



SÍNDROME METABÓLICA FAVORECE EXPANSÃO DE EOSINÓFILOS ATIVADOS ASSOCIADOS À DESREGULAÇÃO NA PRODUÇÃO DE ADIPOCINAS, CITOCINAS E MARCADOR PLASMÁTICO DE TRANSLOCAÇÃO MICROBIANA INTESTINAL

¹Laryssa Vitoria Florencio De Azeredo (IC-UNIRIO), ^{1,2}Hugo A A Oyamada (doutorado-CAPES), ^{1,3}Rafaela Bilhão (mestrado-CAPES), ^{1,3}Júlio César C da Silva (mestrado-CAPES), ⁴Luiz Claudio A Knoedler Júnior (IC-UNIRIO), ⁴Brenda S Alves (IC-UNIRIO), ^{1,2}Ana Clara R Percegoni (mestrado-CAPES), ⁴Márcia Helena S Costa, ¹Priscila M Sacramento (pós-doutorado-FAPERJ), ^{1,3}Hilary Cesário Gonçalves (mestrado-CAPES/coorientadora), ^{1,2,3}Cleonice Alves de Melo Bento (orientadora).

- 1- Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro
- 2- Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro
- 3- Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro
- 4- Hospital Universitário Gaffrée e Guinle, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Apoio financeiro: UNIRIO, FAPERJ, CNPq, CAPES.

Palavras-chave: Síndrome metabólica, eosinófilos, células T, adipocinas, citocinas, LBP.

INTRODUÇÃO: A síndrome metabólica (SMet) é a denominação dada a um conjunto de sintomas clínicos, intimamente relacionados a disfunções metabólicas e à ocorrência de doenças graves, incluindo doenças cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2, doença hepática gordurosa não-alcoólica e câncer (Shin *et al.*, 2013). A condição é identificada através da combinação de dislipidemia, hiperglicemia e aumento da circunferência abdominal e da pressão arterial. Devido a íntima conexão entre dislipidemia e resistência à insulina, a SMet é frequentemente associada à obesidade visceral (Engin, 2017), condição essa que afeta cerca de 19% da população mundial (Lin & Li, 2021). Ainda não há dados globais quanto à prevalência da SMet, porém estima-se que mais de 25% da população mundial seja afetada com esses distúrbios metabólicos (Fahed *et al.*, 2022). Apesar da escassez de estudos sobre os efeitos fisiopatológicos da SMet, evidências têm demonstrado que a expansão do tecido adiposo, por exercer efeitos adversos no sistema imune, aumenta o risco de doenças infecciosas e o desenvolvimento de reações de hipersensibilidades (Gorgievska-Sukarovska *et al.*, 2008; Versini *et al.*, 2014). No contexto da imunidade inata, por exemplo, pacientes com SMet apresentam maior porcentagem de monócitos circulantes do tipo M1, que têm sido associados à resistência à insulina (Jialal *et al.*, 2012a; Jialal *et al.*, 2012b). Apesar de elevados números de neutrófilos e eosinófilos terem sido observados nos pacientes com SMet (Kaur *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2019; Moussa *et al.*, 2019), o *status* funcional dessas células ainda não foi investigado, nem tão pouco a relação desses granulócitos com o perfil de citocinas. Eosinófilos amplificam a produção de diferentes citocinas pelas células T CD4⁺ ativadas por mitógenos (Harfi *et al.*, 2013; revisado por Gurtner *et al.*, 2023). Esse papel modulador na imunidade específica deve depender da capacidade desses granulócitos em produzirem citocinas, tais como IL-5 e GM-CSF, como também de expressarem marcadores de ativação (CD69) e migração (CD62L e CCR3) para locais de inflamação (Lamkhieued *et al.*, 2003; Bui *et al.*, 2024). Se a expansão de subtipos de eosinófilos ativados é observada na SMet, e se sua presença está relacionada a distúrbios na rede de adipocinas e citocinas ainda são questões não investigadas. Ainda, a relação entre a presença de eosinófilos ativados e meta-inflamação pode estar ligada a dois eventos interligados, elevada expressão de receptores do tipo toll-4 (TLR-4, do inglês toll-like receptors) associada a translocação microbiana intestinal. De fato, disbiose intestinal tem sido associada à obesidade e a SMet (Carrizales-Sánchez, *et al.*, 2021; Breton, *et al.*, 2022). Essa perturbação no ecossistema intestinal, com incremento de bactérias promotoras de inflamação, pode ser indiretamente inferida através da dosagem plasmática da proteína que liga o lipopolissacarídeo (LPS), ou LBP (do inglês LPS-binding protein) (Shantaram, *et al.*, 2024; Wang, *et al.*, 2024).

