



15º Congresso de Iniciação Científica

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS CÉLULAS IMUNOLÓGICAS DE PACIENTES OBESOS MÓRBIDOS PRÉ-CIRURGIA BARIÁTRICA

Autor(es)

CAMILA BORGES FERREIRA

Orientador(es)

Adrienne Christine Palanch

Apoio Financeiro

FAPIC

1. Introdução

Denomina-se obesidade uma enfermidade caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal, associada a problemas de saúde. Independente da importância dessas diversas causas, o ganho de peso está sempre associado a um aumento da ingestão alimentar e a uma redução do gasto energético que são características epidêmicas. O índice da obesidade tem sido cada vez mais expressivo em todas as partes do mundo. Dados da organização Panamericana de Saúde, apontam que o problema atinge indistintamente as mais variadas faixas etárias, de ambos os sexos, sendo que no Brasil, os índices de obesidade não divergem do quadro mundial (WHO – OMS, 1997).

O número e a gravidade das complicações associadas à doença progredem linearmente com o aumento do índice de massa corporal. O índice de massa Corporal (ou de Quetelet) trata-se de um método prático e de baixo custo, na qual a relação do peso em quilogramas sobre a altura em metros ao quadrado, resulta em um índice que pode avaliar o indivíduo em obeso ou não, servindo inclusive para classificar o tipo de obesidade. (VILELA, 1997).

Fórmula do IMC: $\text{Peso (Kg)} / \text{Altura}^2 \text{ (M)}$ Esta doença compromete a qualidade e a expectativa de vida do indivíduo e a manifestação mais séria da doença está na obesidade mórbida, caracterizada pelo IMC superior a 40 kg/m², e considerada a segunda maior causa de morte, ficando atrás apenas das doenças associadas ao uso do cigarro (KOLANOWSKI, 1997). As comorbidades da obesidade são graves tanto em relação aos fatores fisiológicos como psico-sociais. Elas incluem anormalidades endócrino-metabólicas (diabetes mellitus, dislipidemias, hipertensão arterial, câncer e outros), problemas mecânicos (osteoartrite, insuficiência respiratória, apnéia do sono, entre outros), e manifestações psicológicas (depressão e baixa auto-estima), além do considerável risco relacionado a doenças cardiovasculares (SCHEEN, 1999).

A tendência no aumento da obesidade parece ocorrer paralelamente à redução na prática de atividade

física e aumento no sedentarismo. O hábito da prática de atividade física é influenciado na criança pelos pais, e quando desenvolvidos nesta fase, tendem a se manter do mesmo modo até a fase adulta. Além disso, uma redução natural no gasto energético é observada com a modernização, ocasionando estilo de vida mais sedentário com transporte motorizado, equipamentos mecanizados que diminuem o esforço físico de homens e mulheres tanto no trabalho como em casa (WHO - World Health).

