismo insulínico das células β .

MÉTODOS

Foi realizado estudo prospectivo transversal pela Disciplina de Cirurgia do Aparelho Digestivo e pela Disciplina de Imunologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, Brasil. Ele foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da mesma universidade (Protocolo nº1686). Além disso, cada paciente recebeu, por escrito, um termo de consentimento livre após e esclarecimento. Os pacientes foram selecionados de janeiro de 2009 a janeiro de 2010.

O experimento foi realizado em 17 pessoas adultas, de 21 a 60 anos, portadores de diabetes melito tipo 2 e índice de massa corporal (IMC) de 22 a 34 kg/m² sendo essa amostra intencional, sem perdas ou exclusões. Foram excluídos do projeto indivíduos portadores de cardiopatias graves, de risco cirúrgico elevado (ASA IV), diabéticos há menos de três anos e pacientes que faziam uso de insulina há pelo menos dois anos.

Todos os voluntários foram submetidos à cirurgia de exclusão duodenojejunal com interposição do segmento ileal e sem ressecção gástrica; constitui na interposição de um segmento ileal de aproximadamente 100 cm, o qual é transposto e anastomosado no duodeno a 2 cm do piloro e no jejuno à 70 cm do ângulo duodenojejunal, excluindo dessa forma 100 cm do segmento duodenojejunal (Figura 1).

As amostras de sangue foram coletadas de todos os pacientes, no pré-operatório (24 h antes do procedimento cirúrgico) e após seis meses com jejum noturno de 12 h. O sangue imediatamente coletado foi centrifugado a 5000 rpg e o sobrenadante aspirado e acondicionados em tubos plásticos de 1,5 ml estéril, sendo estocados à -70°C. Foi feita dosagem de glicose dos pacientes com kits comerciais disponíveis pelo método enzimático-colorimétrico.

As citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-17A, IL-4 e IL-10 presentes no soro foram dosadas pelo método Enzyme Linked Sorbent Assay (ELISA), utilizando pares de anticorpos monoclonais comerciais disponíveis.

Foram utilizadas placas de 96 poços de alta afinidade (Nunc-Dinamarca) recobertas com os anticorpos monoclonais específicos para a captura da citocina a ser dosada. Às fileiras um e dois de cada placa foram adicionados 100 μ l de citocina padrão recombinante, seguindo diluições seriadas 1:2 em solução salina tamponada com fosfato (PBS), contendo 2% de soro albumina humana (BSA), a partir das concentrações iniciais diluídas.

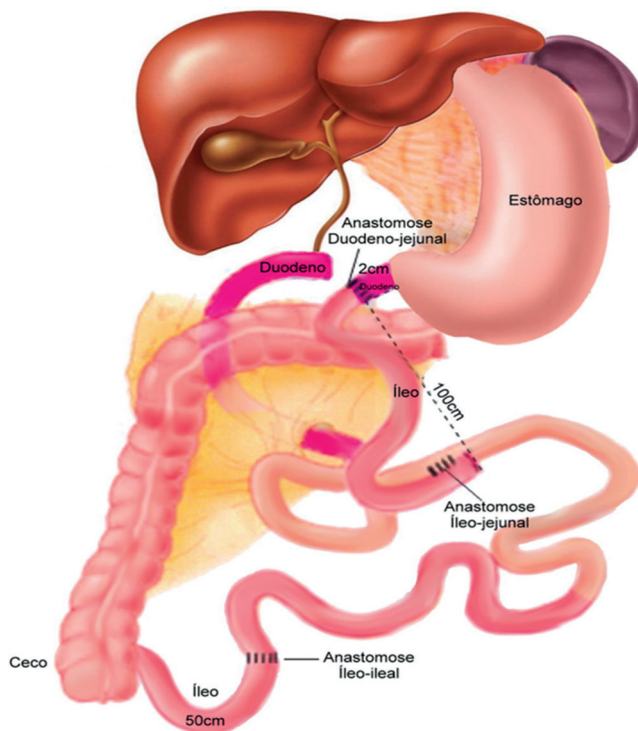


FIGURA 1 - Esquema da operação: exclusão duodenojejunal com interposição ileal sem gastrectomia

Os poços correspondentes ao branco da reação não receberam citocinas ou soro. Às outras fileiras, foram adicionados 100 μ l/poço do soro contendo a citocina a ser dosada. As placas foram incubadas a 4° C por 18 h e lavadas seis vezes com solução contendo PBS-TWEEN 20 (PBS-T). A seguir, foram adicionados 100 μ l/poço do anticorpo anti-citocina a ser dosada, marcada com biotina diluído 1:1.000 em PBS-BSA 1%. As placas foram incubadas por 2 h a 37° C e, novamente, lavadas seis vezes em PBS-T.

