

Maria da Conceição Simões Rodrigues Magalhães

**Activação Leucocitária em Crianças e Adolescentes  
Obesas  
Correlação com o Índice de Obesidade**

**Faculdade de Farmácia  
Universidade do Porto  
2008**

Dissertação de candidatura ao grau de Mestre  
em Análises Clínicas  
pela Faculdade de Farmácia  
da Universidade do Porto

**Orientadora:** Professora Doutora Alice Santos Silva

**Co-orientador:** Professor Doutor Luís Belo

Este trabalho foi efectuado no  
Serviço de Bioquímica da  
Faculdade de Farmácia da  
Universidade do Porto

Ao Licínio

Às minhas filhas Adriana e Beatriz

## **AGRADECIMENTOS**

À Professora Doutora Alice Santos agradeço a sua orientação científica, o seu estímulo, o tempo dispensado na apreciação, correcção e discussão deste trabalho e pela prova de amizade que revelou.

Ao Professor Doutor Luís Amado Belo, pela inestimável ajuda na elaboração deste trabalho, nomeadamente na apreciação dos dados estatísticos e pelo seu interesse no sucesso deste trabalho.

À Dra. Susana Coimbra, pela sua disponibilidade na ajuda prestada à execução da Técnica laboratorial, nomeadamente procedimentos da metodologia Elisa.

Ao Dr. Henrique Ferrão pela ajuda na execução da técnica de Elisa, recolha seriação e conservação do material biológico e obtenção dos dados necessários ao desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Susana Rocha pela sua presença constante, atenção e ajuda na elaboração deste trabalho.

À Professora Doutora Isaura Pinto de Sousa pela oportunidade, interesse e apoio dado ao longo de toda a minha carreira.

À Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto por me ter facultado o laboratório de Bioquímica para elaboração do trabalho.

À Dra. Helena Ferreira Mansilha do Serviço de Pediatria do Hospital Pediátrico Maria Pia, agradeço as amostras facultadas e respectiva documentação sem as quais este trabalho não teria sido possível.

À Dra. Carla Rego do Serviço de Pediatria do Hospital de S. João do Porto pela disponibilização das amostras e dados clínicos para a realização deste trabalho.

Quero ainda agradecer à D. Casimira Vieira pela sua ajuda na disponibilização dos laboratórios sempre que solicitados.

Por último, quero agradecer de modo especial ao meu marido pelo seu apoio e paciência e às minhas filhas pela compreensão pela minha ausência, durante este período, em que tantas vezes estive longe das suas necessidades.

Quero também agradecer à minha família mais próxima por me ter substituído em algumas tarefas, necessárias ao bom equilíbrio da minha vida familiar.

## Resumo

A prevalência de excesso de peso e obesidade tem vindo a aumentar na União Europeia, nomeadamente em Portugal, afectando cada vez mais crianças e adolescentes. De facto, a obesidade apresenta-se actualmente como um dos mais sérios problemas de Saúde Pública. A obesidade tem sido descrita como um estado inflamatório de baixa intensidade, sendo este um assunto de particular importância sob o ponto de vista clínico. Na verdade, a associação entre obesidade, doença cardiovascular e diabetes *mellitus* tipo 2, tem sido objecto de vários estudos, tendo sido apontado a reacção inflamatória como factor comum a estas doenças.

O objectivo deste estudo foi o de avaliar a relação entre obesidade e marcadores inflamatórios relacionados com leucócitos (contagem total e diferencial de glóbulos brancos e avaliação dos marcadores de activação neutrofílica, elastase e mieloperoxidase) através da realização de um estudo transversal, e ainda mediante a realização de um estudo longitudinal, procurar encontrar uma relação favorável entre redução de índice de massa corporal (IMC) Z-score e diminuição das variáveis inflamatórias estudadas.

