



INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DA OBESIDADE E APTIDÃO FÍSICA NA EXPRESSÃO GÊNICA DE MARCADORES DE SENESCÊNCIA DO SISTEMA IMUNOLÓGICO EM INDIVÍDUOS DE MEIA-IDADE OBESOS

Autores e coautores: Leonardo Rodrigues Costa, Diego Trevisan Brunelli, Ivan Bonfante, Vinicius de Oliveira Boldrini, Keryma Mateus, Renata Duft, Raphael Fatori, Pedro Scolfaro, Geovanna de Aro, Alessandro dos Santos Faria, Cláudia Regina Cavaglieri.

INTRODUÇÃO

Atualmente, a obesidade é considerada como um problema mundial de saúde, afetando grande parte da população e tornando-se uma das principais causas de redução na qualidade de vida, morbidade e mortalidade (GUYENET et al., 2012; NG et al., 2014). Diversos estudos têm proposto que o mecanismo central subjacente à obesidade e suas doenças relacionadas advém de um estado persistente de inflamação crônica de baixo grau junto a uma desregulação nos mecanismos de resposta da inflamação frente ao estresse (MARTIN-CORDEIRO et al, 2011; De LA FUENTE & CASTRO, 2012;). Essa inflamação crônica é possivelmente gerada pelo recrutamento de células do sistema imunológico no tecido adiposo em resposta ao excesso de nutrientes, hipertrofia e hipóxia dos adipócitos (De LA FUENTE & CASTRO, 2012). Consequentemente, essa disfunção nos adipócitos contribui na ativação do sistema imune e no aumento da produção de diversas moléculas pró-inflamatórias como a leptina, interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral α (TNF- α) e a proteína quimiotática de monócitos – 1 (MCP1) (GLEESON et al., 2011).

Como já bem descrito na literatura, níveis elevados de marcadores inflamatórios são fortes preditores de risco de doenças cardiometabólicas e mortalidade em idosos e pessoas de meia-idade (ARSENAULT et al., 2009). Ainda, adipócitos disfuncionais parecem estar implicados na produção de estresse oxidativo através da geração de espécies reativas de oxigênio, podendo assim resultar em mais inflamação e dano nos tecidos (GIORDANO et al., 2013). Sabe-se que uma resposta defensiva apropriada do sistema imunológico requer baixos níveis de oxidação e inflamação, que são dois processos interligados com muitos ciclos de realimentação (VIDA et al., 2014). No entanto, danos celulares aparecem quando esses níveis estão aumentados, (como no caso da obesidade e do envelhecimento), e células da imunidade inata, como os macrófagos, exibem uma produção sobreativada de compostos oxidativos e inflamatórios, que ocorre principalmente na ausência de estímulo antigênico e não pode ser neutralizada por defesas antioxidantes e anti-inflamatórias, levando assim a um estado crônico de estresse oxidativo e inflamatório (VIDA et al., 2014; HUNSCHE et al.; 2016).

Observando tais características análogas às observadas no envelhecimento, tem-se criado a hipótese de que a obesidade gera um início precoce da imunossenescência (envelhecimento biológico do sistema imunológico), e isso pode ser uma das razões para o aumento da taxa de morbidade e risco de morte relacionada a essa doença (De LA FUENTE & CASTRO, 2012).

Em um estudo recente, Hunsche et al. (2016) observaram que a quimiotaxia de macrófagos e linfócitos, a fagocitose de macrófagos, a atividade de células NK, a resposta proliferativa de linfócitos, a liberação de IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-2 e IL-10 em culturas de leucócitos, bem como a capacidade antioxidante e oxidante de ratos adultos obesos foram significativamente prejudicadas quando

comparadas a ratos adultos não obesos. Ainda, os autores observaram que os valores dessas variáveis foram semelhantes aos de ratos cronologicamente idosos, concluindo assim que a obesidade pode gerar uma imunossenescência prematura que é agravada à medida que o rato adulto obeso envelhece.