Após esta etapa, foram adicionados 100 μ l/poço de estreptoavidina marcada com fosfatase alcalina, diluída 1:1.000 em PBS-BSA 1%. As placas foram incubadas por 1 h e lavadas seis vezes com PBS-T, quando, então, foram adicionados 100 μ l/poço de substrato dinitrofenil fosfato (DNP). Os resultados foram determinados pela diferença das absorvâncias obtidas: 405 e 490 nm (Abs 405 - Abs 409), medidas em leitor automático de ELISA (Biorad 2550 Reader EIA). A concentração das citocinas no soro foram determinadas a partir de regressão linear com as absorvâncias obtidas na curva da molécula recombinante e expressas em pg/ml.

Na análise estatística os dados foram testados quanto à normalidade utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov. Para comparação de dados utilizou-se o teste t-Student para dados paramétricos, e o teste de Wilcoxon para os dados não paramétricos. Para analisar a correlação entre dados foram utilizados os coeficientes de Pearson e o de Spearman. Foram consideradas estatisticamente significantes as diferenças com $p < 0,05$. Foram utilizados os softwares Microsoft Excel 2010, GraphPad Prism 5.0 e SPSS 16.0.

RESULTADOS

Participaram deste estudo 17 pacientes com diagnóstico de diabetes melito tipo 2, que faziam uso de insulina a pelo menos dois anos e eram acompanhados no serviço ambulatorial do Hospital de Clínicas da UFTM. A idade mínima foi de 34 e máxima de 68 anos com média de 55,4 ($\pm 8,66$) anos. Destes, 10 (58,8%) eram do sexo feminino e sete (41,2%) do masculino.

Quanto à massa corporal avaliou-se o IMC, sendo que: dois (11,8%) dos pacientes apresentavam peso normal (com

IMC entre 18-24,99); 10 (59%) estado de sobrepeso (IMC entre 25-29,99); e cinco (19,2%) obesidade grau I (IMC entre 30-34,99), o valor médio do IMC foi de 29,52 ($\pm 2,91$).

A glicemia no período pré-operatório encontrava-se elevada em todos os pacientes, com valor médio de 207,65 ($\pm 55,3$) mg/dl, (116,8 – 322,5 mg/dl) mesmo com o uso de terapia insulínica associada, ou não, a hipoglicemiantes orais. A quantidade média de insulina utilizada no pré-operatório por esses pacientes era de 60,8 ($\pm 29,9$) U, (27 – 150 U), demonstrando a grande falta de regulação metabólica mesmo com uso de altas doses de insulina.

No painel de citocinas, realizado no pré-operatório, não foi possível detectar níveis significantes de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , TNF- α , IL-17A, havendo somente resultados positivos esporádicos em pacientes isolados. Entretanto foi notável a expressão de IL-10 nesses pacientes durante esse período, 111,85 ($\pm 147,48$) pg/ml. Não houve expressão significativa de IL-4 no grupo estudado.

No acompanhamento pós-operatório (seis meses após o procedimento cirúrgico) pôde-se observar redução significativa no IMC, com valor médio de 27,32 ($\pm 3,46$), $p=0,0032$. Esta perda ponderal também foi acompanhada por queda importante na glicemia de jejum, 135,7 ($\pm 32,75$) mg/dl (76,6 – 196,9 mg/dl), sendo ela estatisticamente significativa ($p<0,0001$).

Além disso, houve redução nas doses diárias de insulina utilizadas pelos pacientes, sendo que o valor médio passou a ser 11,8 ($\pm 16,7$) U, (0 – 44 U) ($p<0,001$); pode-se ainda ressaltar que nove pacientes (53%) abandonaram o uso de terapia insulínica nos primeiros seis meses, conseguindo manter sua glicemia reduzida somente com dieta, aliada ou não, a hipoglicemiantes orais.

A análise do perfil de citocinas no pós-operatório, não mostrou presença significativa de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , TNF- α , IL-17A) e da IL-4. No entanto, foi observada queda significativa no padrão de expressão de IL-10 (11,62 \pm 32,26 pg/ml, $p=0,003$) (Figura 2). Esta diminuição foi correlacionada com decréscimo na dose de insulina utilizada por pacientes após no pós-operatório ($r=0,53$ e $p=0,06$).

