

## 4.05.01 - Nutrição / Bioquímica da Nutrição

**RESTRIÇÃO CALÓRICA ALTERA CONTAGEM DE LINFÓCITOS EM RATOS WISTAR MACHOS OBESOS**

Lauren de Oliveira Machado<sup>1,5\*</sup>, Jaíne Borges dos Santos<sup>2,5</sup>, Andrea Cristiani Beuren<sup>2,5</sup>, Matias Nunes Frizzo<sup>3,5</sup>, Thiago Gomes Heck<sup>3,5</sup>, Mirna Stela Ludwig<sup>4,5</sup>

<sup>1</sup> Acadêmica de Farmácia da UNIJUÍ. Bolsista PIBIC-CNPq. Grupo de Pesquisa em Fisiologia- GPeF.

<sup>2</sup> Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral a Saúde (PPGAIS)UNIJUÍ/UNICRUZ.

<sup>3</sup> Docente do Departamento de Ciências da Vida – DCVida UNIJUÍ. Grupo de Pesquisa em Fisiologia- GPeF

<sup>4</sup> Docente do Departamento de Ciências da Vida – DCVida UNIJUÍ. Grupo de Pesquisa em Fisiologia- GPeF / ORIENTADORA

<sup>5</sup> Grupo de Pesquisa em Fisiologia- GPeF.

**Resumo**

A obesidade é um dos principais fatores de risco para complicações sendo que, a manutenção do peso corporal pode causar efeitos nos parâmetros fisiológicos e moleculares. Nesse contexto, considerando que ainda existem questões a serem esclarecidas acerca dos regimes alimentares, a exemplo das mudanças hematológicas impostas pelos mesmos, o objetivo desse trabalho é avaliar os efeitos de diferentes regimes alimentares sobre parâmetros hematológicos de ratos Wistar obesos. Para isso, foi realizado um estudo experimental *in vivo* com 32 ratos wistar machos submetidos a diferentes regimes alimentares durante 3 etapas desenvolvidas ao longo de 18 semanas, analisando os dados hematológicos e estatísticos ao final da pesquisa. Os resultados demonstraram que somente a restrição calórica contínua foi capaz de diminuir o *status* inflamatório, promovendo ativação do sistema imune pela elevação de linfócitos circulantes.

**Autorização legal:** CEUA N. 005/19 (07/06/2019).

**Palavras-chave:** células sanguíneas, estilo de vida, dieta

**Apoio financeiro:** CNPq – Bolsa de Iniciação Científica

**Trabalho selecionado para a JNIC:** UNIJUÍ

**Introdução**

A obesidade é uma doença crônica não transmissível, que apresenta elevada prevalência no século XXI (KUSHNER, 2018). É um fator de risco importante para doenças cardiovasculares, distúrbios neurológicos e diabetes (LIAO, *et al*, 2020) sendo associada ao acúmulo de adipócitos e gordura visceral (DE OLIVEIRA, *et al*, 2017). Alterações relacionadas à obesidade dificultam os processos fisiológicos, podendo comprometer o sistema imunológico, causar anemia e distúrbios metabólicos, além de atrasar a cicatrização de feridas (HAJAM, RAI, 2020).

Os danos ocasionados pela obesidade podem ser diminuídos através da perda de peso, entretanto, sustentar o peso perdido é considerado algo difícil (ABESO, 2016). A manutenção da perda do peso corporal pode causar efeitos benéficos nos parâmetros fisiológicos e moleculares (ROUMANS, *et al*, 2016). Estudos em humanos e animais sugerem que o jejum intermitente poderia ser mais eficiente, comparado a restrição calórica contínua, no que diz respeito a várias condições benéficas de saúde, como a ativação de células do sistema imunológico, dentre as quais estão os linfócitos (SEIMON, *et al*, 2016). Contudo, apesar da série de estudos já desenvolvidos acerca dos regimes alimentares, existem questões a serem esclarecidas, como as relativas às mudanças nos parâmetros hematológicos impostas por diferentes regimes alimentares. Portanto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos de diferentes regimes alimentares sobre parâmetros hematológicos de ratos *Wistar* obesos.

**Metodologia**

Estudo experimental e *in vivo*, utilizando 32 ratos *Wistar* (*Rattus norvegicus albinus*) machos, com três a quatro semanas de idade, provenientes e mantidos no biotério da UNIJUÍ em caixas forradas com maravalha, sob iluminação artificial com ciclos claro-escuro de 12 horas, em temperatura ambiente a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , umidade relativa de 50-60% e livre acesso à água. O delineamento experimental realizou-se ao longo de 3 etapas desenvolvidas em 18 semanas.