OBJETIVO: Avaliar a influência da SMet na porcentagem de granulócitos e sua relação com os níveis plasmáticos de adipocinas e LPB, bem como no perfil de citocinas circulantes e produzidas pelas células T.

METODOLOGIA: Para o estudo, indivíduos obesos sem ($n=11$) e com ($n=14$) síndrome metabólica (SMet) foram recrutados do serviço de endocrinologia e metabologia do HUGG. Um terceiro grupo de 7 indivíduos, todos eutróficos, foi selecionado para o estudo. O índice de massa corpórea (IMC) foi usado para classificação de eutrofia e obesidade, e os critérios da IDF (*International Diabetes Foundation*) foram utilizados para identificação da síndrome metabólica. Foram excluídos pacientes tabagistas, com neoplasias, que possuíam doenças autoimunes, que estavam em uso de anti-inflamatório/antibiótico na última semana e pacientes gestantes e lactantes. Esse estudo foi aprovado pelo comitê de ética da HUGG e as amostras dos indivíduos só foram coletadas após a obtenção do consentimento oral e escrito, através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Para obtenção dos granulócitos circulantes, 4 mL de sangue periférico foram coletados em tubos com EDTA e submetidos à seleção negativa, usando colunas magnéticas e o kit de purificação “EasySep Direct Human Pan-Granulocyte Isolation Kit” (StemCell). Após a purificação, procedeu-se a marcação dessas células com anticorpos monoclonais (anti-CD45 – eFluor 506, anti-CD14 – APCeFluor 780, anti-CD66b – APC, anti-CD16 – FITC, anti-CD62L – PERCP-eFluor 710, anti-CD69 – eFluor 450, anti-CD193 (CCR3) - PE). Após o tempo de incubação e lavagens, as células foram analisadas usando o citômetro Attune NxT (Applied Biosystems LifeTech). Para analisar a modulação da SMet na produção de citocinas por células T, células mononucleares do sangue periférico foram obtidas após centrifugação do sangue total coletado em tubo de heparina, previamente diluído em solução de Hank (1:1, v/v), em gradiente de densidade Ficoll-PAQUE PLUS (Cytiva). O plasma foi obtido a partir da centrifugação do tubo de sangue e congelado para posterior quantificação de citocinas, adipocinas e LBP. As concentrações plasmáticas de adipocinas (leptina e adiponectina) e LBP foram realizadas por meio da técnica de ELISA, utilizando os kits *Leptin ELISA* (BD, Pharmingen, San Diego, CA), *Adiponectin ELISA* (BD, Pharmingen, San Diego, CA) e *Human LBP* (InvitroGen, San Diego, CA, USA). Os níveis de diferentes citocinas circulantes e nos sobrenadantes das culturas foram determinados via *Luminex* usando o kit “Th1/Th2/Th9/Th17/Th22/Treg Cytokine 18-plex human Panel” (InvitroGen, San Diego, CA, USA). Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa de gráfico *GraphPad Prism* versão 9.0 para Windows, onde foram realizados o teste de normalidade nas amostras e os testes seguintes ideais para cada tipo de amostra (paramétrico e não-paramétrico). As correlações entre variáveis paramétricas e não paramétricas foram investigadas por meio das correlações de Pearson e Spearman, respectivamente. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