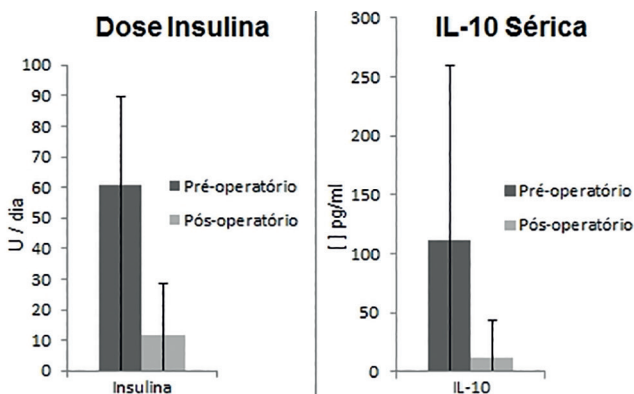


FIGURA 2 - Média e desvio-padrão de insulina (A) e IL-10 (B) no pré e pós-operatório de pacientes diabéticos submetidos à exclusão duodeno jejunal com interposição ileal sem gastrectomia: ambas apresentaram reduções significativas: A, $p<0,001$; B, $p=0,006$.

DISCUSSÃO

A hiperglicemia crônica ocorre especificamente devido ao aumento de proteínas glicadas, que podem estimular a produção de citocinas relacionadas às complicações em longo prazo do diabetes, tais como suscetibilidade aumentada de infecções e cura prejudicada de lesões¹.

Citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β , IL-6 e TNF- α tem sido descritas por diversos autores por desempenhar papel crítico na resistência à insulina e na patogênese do diabetes

melito tipo 2². Essas citocinas apresentam ações citotóxicas, citostáticas (inibição de síntese e secreção de insulina), ou citocidal para ilhotas pancreáticas, induzindo à produção de óxido nítrico e juntamente com a proteína-C reativa, têm sido descritas por induzirem processo inflamatório agudo⁵.

No presente estudo, não se observou expressão significativa de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IFN- γ , IL-17A) no pré-operatório da operação metabólica. No entanto, na avaliação pré-operatória, foi possível observar que a expressão de IL-10, a qual foi detectável em 14 dos 17 pacientes, pode ter inibido a expressão das citocinas pró-inflamatórias.

O fato dos pacientes estarem fazendo uso de insulina a mais de dois anos pode ter contribuído para os altos níveis da IL-10 no pré-operatório, pois de acordo com Frankie *et al.* 2004; a insulina tem efeito anti-inflamatório por atuar no controle glicêmico de pacientes com diabetes tipo 2⁹. Segundo Geerlings *et al.* 2000, o aumento na expressão da IL-10 foi observado em pacientes com diabetes que obtiveram adequado controle metabólico¹⁰.

A IL-10 é citocina que pode regular o padrão Th₁ de resposta imune celular, mas a atividade biológica dela parece ser mais complexa e há evidências de efeitos pró-inflamatórios¹⁴. Choi *et al.* 2007, relataram em seu trabalho que indivíduos que não apresentaram síndrome metabólica tinham maiores valores de IL-10, quando comparados com indivíduos com síndrome metabólica⁴.

No pós-operatório, seis meses após, observou-se queda significativa na expressão da IL-10, provavelmente pelo fato da maioria dos pacientes não estarem mais fazendo uso da insulina ou de hipoglicemiantes orais.

A cirurgia metabólica realizada nos pacientes do presente estudo apresentou resultados satisfatórios com melhora no metabolismo glicídico e controle dos níveis de colesterol e triglicerídeos. No pós-operatório não foi observada expressão significativa de citocinas pró-inflamatórias e da anti-inflamatória IL-4.

Esses resultados podem ser justificados pelo mecanismo do intestino distal, que ativou a produção de GLP-1 e/ou peptídeos do intestino distal, promovendo a melhora no controle clínico do diabetes melito tipo 2.

Contudo, mais pesquisas são necessárias no intuito de identificar novos marcadores inflamatórios que possam interferir no metabolismo insulínico das células β antes e após a operação metabólica, contribuindo assim para o tratamento clínico e ou cirúrgico destes pacientes.

CONCLUSÃO

Baixo grau de inflamação estava presente nesses pacientes no pós-operatório, certamente pelo adequado controle glicêmico e ausência de obesidade, o que contribuiu para bom resultado cirúrgico desses pacientes.

