

Evento: XXVIII Seminário de Iniciação Científica

ODS: 3 - Saúde e Bem-estar

## **RESTRIÇÃO CALÓRICA ALTERA CONTAGEM DE LINFÓCITOS EM RATOS WISTAR MACHOS OBESOS<sup>1</sup>**

### **CALORIC RESTRICTION CHANGES LYMPHOCYTE COUNTING IN WISTAR RATS OBESE MALES**

**Lauren de Oliveira Machado<sup>2</sup>, Jaíne Borges dos Santos<sup>3</sup>, Andrea Cristiani Beuren<sup>4</sup>, Matias Nunes Frizzo<sup>5</sup>, Thiago Gomes Heck<sup>6</sup>, Mirna Stela Ludwig<sup>7</sup>**

<sup>1</sup> Pesquisa Institucional desenvolvida no Grupo de Pesquisa em Fisiologia, Departamento de Ciências da Vida - UNIJUÍ

<sup>2</sup> Acadêmica de Farmácia da UNIJUÍ. Bolsista PIBIC-CNPq. Grupo de Pesquisa em Fisiologia- GPeF.

<sup>3</sup> Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral a Saúde (PPGAIS)UNIJUÍ/UNICRUZ.

<sup>4</sup> Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral a Saúde (PPGAIS)UNIJUÍ/UNICRUZ.

<sup>5</sup> Docente do Departamento de Ciências da Vida - DCVida UNIJUÍ. Grupo de Pesquisa em Fisiologia- GPeF.

<sup>6</sup> Docente do Departamento de Ciências da Vida - DCVida UNIJUÍ. Grupo de Pesquisa em Fisiologia- GPeF.

<sup>7</sup> Docente do Departamento de Ciências da Vida - DCVida UNIJUÍ. Grupo de Pesquisa em Fisiologia- GPeF. Orientadora.

## **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).

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 nos parâmetros fisiológicos e moleculares, como aumento da sensibilidade à insulina (ROUMANS, et al, 2016). 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).

Estudos em humanos e animais sugerem que o jejum intermitente poderia ser mais eficiente, comparado a restrição contínua de energia, 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.

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

**Keywords:** blood cells, lifestyle, obesity, diet

## **METODOLOGIA**

Animais: Estudo experimental e in vivo, no qual foram utilizados 32 ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) machos, com três a quatro semanas de idade, provenientes e mantidos no biotério da UNIJUÍ

**Evento:** XXVIII Seminário de Iniciação Científica

**ODS:** 3 - Saúde e Bem-estar

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.

**Delineamento experimental:** Realizou-se ao longo de 3 etapas desenvolvidas em 18 semanas, sendo a primeira com duração de oito semanas, a segunda de seis semanas e a última de quatro semanas. Os grupos experimentais se diferenciam em cada etapa em função do respectivo objetivo, relacionado aos diferentes regimes alimentares, conforme detalhado a seguir.

**Etapla 1:** Regime alimentar para ganho de peso: inicialmente, 32 ratos Wistar machos foram submetidos a oito semanas de dieta hiperlipídica (High fat diet - HDL) ad libitum, com o intuito de induzir a obesidade nos mesmos.

**Etapla 2:** Intervenção com diferentes regimes alimentares para perda de peso: nesta etapa, os animais da etapa anterior, já apresentando obesidade, foram subdivididos em tais grupos de estudo: HFD (animais tratados com ração hiperlipídica ad libitum, n=8); HFD-JDA (animais tratados com ração hiperlipídica em regime alimentar de jejum de dias alternados, n = 9); HDL-RC (animais tratados com ração hiperlipídica em regime de restrição calórica contínua, n=9); HFD-DP (animais tratados com ração padrão para animais de laboratório ad libitum, n=6). Todos os ratos foram submetidos às respectivas dietas ao longo de seis semanas.

**Etapla 3:** Regime alimentar para reganho de peso: o grupo HDL se manteve como grupo controle, sem alteração em sua dieta, enquanto os grupos HDL-JDA, HDL-RC e HDL-DP voltaram a receber a mesma ração hiperlipídica do início do estudo (etapa 1), ad libitum, por mais quatro semanas.