O sistema imune é composto por células especializadas que funcionam dentro de estruturas anatômicas discretas e organizadas. A medula óssea é a fonte das células precursoras que posteriormente originam os constituintes celulares do sistema imune. A imunologia concentra-se no papel das células brancas do sangue na defesa do hospedeiro; estas incluem os granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), monócitos e linfócitos (PEAKMAN; VERGANI 1999). Os granulócitos constituem cerca de 65% das células brancas, a aparência destes grânulos ao microscópio óptico, após coloração convencional, dá origem a uma posterior subdivisão. Grânulos com intensa cor azul são encontrados nos basófilos, que correspondem de 0,5% - 1% dos granulócitos; grânulos corados em vermelho estão presentes nos eosinófilos (3% - 5%); enquanto os neutrófilos (90%-95%) têm grânulos que se mantêm relativamente sem coloração. A expressão "célula polimorfonuclear", referindo-se ao núcleo multilobulado dos granulócitos, tem-se tornado sinônimo de neutrófilos, que constituem a maioria dos granulócitos. (PEAKMAN; VERGANI, 1999). Os monócitos constituem de 5%-10% das células brancas circulantes e têm uma reduzida meia-vida, passando aproximadamente 24 horas no sangue. Quando se tornam residentes dos tecidos, são chamados de macrófagos. A morfologia dos monócitos e dos macrófagos é muito variada, contudo, eles são maiores que os neutrófilos e os linfócitos, têm um único grupo e abundantes grânulos citoplasmáticos (FRASER et al., 2000; PEAKMAN; VERGANI, 1999). Já os linfócitos constituem 25%-35% do total das células brancas. São divididos em dois tipos, B e T, presentes no sangue numa relação aproximada de 1:5. O estado nutricional do indivíduo pode interferir diretamente nos processos de defesa do organismo, sendo que este fato está relacionado principalmente com a influência do tecido adiposo sobre o sistema imunológico. A obesidade altera as respostas imunológicas específicas e não específicas. Resultados epidemiológicos demonstram que há maior variedade e tipos específicos de doenças infecciosas em indivíduos obesos em comparação com indivíduos magros. (MARTI et al., 2001). A obesidade está sendo caracterizada como um processo inflamatório sistêmico de baixa magnitude, apresentando marcadores inflamatórios como a proteína reativa C (CRP) e IL-6 mais elevados, porém, não na mesma proporção que em condições inflamatórias crônicas e agudas (FANTUZZI, 2005). Segundo Villiers e Smart (1999) o aumento do consumo de gorduras e açúcares que resulta no aumento de LDL (lipoproteínas de baixa densidade), é diretamente proporcional ao aumento de fatores pro-inflamatórios, como no número de macrófagos e na excreção de citocinas envolvidas na atividade inflamatória. Pessoas obesas possuem grandes riscos de desenvolver outras doenças como diabetes, arteriosclerose, distúrbios do sono e problemas psicológicos que levam a depressão, que se agravam quando o indivíduo permanece nesta condição.

2. Objetivos

Caracterizar as células imunológicas de pacientes obesos, analisando sua morfologia e distribuição sanguínea.

3. Desenvolvimento

A caracterização da população foi realizada sendo que formada por mulheres com idade de 25 a 45 anos, com IMC no valor entre 34 a 53 kg/m² residentes no município de Piracicaba. No Nutricentro foram realizadas entrevistas para levantamento de informações sobre a saúde e hábito de vida, avaliação clínica, antropométrica e calorimétrica. As amostras de sangue das voluntárias foram coletadas no próprio Nutricentro, para tal foram utilizados materiais descartáveis, padronizados, etiquetados e de reconhecida qualidade. A coleta foi realizada por profissionais qualificados. Este projeto está vinculado ao projeto de pesquisa N^o do protocolo CONSEPE 81/05 que apresenta aprovação no CEP-UNIMEP.

A preparação das extensões sanguíneas foi realizada imediatamente após a coleta para posterior análise no Laboratório de Performance Humana da UNIMEP. Resumidamente, uma pequena quantidade de

amostra amostra (10 uL) foi colocada sobre a extremidade de uma lâmina de vidro limpa e seca. Esta gota foi pressionada pela lâmina extensora, em um ângulo de 45° em relação à lâmina de vidro, e foi arrastada sobre esta última em direção à sua outra extremidade, com velocidade constante. A lâmina com o esfregaço foi deixada secar a temperatura ambiente durante 2 a 3 minutos, fazendo em seguida sua coloração. Esta foi feita preenchendo-se a lâmina do esfregaço com o corante MAY-GRÜNWALD e GIENSA. Após 4 minutos, foi adicionada à lâmina 5 ml de água destilada, aguardando mais 2 minutos. Por fim, a lâmina foi lavada com água corrente e deixada inclinada em uma estante para secar em temperatura ambiente. Nestas preparações histológicas foram realizadas as análises do leucograma diferencial, sendo a leitura feita em Microscópio de Luz NIKON, na objetiva de 100X. Para tanto, foi colocada sobre a lâmina uma gota de óleo de imersão. A leitura foi feita contando-se 100 células com ajuda do aparelho LEUCOTRON TP e o resultado expresso em porcentagem.