RESULTADOS: No presente estudo, indivíduos com SMet apresentaram maior frequência de neutrófilos, com menor expressão de CCR3. Esses pacientes apresentaram menor frequência de neutrófilos CD69-CD62L⁻ quando comparado aos indivíduos eutróficos e obesos. Quanto à porcentagem de eosinófilos, indivíduos com SMet apresentaram menor frequência total desse granulócito, porém com maior porcentagem de eosinófilos que expressam CCR3, CD69⁺CD62L⁺. Indivíduos obesos e indivíduos com SMet apresentaram maiores níveis circulantes de leptina e menores níveis de adiponectina que os indivíduos eutróficos. Ainda com relação às adipocinas, indivíduos com SMet apresentaram menores níveis de adiponectina que os indivíduos obesos. Indivíduos com SMet com maiores frequências de eosinófilos CCR3⁺, CD69⁺ e CD69⁺CD62L⁺ apresentavam maiores níveis de leptina e menores níveis circulantes de adiponectina. Quanto à concentração plasmática de citocinas, comparado ao grupo controle, indivíduos obesos e com SMet apresentaram maiores níveis circulantes de IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-17, GM-CSF e da citocina anti-inflamatória IL-10. Ainda, níveis plasmáticos de IFN- γ e de IL-5 foram maiores em indivíduos com SMet que no grupo controle. O grupo com SMet apresentou maiores níveis plasmáticos de TNF- α , IL-5 e IL-17 que os indivíduos obesos. Indivíduos obesos com maiores níveis circulantes de IL-1 β e indivíduos com SMet com maiores níveis plasmáticos de IL-6, IL-5 e IL-17 eram os que possuíam maiores níveis de leptina. Indivíduos com SMet com maiores níveis de IL-6 eram os que possuem menores níveis de adiponectina. Nos pacientes com SMet, a frequência de eosinófilos CCR3⁺ e CD69⁺CD62L⁺ foi diretamente correlacionada a dosagem plasmática de IL-6, GM-CSF, IL-5 e IL-17. Células T ativadas de indivíduos obesos e com SMet apresentaram maior produção de IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-5 e IL-13, e menor produção de IFN- γ e de IL-10 que os indivíduos eutróficos. Maior produção *in vitro* de GM-CSF e de IL-17 foi observado no grupo com SMet se comparado aos eutróficos. As células de indivíduos com distúrbios metabólicos produziram

maiores níveis de IL-1 β , IL-6, GM-CSF, IL-5 e IL-17 e menor secreção de IFN- γ que as células de indivíduos obesos. Quanto às adipocinas, a produção *in vitro* de IL-6 e IL-17 pelas células T dos indivíduos com SMet foi diretamente correlacionada com leptina, mas inversamente correlacionada com adiponectina. Ainda, hiperleptinemia correlacionou-se positivamente com a produção de GM-CSF e IL-5 pelas células T de pacientes com SMet. Indivíduos com SMet com maior frequência de eosinófilos CCR3⁺ e CD69⁺CD62L⁺ foram os que apresentaram maior produção de *in vitro* IL-1 β , IL-6, IL-5 e IL-17, e, esses indivíduos com maior porcentagem de eosinófilos CD69⁺CD62L⁺ tiveram maior produção de GM-CSF. De forma interessante, indivíduos com SMet apresentaram maiores níveis circulantes de LBP que os obesos. Na SMet, LBP correlacionou-se diretamente com a porcentagem de eosinófilos CCR3⁺, CD69⁺CD62L⁻ e CD69⁺CD62L⁺, assim como com os níveis circulantes de IL-1 β , IL-6 e IL-5 e, *in vitro*, de IL-5, IL-6 e IL-17.

CONCLUSÕES: No presente estudo, a Síndrome Metabólica favorece a expansão de eosinófilos ativados e com maior habilidade de migrar para sítios inflamatórios. A correlação positiva entre esses granulócitos com leptina e negativa com adiponectina fortalece a ideia de que desequilíbrio na produção de adipocinas que acompanha, muitas vezes, distúrbios metabólicos, pode ser um dos eventos envolvidos no aumento de eosinófilos ativados com maior capacidade de migração. Esse incremento na fração de eosinófilos ativados, associado a maiores níveis circulantes de LBP em indivíduos com SMet, pode estar relacionado com translocação microbiana, aumento sérico de LPS e estimulação desses granulócitos, via TLR-4. Apesar de não ter sido avaliado a produção de citocinas pelos granulócitos, os resultados sugerem uma maior produção de citocinas relacionadas aos fenótipos Th2 e Th17, observada principalmente no grupo com SMet, e sua correlação positiva os níveis plasmáticos de leptina, LBP e eosinófilos ativados, o que revela uma complexa interação multisistêmica envolvida na meta-inflamação e, consequentemente, resistência à insulina. Diante da diversidade funcional dos eosinófilos, estudos futuros precisam mapear melhor o papel dessas células na SMet, já que diversos autores têm sugerido um efeito protetor desse granulócito no contexto da inflamação associada à obesidade.

