

**CARLA POSSANI CIRILO**

**DIETA DE CAFETERIA ASSOCIADA À SUPLEMENTAÇÃO COM  
FIBRAS HIDROSSOLÚVEIS ALTERA A MORFOLOGIA DO JEJUNO  
DE RATOS SEM INFLUÊNCIA DO EXERCÍCIO FÍSICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (área de concentração - Biologia Celular e Molecular), da Universidade Estadual de Maringá para a obtenção do grau de Doutora em Ciências Biológicas

**MARINGÁ - PR**

**2015**

**CARLA POSSANI CIRILO**

**DIETA DE CAFETERIA ASSOCIADA À SUPLEMENTAÇÃO COM  
FIBRAS HIDROSSOLÚVEIS ALTERA A MORFOLOGIA DO JEJUNO  
DE RATOS SEM INFLUÊNCIA DO EXERCÍCIO FÍSICO**

**Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Maria Raquel Marçal Natali**

**Orientadora**

## **BIOGRAFIA**

**Carla Possani Cirilo**, filha de Luiz Carlos Cirilo e Angelina Possani Cirilo, nasceu em Maringá, estado do Paraná no dia 9 de fevereiro de 1981. Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Maringá. Atuou como docente no ensino fundamental e médio de 2006 a 2008. Em março de 2009 iniciou o Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Área de concentração – Biologia Celular e Molecular) em nível de Mestrado, na Universidade Estadual de Maringá, realizando estudos na área de neurônios mioentéricos e morfologia intestinal. Concluiu o mestrado em 2011. Atualmente é docente do ensino fundamental da rede estadual de ensino do Paraná e do ensino superior da Faculdade Ingá (UNINGÁ) e doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da UEM, dando continuidade ao estudo do Sistema Nervoso Entérico abordando relações com obesidade e exercício físico.

---

---

## *Dedicatória e Agradecimentos*

## DEDICATÓRIA

### *À Deus*

*Na sua infinita grandeza....me conduziu para que chegasse até aqui...*

### *Ao meu marido*

*Pelo carinho, incentivo e pelos momentos de alegria. Te amo...*

### *À minha filha Lara*

*Com a sua chegada descobri o amor incondicional e a alegria imensurável de ser mãe. Com você me tornei uma pessoa melhor e passei a buscar com mais força um mundo melhor para você filha. TE AMO MAIS QUE TUDO NESTE MUNDO...*

### *Aos meus pais Luiz Carlos e Angelina*

*Vocês foram meus primeiros professores. Não mediram esforços para me educar, sempre me incentivando e mostrando o caminho certo. Se cheguei até aqui, devo muita a vocês...*

### *As minhas irmãs Gislaine e Fabiana, cunhado Alexandre e sobrinhos João Paulo e Maria Victória*

*Pelo constante incentivo, amor, e momentos de alegria. Amo nossa família.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado a vida e a grande alegria desse momento. A Ele devo o êxito de todas as barreiras ultrapassadas e o júbilo de todas as minhas vitórias.

À Universidade Estadual de Maringá, ao Departamento de Ciências Morfológicas e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, por fornecer as condições necessárias à elaboração desta tese.

À Fundação Araucária - Secretaria da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior do Estado do Paraná, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro necessário para a execução deste trabalho.

Ao Departamento de Ciências Fisiológicas, em especial a Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Solange Marta Franzoi de Moraes pela parceria estabelecida.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular pela contribuição em minha formação profissional.

À professoras da Histologia, Dr<sup>a</sup>. Nilza Cristina Buttow e Dr<sup>a</sup>. Luzmarina Hernandes, pelo auxílio prestado com relação às técnicas imunohistoquímicas.

Às técnicas da Histologia, Maria Euride, Maria dos Anjos e Maria Ângela, pelo apoio fornecido no desenvolvimento prático deste estudo e pela amizade que mantivemos durante a nossa convivência.

Aos colegas do laboratório de Histotécnica Animal, Evandro, Stephanie, Débora, Taiana, Lidyane, Larissa, Lia, Jean e a todos da “salinha 105” que proporcionam momentos de trocas de conhecimento, mas também de descontração.

A minha amiga de longa data Renata de Britto Mari, pelo constante incentivo e mesmo de longe sempre pronta a ajudar.

Aos amigos especiais, Ana Paula de Santi Rampazzo, João Paulo Ferreira Schoffen, Mariana Cristina Vicente Umada Zapater e Fernando Augusto Vicentini, com vocês aprendi o trabalho em equipe desde o mestrado o companheirismo e a amizade. Sou eternamente grata pelo aprendizado que obtive com vocês. E a Maisa, amiga que me apoiou muito durante toda a realização deste trabalho. Que o tempo jamais apague esse nossa amizade.