Etapas:

Etapa 1: Regime alimentar para ganho de peso: 32 ratos *Wistar* machos submetidos a oito semanas de dieta hiperlipídica (*High fat diet* - HDL) *ad libitum*. Etapa 2: Regimes alimentares para perda de peso, por 6 semanas. Subdivisão em grupos: **HFD** (dieta com ração hiperlipídica *ad libitum*, n=8); **HFD-JDA** (dieta com ração hiperlipídica com jejum de dias alternados, n = 9); **HDL-RC** (dieta com ração hiperlipídica com restrição calórica contínua, n=9); **HFD-DP** (dieta com ração padrão para animais de laboratório *ad libitum*, n=6). Etapa 3: Regime alimentar para reganho de peso, por 4 semanas: todos grupos recebem dieta com ração hiperlipídica *ad libitum*.

Dietas

**Dieta Hiperlipídica (*High fat diet* - HDL):** constituída à base de banha de porco, com energia metabolizável total de 22,8 MJ/kg, sendo composta de 58,3% de gorduras, 24,5% de carboidratos e 17,2% de proteínas (WINZELL; AHREN, 2004). **Restrição Calórica Contínua (RC):** regime alimentar no qual os animais (grupo HDL-RC) receberam dieta a base de ração hiperlipídica, porém, a oferta de alimento foi 30% menor do que a quantidade (em gramas) oferecida ao grupo controle (HDL) (RIBEIRO et al., 2009; COLMAN et al., 2014; SEIMON et al., 2016). **Regime alimentar de Jejum Intermitente:** Seguiu conforme o modelo de Jejum de Dias Alternados (*Alternate Day Fasting -JDA*), semelhante ao aplicado em estudos anteriores utilizando modelos animais (HIGASHIDA et al., 2013; GOTTHARDT et al., 2016; GOTTHARDT; BELLO, 2017; JOSLIN; BELL; SWOAP, 2017). A oferta da ração hiperlipídica aos animais (grupo DHL-JDA) foi totalmente restrita por 24 horas, alternada por 24 horas de oferta *ad libitum* da mesma. **Regime alimentar de Dieta Padrão (DP):** dieta com ração padrão normal utilizada para consumo dos ratos do biotério da UNIJUÍ, que foi aplicada aos animais do grupo DP-AL, em oferta *ad libitum*. É constituída de ração Nuvilab CR-1, obtida comercialmente da Nuvital Nutrientes SA., com energia metabolizável total de 16,6 MJ/kg, sendo composta por 11,4% de gordura, 62,8% de carboidratos e 25,8% de proteínas e consistindo de proteína bruta, material mineral, matéria fibrosa e minerais.

**Hemograma:** o sangue coletado foi acondicionado em tubo anticoagulante (EDTA) para determinação dos parâmetros hematológicos (5 µl de EDTA/500 µl de sangue). Para a determinação automatizada foi utilizado o analisador hematológico Micros 60 (Horiba), seguindo as recomendações do fabricante.

### Resultados e Discussão

Sabe-se que a principal função do sistema imunológico é manter o sistema de defesa do nosso organismo em equilíbrio, garantindo a homeostase. A ativação do sistema imunológico está associada ao aumento circulante de células de defesa, como os linfócitos. Em nosso estudo observamos que o regime de restrição calórica contínua (grupo HDL-RC) causou aumento da população de linfócitos circulantes, comparativamente aos animais alimentados com dieta hiperlipídica (DHL), bem como em relação aos animais submetidos ao regime alimentar de jejum de dia alternado (HDL-JDA). Já foi demonstrado anteriormente que a ingestão de calorias afeta o equilíbrio da auto-renovação e diferenciação de células-tronco hematopoéticas. Estudos experimentais em camundongos mostram que a restrição alimentar ao longo da vida diminui a senescência hematopoética e evita o envelhecimento em células-tronco hematopoéticas favorecendo sua sobrevivência e capacidade de defesa do organismo (CHEN; ASTLE; HARRISON, 2003). É possível que o desequilíbrio das células imunes seja o princípio do desenvolvimento da inflamação local e sistêmica relacionada à obesidade. A inflamação do tecido adiposo é observada não apenas durante o ganho de peso e acúmulo de gordura, mas também no caso de perda de peso, sugerindo que alterações rápidas ou extremas da gordura corporal podem desencadear uma resposta imune capaz de promover melhorias metabólicas e do sistema imunológico (MAURIZI, et al, 2017), como é percebido através do aumento de linfócitos no grupo HFD + RC deste estudo.

A razão neutrófilo/linfócito (RNL) é um parâmetro utilizado para análise do estado inflamatório (FORGET, et al, 2017). Em nosso estudo observamos que apenas o regime alimentar de restrição calórica contínua foi capaz de reduzir RNL em relação aos animais mantidos controle (DHL), diferenciando-se, inclusive, do grupo de animais tratados com regime alimentar de jejum de dia alternado (HDL – JDA). Um aumento no número de neutrófilos circulantes pode ser associado ao desenvolvimento de eventos cardiovasculares e eventual morbidade (MAURIZI, et al, 2017).