A preparação do material para a microscopia eletrônica foi feita da seguinte maneira: O Pellet de células em ágar foi fixado durante 2 horas em fixador Karnovsky (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2% em tampão cacodilato pH 7,0 a 0,05M). Em seguida as amostras foram lavadas 2 vezes em tampão cacodilato a 0,05M durante 10 minutos cada e pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% durante 1 hora. Após este período, o material foi lavado em água destilada e desidratado em soluções crescentes de álcool, sendo 2 lavagens em álcool 70%, 2 lavagens em álcool 98% e 3 lavagens em álcool absoluto, e acetona 100% por 2 vezes. O material permaneceu em solução de infiltração (acetona/resina epóxi Spurr 1:1) por 2 a 3 horas, em resina pura por 12 horas e incluída em resina Spurr pura, polimerizada à 70°C por 48 horas. Assim, as amostras ficaram prontas para serem cortadas, coradas e analisadas no microscópio eletrônico. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média.

4. Resultados

Em relação ao Índice de Massa Corporal, a população estudada apresentava em média $40,7 \pm 1,6$, sendo que o indivíduo com menor IMC foi o paciente 12 com IMC de 35,3; e o de maior IMC (52,3) foi o paciente 3 (Tabela 1). Esta população era formada preferencialmente por indivíduos obesos II e obesos III.

As respostas imunológicas iniciadas por uma inflamação estão relacionadas à habilidade de migração dos leucócitos para o tecido conjuntivo atingindo os diversos tecidos periféricos. Os processos de migração, rolamento, ativação e adesão dos leucócitos são etapas cruciais para o recrutamento inflamatório celular (CAVAGLIERI et al., 2000).

No Leucograma diferencial de Leucócitos Agranulócitos, a média dos linfócitos foi de 34% e dos monócitos foi 11% (Tabela 2). O aumento no número de linfócitos pode estar relacionado a algum tipo de infecção ou patologia, não podendo ser explicado somente pelo grau de obesidade do paciente. Entretanto, a média da porcentagem de linfócitos da população está diminuída, indicando uma ligeira imunodepressão relacionada a respostas imunológicas adaptativas. A média de monócitos da população apresentou-se aumentada, sugerindo que a obesidade pode estar relacionada ao recrutamento e ativação de fagócitos, células responsáveis pela resposta imunológica inata.

No Leucograma diferencial de Leucócitos granulócitos (tabela 3), a média dos neutrófilos Bastonetes foi de 17%, a dos neutrófilos segmentados de 36%, com uma média de neutrófilos totais de 53%. Este resultado indica que novamente células responsáveis pela resposta imunológica inata estão sendo recrutadas, sugerindo um quadro inflamatório agudo em virtude do aumento de bastonetes.

Nas células responsáveis por reações pró-inflamatória anafiláticas ou alérgicas, como os basófilos, e respostas mediadas pelo complexo antígeno-anticorpo, como os eosinófilos, não foram observadas alterações apresentando a média de 1% de Basófilos e 2% de Eosinófilos.

A inflamação é um processo de defesa que envolve células sanguíneas e proteínas de um tecido em resposta a uma injúria, infecção, trauma ou reação imunológica (KELLEY, 2001). Portanto, o aumento no número dos leucócitos referentes a uma resposta inata acompanhada de uma resposta inflamatória aguda foi observado no grupo de mulheres estudadas, indicando a associação com o estado inflamatório apresentado classicamente pelos indivíduos obesos (Tabelas 2 e 3) (O'ROURKE et al., 2006).

A análise morfológica dos linfócitos circulantes de paciente obesos não demonstrou diferenças em relação ao observado em indivíduos normais.

5. Considerações Finais

Em virtude dos resultados apresentados, observamos aumento na porcentagem de monócitos e neutrófilos bastonetes, fagócitos da resposta imunológica inata, na população de mulheres com diferentes níveis de obesidade. Também foi observada uma ligeira linfopenia. A morfologia dos linfócitos circulantes não apresentou-se alterada. De forma geral, estes resultados sugerem que alterações na porcentagem de células de defesa circulantes estão relacionadas com a obesidade..