À Secretaria de Educação do Estado do Paraná, Núcleo Regional de Educação de Maringá e a Faculdade Ingá (UNINGÁ), por incentivar e possibilitar a finalização do curso de doutorado.

Aos meus queridos pais... Luiz Carlos e Angelina, com vossa humildade e sabedoria, sempre batalhando para educar os filhos e, dentro de suas possibilidades me fizeram acreditar que o estudo era o melhor caminho, sempre me incentivando a lutar pelos meus ideais.

Ao meu marido Claudiomar, pelo amor, companheirismo e incentivo. Obrigada por suportar meu estresse frequente e por nunca deixar de acreditar em mim. Te amo!

A toda minha família, por todo incentivo e amor. A minha prima Nayara, por me socorrer constantemente cuidando da Lara para que eu pudesse realizar este trabalho, em especial as minhas irmãs Gislaine e Fabiana, que sempre me incentivaram e apoiaram em todos os momentos da minha vida.

À minha tia Nazarena (in memoriam) que sempre torceu por mim, e durante sua caminhada na luta pela vida, me transmitiu valores inestimáveis: força, fé, dedicação, coragem, amizade e amor, na qual sempre serão lembrados. Jamais esquecerei da confiança a mim depositada.

Em especial, agradeço a minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Raquel Marçal Natali. Você é um exemplo de professora e pessoa. É humilde, amorosa, amiga e carinhosa. Obrigada pelos ensinamentos e pelo respeito a qual tem com seus alunos. Obrigada também, por toda confiança. Te admiro muito como profissional e como pessoa, você é um grande exemplo para mim!!!

A todos que de alguma forma colaboraram para a realização e finalização deste trabalho.

Meu profundo agradecimento!

---

---

*Apresentação e Resumo Geral*

## APRESENTAÇÃO

Em consonância com a Resolução Nº 11/2011-PBC do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, esta tese de doutorado é composta por dois artigos científicos completos, redigidos na forma exigida pelas revistas científicas que pretendemos publicá-los, assim sendo:

CIRILO, C.P.; NATALI, M.R.M. A dieta de cafeteria associada à suplementação com fibras hidrossolúveis promove alterações na morfologia do jejuno de ratos sedentários e treinados. Será submetido à apreciação do corpo editorial da revista *Journal of Gastroenterology*(ISSN 1435-5922), visando sua publicação. .... Pág. 01

CIRILO, C.P.; NATALI, M.R.M. Efeitos da dieta de cafeteria associada à suplementação com fibras hidrossolúveis sobre a inervação intrínseca do jejuno de ratos Wistar. Será submetido à apreciação do corpo editorial da revista *Neurogastroenterology & Motility*(ISSN 1365-2982), visando sua publicação ..... Pág. 33

## RESUMO GERAL

**INTRODUÇÃO E OBJETIVOS:** A dieta de cafeteria provoca um quadro de obesidade semelhante a humana, devido a ingestão de alimentos palatáveis. É caracterizada como hipercalórica, hiperlipídica e hipoproteica. A inclusão de fibras hidrossolúveis na dieta e atividade física são medidas preventivas para o controle da obesidade. Considerando que o intestino delgado é sensível a alterações do lúmen, e que modificações no sistema nervoso entérico podem ocorrer decorrentes da dieta, o objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento morfológico, morfométrico e a inervação intrínseca do jejuno de ratos obesos pela ingestão de dieta de cafeteria associada à suplementação de fibras hidrossolúveis, em condição de sedentarismo e treinamento físico. **MÉTODOS:** Foram utilizados 40 ratos Wistar com 60 dias de idade, divididos em 8 grupos: Sedentários (S), Sedentários Cafeteria (SCa), Sedentários Fibras (SF), Sedentários Cafeteria Fibras (SCaF), Treinados (T), Treinados Cafeteria (TCa), Treinados Fibras (TF) e Treinados Cafeteria Fibras (TCaF). A obesidade foi induzida por dieta de cafeteria (*ad libitum*) por 14 semanas. Esta dieta foi composta por: chips, chocolate, marshmallow, geléia de mocotó, salsichas, mortadela, refrigerante, pão francês e bolachas, além da ração padrão e água ofertada aos controles. Durante o tratamento foi verificado o peso corporal e o consumo diário dos alimentos. Após 4 semanas de início da dieta, os animais foram suplementados com fibras hidrossolúveis (Fiber Mais- Nestlé) via gavagem 0,5ml/dia/animal (0,2g de fibras/ml) e treinamento em esteira por 10 semanas. Ao final das 14 semanas os ratos foram pesados e duas horas antes da eutanásia receberam aplicação via veia peniana de sulfato de vincristina (0,5 mg/Kg), um agente bloqueador do fuso mitótico para posterior análise da proliferação celular. Após este período, os animais foram anestesiados intraperitonealmente com tiopental sódico (Thionembutal<sup>®</sup>) (40mg/kg) e mensurado o comprimento naso-anal destes para a determinação do índice de Lee. Posteriormente foi realizada laparotomia para a coleta de sangue e remoção de tecidos. As amostras de sangue foram destinadas para dosagem da glicose, triglicerídeos e proteínas totais. Os tecidos adiposos retroperitoneal, periepídidimal e mesentérico foram retirados e pesados. O intestino delgado foi removido e mensurado, e o jejuno coletado e processado histologicamente com inclusão em parafina e coloração com hematoxilina e eosina (HE) para análise morfométrica da parede total, túnica mucosa, túnica muscular e imunohistoquímica para células enteroendócrinas serotoninérgicas. As amostras também foram incluídas em historesina para avaliar a altura dos vilos e profundidade das criptas intestinais, e