Já Spielmann et al. (2014) verificaram pela primeira vez que o excesso de massa corporal (principalmente gordura) apresentou relação significativa com a diferenciação de células T associada à imunossenescência em adolescentes (10-14 anos) obesos, concluindo assim que a obesidade pode, até mesmo em adolescentes, acelerar o envelhecimento do sistema imunológico e predispor à aquisição precoce de um perfil de risco imunológico e problemas de saúde relacionados com a imunidade na idade adulta.

Visto que essa teoria é baseada em apenas um estudo em seres humanos e em modelos experimentais com ratos, mais estudos são necessários a fim de verificar se a obesidade realmente leva a um estado precoce de senescência do sistema imunológico, se tais alterações são dependentes ou não de alguma doença associada à obesidade, ou ainda se a imunossenescência precoce associada a obesidade está relacionada à aptidão física dos indivíduos. Sendo assim, O objetivo desta pesquisa foi investigar, em leucócitos circulantes, a expressão gênica de marcadores de senescência do sistema imunológico e suas possíveis correlações com a aptidão física e/ou estado de saúde de indivíduos adultos de meia-idade saudáveis, obesos diabéticos do tipo 2 ou obesos sem doença associada.

METODOLOGIA

A amostra foi composta por indivíduos obesos (índice de massa corporal (IMC) 30 -35 kg/m²) de meia-idade, diabéticos do tipo 2 ou não, de ambos os sexos, que foram distribuídos em grupo obesos diabéticos (OBD; n=17) ou grupo obesos sem doença associada (OB; n=18); Adicionalmente, um grupo de voluntários da mesma idade e saudável (IMC 20 – 25 kg/m²) foi utilizado como grupo controle eutrófico (E=18) para a comparação das variáveis.

Antes de submeter os indivíduos a qualquer tipo de estímulo físico associado com o estudo, foi verificada a atividade física habitual - através do questionário de Baecke (FLORINDO, LATORRE, 2003). Também foram realizadas análises - funcionais (força muscular e aptidão cardiorrespiratória); de composição corporal (*Pletismografia*); bioquímicas (concentrações séricas de leptina e soropositividade para citomegalovírus) e moleculares (análise da expressão gênica do TNF- α , CD27, PD-1 e CCR7 dos leucócitos). Além disso, antes de realizar o esforço proposto pelo projeto, os indivíduos foram submetidos à uma avaliação física inicial, realizada por profissional médico cardiologista, sendo constituída de anamnese, exame físico geral e teste ergométrico.

As análises da expressão gênica do TNF- α e CD27 dos leucócitos circulantes foram realizadas por meio da técnica Real Time – PCR seguindo as descrições de UKROPEC et al. (2008) e Rachid et al. (2015). O *primer* HPRT humano foi usado como gene de referência da reação (controle endógeno), servindo para normalizar a expressão dos genes alvos nas amostras.

Com relação à lista de *primers*, foram utilizados os seguintes pares de sequências 5' e 3':

TNF- α :

forward → CGAGTCTGGGCAGGTCTACTTT

reverse → AAGCTGTAGCCCCAGTGAGTT

CD27:

forward → ACTACTGGGCTCAGGGAAAGCT

reverse → GGATCACACTGAGCAGCCTTTC

RESULTADOS

Com relação aos resultados obtidos no questionário Baecke, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos no momento pré, sendo que os voluntários obesos diabéticos (OBD) apresentaram um tempo de atividade física semanal de $65,03 \pm 8,08$ minutos, os obesos sem doença associada (OB) de $63,13 \pm 7,08$ e os voluntários eutróficos (E) de $68,50 \pm 9,30$ minutos.