No estudo transversal, efectuou-se não só a comparação das diferentes variáveis entre crianças/adolescentes obesos (n=65) e controlos (n=14), mas também o estudo das variáveis em função do grau de obesidade. Para esse efeito, definiram-se três subgrupos, com diferentes graus de obesidade, de acordo com o valor de IMC Z-Score: IMC Z-Score < 2, IMC Z-Score entre 2 e 2,5 e IMC Z-Score > 2,5. Todos os participantes do estudo transversal foram motivados para mudar o seu estilo de vida; 47 dos participantes foram seleccionados para o estudo longitudinal. Após o período de aproximadamente um ano, durante o qual as crianças foram aconselhadas a implementar hábitos de vida saudáveis (que incluiu a instituição de uma dieta não restritiva e a prática de exercício físico), realizou-se nova colheita de sangue para avaliação dos mesmos parâmetros clínicos e hematológicos. Em 11 participantes observou-se uma redução substancial do IMC Z-Score (valor de *cut-off* de 0,3) e em 36 não se observou essa redução.

Comparando o grupo controlo com o grupo de obesos (estudo transversal) observou-se uma associação entre obesidade e aumento na percentagem de neutrófilos. Verificou-se também um aumento, embora não estatisticamente significativo, quer do valor de elastase, quer da concentração de elastase por neutrófilo, o que sugere a existência de uma relação positiva entre obesidade, inflamação, neutrofilia e desgranulação. Verificou-se, ainda, que os linfócitos apresentavam um valor relativo e absoluto significativamente mais baixo nos obesos.

Nos três subgrupos de obesidade crescente não se observaram diferenças estatisticamente significativas, embora se tenha verificado uma tendência para o aumento da concentração de neutrófilos, linfócitos e de monócitos. Nos valores de elastase e de

mieloperoxidase, não se observaram diferenças significativas; no entanto é de destacar que o grupo de obesidade mais elevada, apresenta as concentrações mais altas destes produtos de activação neutrofílica.

No estudo longitudinal observou-se que nos dois grupos, ocorreu uma redução na concentração de leucócitos totais e de linfócitos, sendo estas variações mais acentuadas para o grupo com redução de IMC Z-Score. Observou-se ainda neste grupo uma diminuição, embora ligeira, na concentração de elastase, não observada no grupo sem redução de IMC Z-Score.

Em síntese, a obesidade infantil parece estar associada a um aumento no valor de leucócitos e de neutrófilos, sugerindo que estes possam contribuir para o processo inflamatório associado à obesidade. Quanto aos marcadores de activação neutrofílica, o estudo revelou uma tendência para uma associação positiva entre obesidade e aumento do nível plasmático de elastase.

O trabalho apresentado sugere que é importante alargar este estudo a um grupo maior de crianças obesas, a fim de clarificar a importância das modificações leucocitárias observadas, como marcadores precoces do processo inflamatório na obesidade.

## Abstract

The prevalence of overweight and obesity has increased in European Union, namely in Portugal, especially in children and adolescents. Indeed, obesity is one of the most serious health problems nowadays. Obesity is a low-grade inflammatory state that could be particularly important in clinical practice. Actually the association between obesity, cardiovascular disease and diabetes mellitus type 2, may have inflammation as the common link between them, as pointed by several studies.

The aim of this study was to evaluate the relation between obesity and leukocyte inflammatory markers (total and differential leukocyte count; evaluation of plasmatic elastase and mieloperoxidase, as markers of leukocyte activation), by performing a cross-sectional study, and to search for a relation between a reduction in body mass index z-score and the proposed inflammatory markers, by performing a longitudinal study.

In the cross-sectional study, obese (n=65) and control (n=14) children/adolescents were compared, and analysed according to the severity of obesity. To achieve this, 3 subgroups were defined according to BMI Z-Score values: BMI Z-Score < 2, BMI Z-Score between 2 and 2,5 and with BMI Z-Score > 2,5. All participants in the cross-sectional study were motivated to modify their lifestyle habits; for the longitudinal study only 47 were selected. After about one year, during which children were motivated to improve their lifestyle (non restrictive diet and physical exercise practice), a new blood collection was performed to evaluate the same haematological and clinical parameters. Eleven participants achieved a substantial reduction in BMI Z-Score (*cut-off* of 0.3) and 36 failed to achieve such reduction.

Comparing control and obesity groups (cross-sectional study), it was observed an association between obesity and the rise in neutrophil percentage. A trend to higher levels of elastase was also observed in the obese group, suggesting a positive relation between obesity, inflammation, neutrophil count and activation. Moreover, lymphocyte count (total and percentage) was significantly lower in the obese group.