**Descrição dos regimes alimentares:**

**Regime alimentar de Dieta Hiperlipídica (High fat diet - HDL):** realizado pela oferta de ração hiperlipídica formulada no Laboratório de Ensaios Biológicos (LEBio) da UNIJUÍ, 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). Todos os ingredientes da DHL (exceto amido e banha) foram ajustados para estarem presentes na mesma quantidade da ração padrão (13,7% de albumina, 7,4% suplemento de aminoácido Aminomix<sup>TM</sup> e 1,1% de farinha de osso seco e ostra). Foi utilizada para todos os animais dos grupos DHL, na etapa 1, a fim de reduzir o ganho de peso e, na etapa 3, contribuindo para o reganho de peso, sob livre demanda (ad libitum). Durante a Etapa 2, a oferta desta ração foi alterada de acordo com o regime alimentar proposto (ad libitum, jejum intermitente, restrição calórica contínua ou ração padrão para animais de laboratório) para todos os grupos.

**Regime alimentar de Restrição Calórica Contínua (RC):** foi planejado a partir de outros estudos em animais (RIBEIRO et al., 2009; COLMAN et al., 2014; SEIMON et al., 2016), trata-se de um 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). A quantidade de alimento ofertada ao grupo HDL-RC foi calculada semanalmente tendo como base o consumo de ração do grupo controle (HDL), para que o consumo alimentar do grupo HDL-RC evoluísse de acordo com a necessidade dos animais para o crescimento dos mesmos, fazendo com que a restrição calórica não ultrapassasse a porcentagem máxima de 30% sobre o volume consumido pelo grupo controle. Para que os animais não consumissem toda a oferta diária de

**Evento:** XXVIII Seminário de Iniciação Científica

**ODS:** 3 - Saúde e Bem-estar

comida rapidamente e permanecessem sem ração nas demais horas do dia, simulando um protocolo de jejum intermitente, a mesma foi ofertada dividida em duas porções no decorrer do dia (às 19 horas e às 7 horas).

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, para cada 500 µl de sangue). Para a determinação automatizada foi utilizado o analisador hematológico Micros 60 (Horiba), seguindo as recomendações do fabricante. Através desse equipamento foi possível obter os seguintes parâmetros: contagem total de hemácias, hematócrito, hemoglobina, índices hematimétricos (VCM, HCM e CHCM), amplitude de distribuição dos eritrócitos – RDW, contagem total de leucócitos, contagem relativa e absoluta de leucócitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos), além da contagem de plaquetas.

As amostras foram diluídas 1:2 com solução salina 0,9% e realizadas em triplicata. Após, foram realizadas distensões hematológicas em lâmina, coradas com coloração panótica (Newprov) e analisadas por profissional com experiência na área, para cada lâmina uma contagem de 100 células.

Projeto aprovado CEUA N. 005/19 (07/06/2019).

## 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 hematopoiéticas. Estudos experimentais em camundongos mostram que a restrição alimentar ao longo da vida diminui a senescência hematopoiética e evita o envelhecimento em células-tronco hematopoiéticas 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,

Evento: XXVIII Seminário de Iniciação Científica

ODS: 3 - Saúde e Bem-estar

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 ( $10^6/\text{mm}^3$ )	4,1±0,4	4,3±0,4	4,5±0,4	4,2± 0,2	0,1231
Leucócitos totais ( $10^3/\text{mm}^3$ )	4125±1176	4367±1455	5800±1749	4100±1149	0,0652
Linfócitos ( $10^3/\text{mm}^3$ )	2850±740	3185±1043	4777 ±1358*	3315±947	0,0040
Neutrófilos ( $10^3/\text{mm}^3$ )	1078±462	982±395	754±390	605±372	0,1359
Monócitos (células / $\text{mm}^3$ )	198±69	191±93	237±100	158±58	0,3518
Eosinófilos (células / $\text{mm}^3$ )	0,000	10±21	32±39	23±41	0,1540
Basófilos (células / $\text{mm}^3$ )	0	0	0	0	-----
Plaquetas ( $10^3/\text{mm}^3$ )	372±76	422±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

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dentre os regimes alimentares avaliados somente a restrição calórica contínua foi capaz de diminuir o status inflamatório e promover uma ativação do sistema imune por meio da elevação na concentração de linfócitos circulantes.

## REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA OBESIDADE E SÍNDROME

Evento: XXVIII Seminário de Iniciação Científica

ODS: 3 - Saúde e Bem-estar

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-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





Evento: XXVIII Seminário de Iniciação Científica

ODS: 3 - Saúde e Bem-estar

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, supl. 3, p. S215-S219, 2004.

Parecer CEUA: 005/19