A Tabela 1 apresenta os valores das variáveis antropométricas, composição corporal e capacidades funcionais dos grupos OBD, OB e E. Foram observadas diferenças estatisticamente significantes em peso, IMC, massa de gordura, massa livre de gordura e VO_{2max} para os grupos OBD e OB em comparação ao grupo E ($p < 0,0001$ para todas as comparações), porém sem diferenças entre os grupos OBD e OB nessas mesmas variáveis ($p > 0,05$).

Tabela 1. Antropometria, composição corporal, força máxima e aptidão cardiorrespiratória de indivíduos obesos diabéticos (GOD), obesos sem doença associada (GO) e eutróficos (GCE) de meia-idade.

Variável	OBD (n = 17)	OB (n = 18)	E (n = 18)
Idade (anos)	$52,4 \pm 5,0$	$50,2 \pm 5,5$	$52,5 \pm 4,4$
Altura (m)	$1,66 \pm 0,08$	$1,69 \pm 0,10$	$1,69 \pm 0,11$
Peso (kg)	$88,6 \pm 9,3$ &	$93,6 \pm 13,3$ &	$68,2 \pm 10,1$
IMC (kg/m^2)	$32,3 \pm 2,2$ &	$32,5 \pm 1,5$ &	$23,8 \pm 1,4$
Massa livre de gordura (kg)	$60,1 \pm 6,3$ &	$56,1 \pm 7,7$ &	$73,3 \pm 8,0$
Massa de gordura (kg)	$39,9 \pm 6,4$ &	$43,9 \pm 7,7$ &	$26,8 \pm 8,1$
VO_{2max} (ml/kg/min)	$20,92 \pm 4,59$ &	$22,43 \pm 5,33$ &	$29,30 \pm 4,67$
1RM - Supino reto (Kg)	$31,5 \pm 14,6$	$31,4 \pm 17,8$	$25,7 \pm 13,6$
1RM - Leg Press (kg)	$208,8 \pm 57,8$	$204,7 \pm 62,5$	$165,3 \pm 46,5$

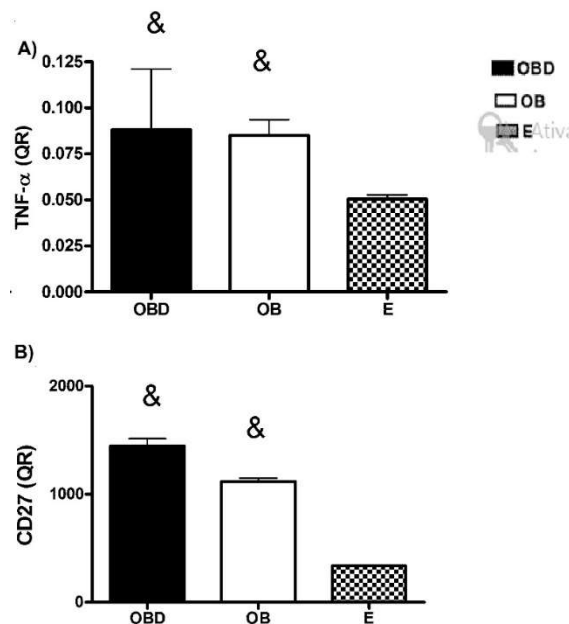
IMC = índice de massa corpórea; &Diferença significativa comparado ao grupo OB;

&Diferença significativa comparado ao grupo E; $p \leq 0,05$.

A figura 1 apresenta os valores das quantificações relativas (QR) ao controle endógeno (HPRT) da expressão gênica dos marcadores analisados no presente estudo. Com relação ao TNF- α (Figura 1A), foram observadas diferenças significativas para os grupos OBD e OB comparados ao E ($p = 0,001$ e $p = 0,029$, respectivamente). Concomitante, foram observadas diferenças significativas da expressão gênica de CD27 dos grupos OBD e OB em comparação ao E ($p = 0,014$ e $p = 0,043$, respectivamente).

