

COMPARAÇÃO DA PRODUÇÃO DE NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS (NETS) ENTRE INDIVÍDUOS OBESOS E EUTRÓFICOS

Autores: DÉBORA GONÇALVES PEREIRA GUIMARÃES, VICTOR HUGO DANTAS GUIMARÃES, DANIELA FERNANDES DE FREITAS, AMANDA RODRIGUES SANTOS, MATHEUS FELIPE FERREIRA AGUIAR, ZUILA MARIA DE JESUS RAMETTA, SÉRGIO HENRIQUE SOUZA SANTOS,

Introdução

A obesidade é um sério problema de saúde pública mundial, sendo caracterizado pelo excesso da gordura corporal (RODGERS; TSCHÖP; WILDING, 2012). Relaciona-se ao desenvolvimento da síndrome metabólica e está associada a doenças cardiovasculares, diabetes *mellitus* tipo 2, hipertensão, arteriosclerose e dislipidemia, além de estar associada a um quadro crônico de inflamação no tecido adiposo, que desempenha um papel importante nas complicações da obesidade (GESTA; TSENG; KAHN, 2007).

A inflamação é resultado do aumento dos adipócitos que liberam exacerbadamente sinalizadores denominados adipocinas (BODEN *et al.*, 2004), dentre os quais encontra-se mediadores responsáveis pelo recrutamento leucocitário. No estabelecimento da obesidade, os neutrófilos constituem a primeira linha de infiltrado no tecido adiposo branco, que por vários mecanismos leva ao comprometimento de determinadas funções metabólicas (ELGAZAR-CARMON *et al.*, 2008).

Estudos recentes têm demonstrado um novo mecanismo dos neutrófilos e sua relação com disfunções orgânicas, com o estabelecimento da resistência à insulina (WANG *et al.*, 2014), por meio da formação de armadilhas extracelulares denominado NETs (do inglês *neutrophil extracellular traps*), onde o neutrófilo também libera uma rede de fibras de cromatina associadas com grânulos antimicrobianos e enzimas, tais como a mieloperoxidase (MPO), elastase e catepsina G (CZAIKOSKI *et al.*, 2016).

A formação excessiva das redes também tem sido observada em muitos estados patológicos. Além disso, há evidências crescentes de que os mediadores inflamatórios agem sinergicamente com os produtos finais de micro-organismos para induzir a ativação de neutrófilos sistêmica, o que contribui para seu acúmulo em órgãos distantes e impede sua migração adequada ao foco de infecção.

Assim sendo, o objetivo do presente estudo é comparar a produção das NETs entre os indivíduos obesos e eutróficos, bem como avaliar os parâmetros bioquímicos e metabólitos mensurando os níveis plasmáticos lipídicos, dosando especificamente os níveis de triglicérides, colesterol total e HDL.

Material e Métodos

A aprovação ética para este estudo foi obtida pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) envolvendo Seres Humanos. Parecer nº 1.596.711.

A. Coleta de Dados

Os pacientes foram submetidos ao termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). A amostra de pacientes obesos e eutróficos foram coletadas após jejum de 10 a 12 horas. As amostras foram encaminhadas ao laboratório de pesquisa para análises. Os dados antropométricos foram coletados do prontuário dos pacientes.

B. Processamento e Análise das Amostras

O material foi encaminhado ao laboratório para avaliação dos níveis de colesterol total, HDL, triglicérides, glicose e cálcio. A dosagem de NETs foi analisada através da quantidade de DNA ligado à enzima foi quantificado utilizando o kit de Quant-iT™ PicoGreen (Invitrogen) através da técnica de Elisa e foram revelados por imunofluorescência.

C. Análises Estatísticas

A análise estatística foi realizada no software GraphPad Prisma (versão 5.0®, San Diego, Califórnia, USA), com 95% de confiabilidade ($p < 0,05$). Os dados foram expressos em média \pm EPM. A significância estatística dos valores em média para os diferentes grupos foram estimados por teste T (não paramétrico).

Resultados e Discussão

Na avaliação da dosagem das NETs, o estudo mostrou que os indivíduos obesos ($48,28 \pm 2,43$) possuem níveis significativamente ($p < 0,01$) elevados de NETs comparado com indivíduos eutróficos ($62,0 \pm 5,22$) (Fig. 1A). A obesidade é uma condição inflamatória de baixa intensidade isso devido ao fato do tecido adiposo branco produzir uma série de adipocinas que estão presentes no processo inflamatório (HOTAMISLIGI; SHARGILL; SPIEGELMAN, 1993). Os neutrófilos são componentes importantes da imunidade inata necessários para manter a homeostase do organismo (ZHU *et al.*, 2008). NETs são originadas por um processo de morte celular com vias distintas da necrose e apoptose, denominado netose, cujo mecanismo não é completamente conhecido (BRINKMANN *et al.*, 2004).