REFERÊNCIAS:

- BRETON J, *et al.* Dysbiotic gut bacteria in obesity: an overview of the metabolic mechanisms and therapeutic perspectives of next-generation probiotics. *Microorganisms*, v. 10, n. 2, p. 452, 2022.
- BUI DV, *et al.* CD69 Signaling in Eosinophils Induces IL-10 Production and Apoptosis via the Erk1/2 and JNK Pathways, Respectively. *Biomolecules*. 2024 Mar 18;14(3):360.
- CARRIZALES-SÁNCHEZ AK, *et al.* Gut microbiota associations with metabolic syndrome and relevance of its study in pediatric subjects. *Gut microbes*, v. 13, n. 1, p. 1960135, 2021.
- ENGİN A. The Definition and Prevalence of Obesity and Metabolic Syndrome. *Adv Exp Med Biol*, 2017;960:1-17.
- FAHED G, *et al.* Metabolic Syndrome: Updates on Pathophysiology and Management in 2021. *Int J Mol Sci*, 2022 Jan 12;23(2):786.
- GORGIEVSKA-SUKAROVSKA B, *et al.* Obesity and allergic diseases. *Acta Dermatovenol Croat*, 2008;16(4):231-5.
- GURTNER A, *et al.* Emerging functions of tissue-resident eosinophils. *Journal of Experimental Medicine*, v. 220, n. 7, p. e20221435, 2023.
- HARFI I, *et al.* Eosinophils affect functions of in vitro-activated human CD3-CD4⁺ T cells. *Journal of translational medicine*, v. 11, p. 1-7, 2013.
- JIALAL I, *et al.* Increased cellular and circulating biomarkers of oxidative stress in nascent metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:E1844–E1850.
- JIALAL I, *et al.* Increased toll-like receptor activity in patients with metabolic syndrome. *Diabetes Care* 2012;35:900–904.
- KAUR H, *et al.* Increased neutrophil count in nascent metabolic syndrome. *Metab Syndr Relat Disord*, 2013 Apr;11(2):128-31.
- LAMKHIQED B, *et al.* The CCR3 receptor is involved in eosinophil differentiation and is up-regulated by Th2 cytokines in CD34⁺ progenitor cells. *J Immunol*. 2003 Jan 1;170(1):537-47.
- LIN X, Li H. Obesity: Epidemiology, Pathophysiology, and Therapeutics. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2021 Sep 6;12:706978.
- LIU CC, *et al.* Neutrophil-to-lymphocyte ratio as a predictive marker of metabolic syndrome. *Medicine (Baltimore)*, 2019 Oct;98(43):e17537.
- MOUSSA K, *et al.* Increased eosinophils in adipose tissue of metabolic syndrome. *J Diabetes Complications*, 2019 Aug;33(8):535-538.
- SHANTARAM D, *et al.* Obesity-associated microbiomes instigate visceral adipose tissue inflammation by recruitment of distinct neutrophils. *Nat Commun* 15, 5434 (2024)
- SHIN JA, *et al.* Metabolic syndrome as a predictor of type 2 diabetes, and its clinical interpretations and usefulness. *J Diabetes Investig*, 2013 Jul 8;4(4):334-43.
- VERSINI M, *et al.* Obesity in autoimmune diseases: not a passive bystander. *Autoimmun Rev*, 2014 Sep;13(9):981-1000.
- WANG K, *et al.* The Effect of Enteric-Derived Lipopolysaccharides on Obesity. *Int. J. Mol. Sci.* 2024, 25, 4305.