A partir da figura 1, foram encontradas correlações negativas e moderadas significantes entre o IMC e o VO_{2max} ($r^2 = - 0,504$; $p < 0,001$) e entre o VO_{2max} e a expressão gênica de CD27 ($r^2 = - 0,517$; $p < 0,001$). Adicionalmente, observamos uma correlação positiva moderada significativa entre o IMC e a expressão gênica de CD27 ($r^2 = 0,414$; $p = 0,002$) e entre o CD27 e a massa de gordura ($r^2 = 0,445$; $p = 0,001$). Com relação ao TNF- α , foi observada correlação significativa com a massa de gordura ($r^2 = 0,338$; $p = 0,023$) nos grupos estudados.

Figura 1. Expressão gênica de marcadores relacionados à imunossenescência em indivíduos obesos diabéticos (OBD), obesos sem doença associada (OB) e eutróficos (E) de meia-idade.



*Diferença significativa comparado ao grupo E; $p \leq 0,05$.

DISCUSSÃO

No presente estudo, observamos que a obesidade, por si só, promoveu aumento na expressão gênica de TNF- α nos indivíduos de meia-idade, provavelmente por conta de um processo inflamatório crônico sistêmico associado ao aumento do tecido adiposo (GLEESON et al., 2011). Entretanto, quando comparamos os grupos obesos diabéticos, que em tese, acreditaríamos um pior status inflamatório decorrente da doença associada, nós não observamos diferença significativa na expressão gênica do TNF- α e também do gene CD27.

Sabe-se que o CD27 é um membro da superfamília de receptores do TNF- α , que regula a função dos linfócitos, principalmente na ativação de células B (GRAVESTAIN et al., 1998). Por outro lado, estudos tem relatado que a expressão aumentada da proteína e do mRNA de CD27 está associada a quadros de linfomas de células B e leucemia/linfoma de células T adultas (SHAO et al., 2010). Nesse sentido, a superexpressão de CD27, como observado em ambos os grupos obesos do presente estudo quando comparados ao grupo eutrófico, pode estar relacionada à uma supercompensação do sistema imunológico devido a exacerbação da secreção sistêmica de TNF- α e outros marcadores de inflamação no tecido adiposo (De LA FUENTE & CASTRO, 2012), sugerindo assim a presença de mais células B-ativadas e menos células B-naive e possível diminuição da eficiência da resposta do sistema imunológico frente a novos episódios infecciosos.

A partir disso, nossos resultados sugerem que a obesidade, por si só, pode promover aumento sistêmico na expressão gênica de marcadores inflamatórios e de imunossenescência, mesmo sem a associação de comorbidades.

Outros resultados interessantes observados no presente estudo foram as correlações significantes entre o IMC e o $VO_{2m\acute{a}x}$ ($r^2 = -0,504$; $p < 0,001$), $VO_{2m\acute{a}x}$ e a expressão gênica de CD27 ($r^2 = -0,517$; $p < 0,001$), IMC e a expressão gênica de CD27 ($r^2 = 0,414$; $p = 0,002$) e entre o CD27 e a massa de gordura ($r^2 = 0,445$; $p = 0,001$). Nota-se que o aumento do tecido adiposo não só está relacionado ao prejuízo na capacidade de locomoção e de realização de esforço físico, como ainda no rendimento do indivíduo frente ao esforço. Adicionalmente, tais correlações reforçam a teoria que o aumento do tecido adiposo leva a uma inflamação crônica sistêmica que está relacionada ao detrimento do sistema imunológico, levando assim a uma imunossenescência e a prejuízos na saúde cardiorrespiratória de indivíduos de meia idade.

Em conclusão, nossos resultados sugerem que a obesidade leva a um aumento na expressão gênica de marcadores relacionados à inflamação e à imunossenescência, independentemente de alguma

comorbidade associada ao aumento de gordura. Adicionalmente, a capacidade cardiorrespiratória parece ser a mais prejudicada pelo aumento da gordura corporal, como observado na comparação dos grupos obesos, com e sem doença, ao eutrófico.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer ao CNPq (bolsa PIBIC – Processo 303571/2018-7) e a FAPESP (Processo 2017/06643-1) pelo apoio financeiro para desenvolvimento da pesquisa. Adicionalmente, agradecemos a todos os voluntários que participaram do presente projeto.