When assessing the degree of obesity, it was found a trend to higher values of neutrophils, lymphocytes and monocytes, with increasing BMI Z-Score. No significant differences were found for elastase and mieloperoxidase, even though neutrophil activation products were higher in the highest BMI Z-Score group.

In the longitudinal study, both groups presented a statistically significant reduction in total leukocytes and in lymphocyte count, being these changes more pronounced in the group that presented reduction in the BMI Z-Score. Moreover, in this group, a slight reduction was observed in elastase concentration, not observed in the group without reduction in BMI Z-Score.

In summary, children and adolescent obesity seem to be associated with an increase in leukocyte and neutrophil count, suggesting that these cells may contribute to the

inflammatory process of obesity. Regarding neutrophil activation products, a trend to a positive association between obesity and the rise in elastase was found.

This work suggests that it would be important to enlarge this study by increasing the number of participants, in order to clarify the importance of the observed leukocyte modifications, as premature markers of the inflammatory process in obesity.

## Abreviaturas

AAT	$\alpha$ 1- Antitripsina
ABCA1	ATP binding cassette subfamily A
Apo A-1	Apolipoproteína A-1
CR1	Receptor 1 do Complemento
DCV	Doença cardiovascular
fMLP	Formylmetyonil-leucyl fenilalanina
HDL	Hight density lipoprotein(Lipoproteína de elevada densidade)
HOCL	Ácido hipocloroso
IL-6	Interleuquina-6
IMC	Índice de massa corporal
LDL	Low density lipoprotein(Lipoproteína de baixa densidade)
MPO	Mieloperoxidase
NO	Óxido nítrico
NO <sub>2</sub>	Nitrito
PCR	Proteína C reactiva
PMN	Leucócitos polimorfonucleares
TNF- $\alpha$	Factor de necrose tumoral
WTHR	Waist to height ratio

# ÍNDICE

## PARTE I – INTRODUÇÃO

### Secção Um: Inflamação e neutrófilos

<b>1. Neutrófilos</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Granulações dos neutrófilos</b> .....	<b>2</b>
<b>1.2 Elastase e Mieloperoxidase como marcadores inflamatórios</b> .....	<b>3</b>
1.1.1 Mieloperoxidase.....	3
1.1.2 Elastase.....	5

### Secção Dois: Obesidade

<b>2. Introdução</b> .....	<b>7</b>
<b>3. Tipos de obesidade</b> .....	<b>8</b>
<b>4. Parâmetros clínicos que definem Obesidade</b> .....	<b>9</b>
4.1 Índice de Massa Corporal.....	9
4.2 Perímetro abdominal.....	11
4.3 Razão cintura-estatura .....	11
4.4 Relação anca/cintura .....	12
<b>5. O Tecido adiposo como órgão endócrino</b> .....	<b>12</b>
<b>6. Complicações associadas com obesidade</b> .....	<b>14</b>
6.1 Resistência à insulina .....	14
6.2 Dislipidémias em crianças obesas .....	15
6.3 Inflamação .....	16
6.4 Neutrófilos e obesidade .....	17

## **PARTE II. PROJECTO DE INVESTIGAÇÃO**

### **ACTIVAÇÃO LEUCOCITÁRIA E OBESIDADE**

<b>Objectivos</b> .....	<b>19</b>
<b>Material e Métodos</b> .....	<b>20</b>
<b>1- Amostragem e Protocolo Experimental</b> .....	<b>20</b>
1.1- População estudada .....	<b>20</b>
1.2- Colheita de sangue .....	<b>21</b>
<b>a)– ELASTASE</b> .....	<b>21</b>
<b>b)– MIELOPEROXIDASE</b> .....	<b>23</b>
<b>2- Análise Estatística</b> .....	<b>23</b>
2.1- Estudo transversal .....	<b>24</b>
2.2- Estudo longitudinal .....	<b>24</b>
<b>3- Resultados</b> .....	<b>25</b>
3.1- Estudo transversal .....	<b>25</b>
3.2- Estudo transversal de acordo com a severidade da obesidade.....	<b>27</b>
3.2- Estudo longitudinal .....	<b>29</b>
<b>4- Discussão dos resultados</b> .....	<b>33</b>
<b>PARTE III- Referências Bibliográficas</b> .....	<b>37</b>