A netose é caracterizada pela presença das fibras de cromatina dos neutrófilos no espaço extracelular. Assim, um pré-requisito para ocorrer netoses é a modificação de resíduos de arginina de histonas para citrulina mediado por PAD4 (proteína arginina desaminase 4), a qual é dependente de cálcio e capaz de mudar a carga das histonas, levando a enorme descondensação cromatina (ZAWROTNIAK; RAPALA-KOZIK, 2013).

Esse processo é confirmado no presente estudo, com resultado significativo ($p < 0,001$), demonstrando que os níveis de cálcio encontram-se elevados em obesos ($4,3 \pm 0,15$), em relação à indivíduos eutróficos ($1,24 \pm 0,23$), indicando o processo de netose (Fig. 1B).

Também foram avaliados o perfil lipídico (Fig. 1C-G) e glicídico (Fig. 1H-F) de ambos os indivíduos, em que se percebe altos níveis significativos de lipoproteínas de baixa (LDL) ($p < 0,05$) e muito baixa densidade (VLDL) ($p < 0,05$), assim como aumento plasmático de colesterol total ($p < 0,001$) e triglicérides ($p < 0,05$), com redução significativa ($p < 0,05$) dos níveis séricos de lipoproteínas de alta densidade (HDL).

Observa-se, ainda, que os indivíduos obesos apresentaram elevados níveis de hemoglobina glicada (HbA1c) ($5,63 \pm 0,14$), bem como glicose plasmática ($102,4 \pm 7,70$) quando comparados ao grupo de pessoas eutróficas, respectivamente ($4,68 \pm 0,12$ e $82,7 \pm 3,31$). Sabe-se que a relação da resistência à insulina e o processo inflamatório é bidirecional, ou seja, qualquer processo inflamatório crônico induz resistência à insulina, a qual, frequentemente associada à obesidade central, exacerba o processo inflamatório.

Considerações finais

Os resultados do presente estudo apontam que indivíduos obesos apresentam elevados níveis de DNA/NETs e cálcio iônico, o que predispõe um quadro fisiológico favorável a formação de netose, que pode estar relacionado ao aumento dos níveis plasmáticos de lipídeos e glicose sanguínea que desencadeiam o processo de inflamação e complicações secundárias da obesidade que contribuem para ocorrência desse processo em neutrófilos.

Agradecimentos

Ao Hospital Universitário Clemente Farias (HUCF), pelo apoio na aquisição de recurso para o desenvolvimento do presente pesquisa.

Referência

- BODEN, G. et al. Free fatty acids produce insulin resistance and activate the proinflammatory nuclear factor- κ B pathway in rat liver. *Diabetes*, v. 54, n. 12, p. 3458-3465, 2005. BRINKMANN, Volker et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *science*, v. 303, n. 5663, p. 1532-1535, 2004.
- CZAIKOSKI, P. G. et al. Neutrophil Extracellular Traps Induce Organ Damage during Experimental and Clinical Sepsis. *PLoS One*, 2016; 11(2): e0148142.
- DA CRUZ, S. H.; ZANON, R. B.; BOSA, C. A. Relação entre Apego e Obesidade: Revisão Sistemática da Literatura. *Psico*, v. 46, n. 1, p. 6-15, 2015.
- ELGAZAR-CARMON, V. et al. Neutrophils transiently infiltrate intra-abdominal fat early in the course of high-fat feeding. *Journal of lipid research*, v. 49, n. 9, p. 1894-1903, 2008.
- GESTA, S.; TSENG, YH; KAHN, C. R. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell*, v. 131, n. 2, p. 242-256, 2007.
- HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*, v. 259, n. 5091, p. 87-91, 1993.
- RODGERS, R. J.; TSCHÖP, M. H.; WILDING, J. PH. Anti-obesity drugs: past, present and future. *Disease models & mechanisms*, v. 5, n. 5, p. 621-626, 2012.
- WANG, Q. et al. Myeloperoxidase deletion prevents high-fat diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes*, v. 63, n. 12, p. 4172-4185, 2014.
- ZAWROTNIAK, M.; RAPALA-KOZIK, M. Neutrophil extracellular traps (NETs)-formation and implications. *Acta Biochim Pol*, v. 60, n. 3, p. 277-84, 2013.
- ZHU, M. J. et al. AMP-activated protein kinase signalling pathways are down regulated and skeletal muscle development impaired in fetuses of obese, over-nourished sheep. *The Journal of physiology*, v. 586, n. 10, p. 2651-2664, 2008.



Figura 1. Níveis plasmáticos de pacientes eutróficos e obesos. (A) DNA/NET's, (B) cálcio iônico, (C) colesterol total, (D) triglicérides, (E) lipoproteína de baixa densidade (LDL), (F) lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), (G) lipoproteína de alta densidade (HDL), (H) hemoglobina glicada A1c e (I) Glicose. Dados expressos em média \pm EPM. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.