**Tabela 1 – Parâmetros hematológicos de ratos Wistar obesos submetidos a diferentes regimes alimentares**

Parâmetro	HFD	HFD+JDA	HFD+RC	HFD+DP	Valor P
Hemácias (10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	4,1± 0,4	4,3± 0,4	4,5± 0,4	4,2± 0,2	0,1231
Leucócitos totais (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	4125 ± 1176	4367 ± 1455	5800 ± 1749	4100 ± 1149	0,0652
Linfócitos (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	2850 ± 740	3185 ± 1043	4777 ± 1358*	3315± 947	0,0040
Neutrófilos (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	1078± 462	982± 395	754 ± 390	605± 372	0,1359
Monócitos (células /mm <sup>3</sup> )	198± 69	191± 93	237± 100	158± 58	0,3518
Eosinófilos (células /mm <sup>3</sup> )	0,000	10 ± 21	32± 39	23± 41	0,1540
Basófilos (células /mm <sup>3</sup> )	0	0	0	0	-----
Plaquetas (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	372±72	4212± 46	427± 25	407± 36	0,1033
Hemoglobina (Hb) (g/dL)	7,56± 0,5	7,91±0,5	8,10±0,7	7,53±0,1	0,1225
Hematócrito (%)	21,38± 2,9	22,54±2,5	22,40± 1,8	20,48± 0,5	0,2845
Razão Neutrófilo/Linfócito	0,37± 0,1	0,32± 0,1	0,16± 0,1*	0,19± 0,1	0,0006

\*vs HFD e HFD-JDA

### Conclusões

Dentre os regimes alimentares avaliados somente a restrição calórica contínua foi capaz de promover mudança no *status* inflamatório e a ativação do sistema imune.

### Referências bibliográficas

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA OBESIDADE E SÍNDROME METABÓLICA - ABESO. **Diretrizes brasileiras de obesidade 2016**. 4. ed. São Paulo: ABESO, 2016.

CHEN, J.; ASTLE, C. M.; HARRISON, D. E. Hematopoietic senescence is delayed and the function of hematopoietic stem cells is enhanced by food restriction **Exp Hematol**. November 31, 2003; 31 (11): 1097-103. doi: 10.1016 / s0301-472x (03) 00238-8.

COLMAN, R. J. et al. Caloric restriction reduces age-related and all-cause mortality in rhesus monkeys. **Nature Communications**, London, v. 5, n. 3557, p. 1-5, 2014.

DE OLIVEIRA, P. A. et al. Unsaturated Fatty Acids Improve Atherosclerosis Markers in Obese and Overweight Non-diabetic Elderly Patients. **Obesity Surgery**, v. 27, n. 10, p. 2663–2671, 2017.

FORGET, P. et al. What is the normal value of the neutrophil-to-lymphocyte ratio?. **BMC Research Notes**, 2017.

GOTTHARDT, J. D. et al. Intermittent fasting promotes fat loss with lean mass retention, increased hypothalamic norepinephrine content, and increased neuropeptide y gene expression in diet-induced obese male mice. **Endocrinology**, New York, v. 157, n. 2, p. 679-691, 2016.

GOTTHARDT, J. D.; BELLO, N. T. Meal pattern alterations associated with intermittent fasting for weight loss are normalized after high-fat diet re-feeding. **Physiology & Behavior**, New York, v. 174, p. 49-56, 2017.

HAJAM, Y.A.; RAI, S. Melatonin supplementation revives diabetic induced biochemical, histological and hematological impairments in rats. **Cell Press: Heliyon**, India, 2020.

HIGASHIDA, K. *et al.* Effects of alternate-day fasting on high-fat diet-induced insulin resistance in rat skeletal muscle. **Life Sciences**, Amsterdam, v. 93, n. 5-6, p. 208- 213, 2013

JOSLIN, P. M. N.; BELL, R. K.; SWOAP, S. J. Obese mice on a high-fat alternateday fasting regimen lose weight and improve glucose tolerance. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 101, n. 5, p. 1036-1045, 2017.

KUSHNER, R. F. CR. **Progress in Cardiovascular Diseases**, p. 2–32, 2018.

LIAO, S. *et al.* Association of aldehydes exposure with obesity in adults. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, China, 2020.

MAURIZI, G. *et al.* Adipocytes properties and crosstalk with immune system in obesity-related inflammation. **Journal of Cellular Physiology**, Itália, 2017. DOI 10.1002/jcp.25855

RIBEIRO, L. C. *et al.* Caloric restriction increases hippocampal glutamate uptake and glutamine synthetase activity in Wistar rats. **Neuroscience Research**, Limerick, v. 64, n. 3, p. 330-334, 2009.

ROUMANS, N. J. T. *et al.* Weight loss-induced stress in subcutaneous adipose tissue is related to weight regain. **British Journal of Nutrition**, 2016.

SEIMON, R. V. *et al.* Intermittent moderate energy restriction improves weight loss efficiency in diet-induced obese mice. **PLoS One**, San Francisco, v. 11, n. 1, p. e0145157, Jan. 2016.

WINZELL, M. S.; AHRÉN, B. The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. **Diabetes**, Alexandria, v. 53, suppl. 3, p. S215-S219, 2004.