determinação do índice metafásico (IM), em cortes corados por HE e índice de células caliciformes, evidenciadas pelo método histoquímico P.A.S., a qual foi avaliada nos oito grupos experimentais. Neurônios mioentéricos e células da glia foram quantificados e mensurados em preparados de membrana do jejuno de ratos dos grupos S, SCa, SF e SCaF. Foram realizadas técnicas de imunohistoquímica com dupla marcação HuC/D – S100 para avaliar a população neuronal geral e células gliais, e dupla marcação nNOS –ChAT para avaliar as subpopulações nitrérgica e colinérgica respectivamente. A atividade metabólica neuronal foi avaliada por histoquímica para a enzima NADH-diaforase. A estatística foi realizada com o auxílio do programa estatístico GraphPadPrism<sup>®</sup> 5.0 (GraphPad Software, Inc.), sendo submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida de pós teste de Tukey com nível de significância de 5%. **RESULTADOS E DISCUSSÃO:** Os animais obesos pela dieta de cafeteria (SCa, SCaF, TCa e TCaF) não desenvolveram hiperfagia, e o excedente energético foi provocado por maior consumo calórico ( $p < 0,05$ ), resultando em animais obesos comprovado pelo aumento dos tecidos adiposos ( $p < 0,05$ ) retroperitoneal, periepídicimo e mesentérico ( $p < 0,05$ ), comprovando o modelo experimental. Detectamos efeito positivo da suplementação com fibras hidrossolúveis quando associada a dieta padrão para roedores, por promover menor consumo alimentar e calórico, peso corporal e deposição de gordura mesentérica. Estes resultados corroboram com os descritos na literatura, uma vez que fibras hidrossolúveis diminuem a energia metabolizável quando adicionada a dieta de baixa gordura. O treinamento físico em esteira por 10 semanas promoveu redução no peso corporal nos grupos T e TF em relação ao TCa, devido ao maior gasto energético, mas não influenciou os parâmetros bioquímicos sanguíneos. Houve manutenção nos níveis de triglicérides e proteínas totais nos oito grupos analisados, exceto para a glicemia elevada ( $p < 0,05$ ) nos animais SF, TF, SCaF e TCaF comparada aos grupos S e T, a qual não foi caracterizada como estado diabético, uma vez que a glicemia encontrava-se dentro dos valores de referência para ratos Wistar. A dieta de cafeteria associada a suplementação com fibras promoveram no jejuno aumento ( $p < 0,05$ ) na parede total, espessura da túnica mucosa, altura de vilos e profundidade das criptas sem interferência sobre o índice proliferativo e razão vilos/cripta. A espessura da túnica muscular estava reduzida nos animais SCa e aumentada nos animais SCaF. Isso demonstra que o intestino delgado se adaptou ao maior aporte calórico da dieta, a fim de garantir a absorção, e o fato de ocorrer manutenção da razão vilos/cripta entre os grupos é indicativo que a capacidade absorptiva foi mantida. Maior frequência das células caliciformes ( $p < 0,05$ ) foi detectada na mucosa jejunal dos animais cafeteria (SCa e TCa) e manutenção nos demais grupos, inclusive nos animais cafeteria suplementados com fibras (SCaF e TCaF). Esta