REFERÊNCIAS

ARSENAULT, B.J.; CARTIER, A.; COTE, M.; LEMIEUX, I. Body composition, cardiorespiratory fitness, and low-grade inflammation in middle-aged men and women. **American Journal of Cardiology**, v.104, p. 240–246, 2009.

De LA FUENTE, M.; CASTRO, N.M. Obesity as a model of premature immunosenescence. **Current Immunology Reviews**, v.8,p.63-75, 2012.

FLORINDO, A.F.; LATORRE, M.R.D.O. Validação e reprodutibilidade do questionário de Baecke de avaliação da atividade física habitual em homens adultos. **Rev Bras Med Esporte**, v.9, n.3, 2003.

GIORDANO, A.; MURANO, I.; MONDINI, E.; et al. Obese adipocytes show ultrastructural features of stressed cells and die of pyroptosis. **J Lipid Res**, v.54, p.2423–2436, 2013.

GLEESON, M.; BISHOP, N.C.; STENSEL, D.J.; LINDLEY, M.R.; MASTANA, S.S.; NIMMO, M.A. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. **Nature Reviews Immunology**, v.11, p.607-661, 2011.

1. Gravestein LA, Borst J. Tumor necrosis factor receptor family members in the immune system. *Semin Immunol* 1998; 10: 423–434. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

GUYENET, S.J.; SCHWARTZ, M.W. Regulation of Food Intake, Energy Balance, and Body Fat Mass: Implications for the Pathogenesis and Treatment of Obesity. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.97, p.745–755, 2012.

HUNSCHE, C.; HERNANDEZ, O.; De LA FUENTE, M. Impaired Immune Response in Old Mice Suffering from Obesity and Premature Immunosenescence in Adulthood. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v.71, n.8, 983–991, 2016.

MARTÍN-CORDERO, L.; GARCÍA, J.J.; HINCHADO, M.D.; ORTEGS, E. The interleukin-6 and noradrenaline mediated inflammation-stress feedback mechanism is dysregulated in metabolic syndrome: effect of exercise. **Cardiovasc Diabetol**, v.10, v.42, 2011.

NG, M.; FLEMING, T.; ROBINSON, M. et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease. **The Lancet**, v. 384, n. 9945, p. 766 - 781, 2014.

RACHID, B.; VAN DE SANDE-LEE, S.; RODOVALHO, S.; et al. Distinct regulation of hypothalamic and brown/beige adipose tissue activities in human obesity. **Int J Obes (Lond)**, v.39, n.10, p.1515-22, 2015.

Shao H, Yuan CM, Xi L, Raffeld M, Morris JC, Janik JE et al. Minimal residual disease detection by flow cytometry in adult T-cell leukemia/lymphoma. **Am J Clin Pathol** 2010; 133: 592–601.

SPIELMANN, G.; JOHNSTON, C.A.; O’CONNOR, D.P.; FOREYT, J.P.; SIMPSON, R.J. Excess body mass is associated with T cell differentiation indicative of immune ageing in children. **Clinical and Experimental Immunology**, v.176, n.246–254, 2014.

UKROPEC, J.; PENESOVA, A.; KOPKOVA, M.S.; et al. Adipokine Protein Expression Pattern in Growth Hormone Deficiency Predisposes to the Increased Fat Cell Size and the Whole Body Metabolic Derangements. **J Clin Endocrinol Metab**, v.93, p.2255–2262, 2008.

VIDA, C.; GONZÁLEZ, E.M.; DE LA FUENTE, M. Increase of oxidation and inflammation in nervous and immune systems with aging and anxiety. **Curr Pharm Des**, v.20, p.4656–4678, 2014.