Referências Bibliográficas

CAVAGLIERI, C.R.; MARTINS, E.F.; COLLEONE, V.V.; RODRIGUES, C.; VECCHIA, M.G.; CURI, R. Fiber-rich diets alter rat intestinal leukocytes metabolism. *J. Nutrition Biochem.*, 11:555-561, 2000.

FANTUZZI, G. adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 115(5): 911-9, 2005.

FRASER, DA; THOEN, J; BONDHUS, S; HAUGEN, M; RESELAND, JE; DJOSELAND, O; FORRE, O; KJELDSEN-KRAGH, J. Reduction in serum leptin and IGF-1 but preserved lymphocyte numbers and activation after a ketogenic diet in rheumatoid arthritis patients. *Clin Exp Rheumatol*, v. 18, p. 209-214, 2000.

KELLEY, D.S. Modulation of human immune and inflammatory responses by dietary fatty acids. *Nutrition.*,

17(7-8): 669-73, 2001. KOLANOWSKI, J. Surgical treatment for morbid obesity. *British Medical Bulletin*, v. 53, n. 2, p. 433-444, 1997.

O'ROURKE, R.W.; KAY, T.; LYLE, E.A.; TRAXLER, S.A.; DEVENEY, C.W.; JOBE, B.A.; ROBERTS Jr, C.T.; MARKS, D.; ROSENBAUM, J.T. Alterations in peripheral blood lymphocyte cytokine expression in obesity. *Clin. Exp. Immunol.*, 146:39-46, 2006.

PEAKMAN, M; VERGANI, D. *Imunologia Básica e Clínica*, Ed. Guanabara Koogan. p 01 – 19, 1999

SCHEEN, A. J.; LUYCKX, F. H.; DESAIVE, C.; LEFEBVRE, P.J. Severe / extreme obesity: a medical disease requiring a surgical treatment?. *Acta Clinica Belgica*, v. 54, n.3, p.154-161, 1999.

VILELA, R. *Introdução ao diagnóstico nutricional*. São Paulo: Atheneu, 1997.

WHO "Obesity – prevention and management of the global epidemic". *The WHO consultation on obesity*, Geneve. 3-5 june, 1997.

Anexos

Tabela 1: Índice de Massa Corporal dos pacientes obesos.

Pacientes	IMC
1	39,4
2	34,8
3	52,3
5	42,1
6	38,2
8	37,6
9	42,8
12	35,3
14	45,0
17	36,0
22	48,0
23	36,5

Tabela 2. Leucograma diferencial – Leucócitos Agranulócitos

Pacientes	Linfócito		Monócito	
	A	B	A	B
Duplicatas				
1	10%	20%	19%	20%
2	43%	48%	4%	9%
3	30%	29%	11%	5%
5	52%	45%	9%	14%
6	44%	52%	13%	14%
8	28%	31%	17%	6%
9	44%	48%	7%	8%
12	35%	20%	10%	11%
14	44%	38%	5%	7%
17	31%	35%	13%	9%
22	30%	20%	3%	12%
23	20%	20%	18%	21%

Tabela 3. Leucograma diferencial – Leucócitos Granulócitos

Pacientes	Neutrófilos bastonetes		Neutrófilos segmentados		Neutrófilos totais		Basófilos		Eosinófilos	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
1	19%	27%	49%	33%	68%	60%	0%	0%	3%	0%
2	14%	19%	32%	23%	46%	42%	1%	0%	0%	1%
3	18%	13%	40%	53%	58%	66%	0%	0%	1%	0%
5	9%	11%	29%	26%	38%	37%	0%	2%	1%	2%
6	13%	11%	29%	22%	42%	33%	2%	1%	3%	0%
8	12%	16%	38%	40%	50%	56%	0%	1%	5%	6%
9	13%	11%	34%	28%	47%	39%	2%	2%	0%	3%
12	12%	22%	43%	43%	55%	65%	0%	0%	0%	3%
14	11%	36%	39%	33%	50%	69%	0%	1%	1%	5%
17	17%	21%	35%	31%	52%	52%	1%	2%	3%	2%
22	20%	21%	45%	45%	65%	66%	0%	1%	2%	1%
23	16%	20%	38%	38%	54%	58%	1%	0%	7%	1%