REFERÊNCIAS

1. Benfield T, Jensen JS, Nordestgaard BG. Influence of diabetes and hyperglycaemia on infectious disease hospitalisation and outcome. *Diabetologia* 2007; 50: 549-554.
2. Carvalho MHC, Colaço AL, Fortes ZB. Cytokines, Endothelial Dysfunction, and Insulin Resistance. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2006;50:304-12.
3. Campos JM, Lins DC, Silva LB, Araujo-Junior JG, Zeve JL, Ferraz AA. Metabolic surgery, weight regain and diabetes re-emergence. *Arq Bras Cir Dig.* 2013;26 Suppl 1:57-62.
4. Choi KM, Ryu OH, Lee KW, Kim HY, Seo JA, Kim SG, et al. Serum adiponectin, interleukin-10 levels and inflammatory markers in the metabolic syndrome. *Diabetes Res Clin Pract.* 2007;75:235-40.
5. Cieślak M, Wojtczak A, Cieślak M. Role of pro-inflammatory cytokines of pancreatic islets and prospects of elaboration of new methods for the diabetes treatment. *Acta Biochim Pol.* 2015;62(1):15-21.

6. Dandona P, Chaudhuri A, Ghanim H, Mohanty P. Proinflammatory effects of glucose and anti-inflammatory effects of insulin: relevance to cardiovascular disease. *Am J Cardiol.* 2007;99(Suppl):15B-26.
7. De Paula AL, Macedo ALV, Mota BR, SCHRAIBMAN V. Laparoscopic ileal interposition associated to a diverted sleeve gastrectomy is an effective operation for the treatment of type 2 diabetes mellitus patients with BMI. *Surg Endosc.* 2008 ; 21-29.
8. De Paula AL, Macedo ALV, Prudente AS, Queiroz L, Schraibman V, Pinus J. Laparoscopic sleeve gastrectomy with ileal interposition ("neuroendocrine brake") - pilot study of a new operation. *Surg Obes Relat Dis.* 2006;2(4):464-7.
9. Frankie B. Stentz, Guillermo E. Umpierrez, Ruben Cuervo, and Abbas E. Kitabchi Proinflammatory Cytokines, Markers of Cardiovascular Risks, Oxidative Stress, and Lipid Peroxidation in Patients With Hyperglycemic Crises. *Diabetes* 53:2079-2086, 2004
10. Geerlings SE, Brouwer EC, Van Kessel KC, Gaastra W, Stolk RP, Hoepelman AI. Cytokine secretion is impaired in women with diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest* 2000; 30: 995-1001.
11. Herder C, Zierer A, Koenig W, Roden M, Meisinger C, Thorand B. Transforming growth factor-beta1 and incident type 2 diabetes: results from the MONICA/KORA case-cohort study, 1984-2002. *Diabetes Care.* 2009 Oct;32(10):1921-3. Epub 2009 Jul 10.
12. Kopp HP, Kopp CW, Festa A, Krzyzanowska K, Kriwanek S, Minar E, Roka R, Schernthaner G. Impact of weight loss on inflammatory proteins and their association with the insulin resistance syndrome in morbidly obese patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003 Jun 1;23(6):1042-7. Epub 2003 Apr 24.
13. Leite-Cavalcanti C, Rodrigues-Gonçalves Mda C, Rios-Asciutti LS, Leite-Cavalcanti A. The prevalence of chronic disease in a group of elderly Brazilian people and their nutritional status. *Rev Salud Publica (Bogota).* 2009 Dec;11(6):865-77.
14. Mocellin S, Marincola F, Rossi CR, Nitti D, Lise M. The multifaceted relationship between IL-10 and adaptive immunity: putting together the pieces of a puzzle. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004; 15: 61-76.
15. Pimenta GP, Moura Dd, Adorno Filho ET, Jaudy TR, Jaudy TR, de Aguiar-Nascimento JE. Long-term quality of life after vertical sleeve gastrectomy. *Rev Col Bras Cir.* 2013 Nov-Dec;40(6):453-7.
16. Schwarz V. Inflammation as a factor of the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Ter Arkh.* 2009;81(10):74-80. Review.
17. Silva-Neto EF, Vázquez CM, Soares FM, Silva DG, Souza MF, Barbosa KB. Bariatric surgery reverses metabolic risk in patients treated in outpatient level. *Arq Bras Cir Dig.* 2014 Jan-Mar;27(1):38-42.
18. Stoll A, Silva JC, Von Bahten LC, Gugelmin G, Vedan AB, de Souza BV. Short-term effect of gastric bypass in obese diabetic patients. *Rev Col Bras Cir.* 2013 Jan-Feb;40(1):11-5.

No artigo "AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA DE PACIENTES COM DIABETE MELITO TIPO 2 SUBMETIDOS À CIRURGIA METABÓLICA", com o número de DOI: /10.1590/S0102-6720201500040012 publicado no periódico Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva, 28(4):266-269, ná pagina 266:

Onde lia-se:

Fonte de financiamento: não há

Leia-se:

Fonte de financiamento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)