resposta demonstra que a barreira epitelial intestinal foi alterada em função da dieta cafeteria, o que pode ser justificado, já que dietas ricas em gorduras são associadas com mudanças na microbiota intestinal, aumentando a translocação de produtos bacterianos imunogênicos, que ativam a imunidade inata e adaptativa no intestino, desencadeando a ação de vários fatores inflamatórios e alterando o muco intestinal, que foi normalizado com inclusão de fibras na dieta, indicando efeito protetor das fibras. Estes resultados estão de acordo com o obtido para células enteroendócrinas imunoreativas para serotonina, com maior número nos animais cafeteria sendo significativo apenas para o grupo TCa em relação aos animais T. A serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT), produzida pelas células enteroendócrinas do intestino é considerada como fator pró-inflamatório, por estimular receptores 5-HT de células dendríticas para lançar mecanismos de imunidade inata, além de possuírem receptores que ativam a resposta imune, os quais podem ser ativados por lipídeos presentes no lúmen, assim, é sugestivo que os resultados obtidos para células serotoninérgicas estejam relacionados a possível mecanismo inflamatório gerado pela dieta. As alterações observadas na mucosa frente a dieta de cafeteria e a suplementação com fibras, não influenciaram a inervação intrínseca intestinal, uma vez que foi detectada manutenção no número médio de neurônios NADH-diaforase, HuC/D, nNOS e ChAT e da glia entérica (S100) do plexo mioentérico. Em relação ao perfil celular (área), manutenção foi observada para as populações neuronais analisadas e glia entérica, exceto para subpopulação nitrérgica nNOS, que apresentaram maior área do corpo celular nos grupos SF e SCaF ( $p < 0,05$ ) em relação aos animais S e SCa, tal alteração pode estar relacionada ao papel da fibra hidrossolúvel em reduzir a velocidade do trânsito intestinal, já que estes neurônios são classificados como inibitórios e o maior corpo celular é indicativo de atividade elevada. **CONCLUSÕES:** A inclusão de fibras hidrossolúveis e atividade física associadas à dieta cafeteria, não foram eficientes para reverter o quadro de obesidade, e não influenciaram significativamente a inervação intrínseca intestinal, exceto pela maior atividade dos neurônios nitrérgicos nos animais SF e SCaF, demonstrada pelo aumento do corpo celular. Porém, a mucosa foi sensível as mudanças no lúmen, se adaptando as condições impostas. Os resultados obtidos para células calciformes e serotoninérgicas, podem estar associados a mecanismos inflamatórios ocasionados pela dieta, a qual foi normalizado pelas fibras, demonstrando efeito protetor, assim, estudos buscando elucidar os mecanismos inflamatórios ocasionados pela dieta sobre o intestino delgado se fazem necessários.

**PALAVRAS-CHAVE:** glia entérica, neurônios entéricos, obesidade, parede intestinal, fibras, dieta cafeteria, exercício

## GENERAL ABSTRACT

**INTRODUCTION AND OBJECTIVES:** The cafeteria diet causes obesity in conditions similar to humans due to intake of high palatable food, and it is characterized as a high-calorie, high-fat and hypoproteic diet. The supplementation of water-soluble fibers in the diet and physical activities are preventive measures in the control of obesity. Because the small intestine is sensitive to changes in luminal contents and the enteric nervous system can be affected by the diet, the aim of this study was to evaluate the morphologic and morphometric histological characteristics of the jejunum, in addition to the intrinsic innervation, in rats with cafeteria-diet induced obesity and associated with the supplementation of water-soluble fibers, both in sedentary conditions and under physical training. **METHODS:** Forty Wistar rats (60 days old) were distributed into 8 groups: sedentary (S), sedentary cafeteria (SCa), sedentary fibers (SF), sedentary cafeteria and fibers (SCAF), trained (T), trained cafeteria (TCA), trained fibers (TF) and trained cafeteria and fibers (TCaF). Obesity was induced by cafeteria diet (*ad libitum*) for 14 weeks. This diet was composed by corn snack, chocolate, marshmallow, mocoto jelly, hot dog sausage, mortadella sausage, soda, bread and cookies, in addition to the standard chow offered to controls. Food intake and body weight were monitored daily during the experimental period. Four weeks after the beginning of the experimental period the rats began to receive the daily supplementation of 0.5ml/day/animal (0.2g of fibers/ml) of water-soluble fibers (FiberMais®, Nestlé), via gavage, and the treadmill physical training for 10 weeks. At the end of 14 weeks the rats were weighed and injected with a dose of vincristine sulphate (0.5 mg/kg) two hours before the euthanasia, via penile vein, for the cellular proliferation study. After that, the animals were intraperitoneally anesthetized with sodium pentobarbital (Thionembutal®) (40 mg/kg) and the naso-anal length was measured for determining the Lee index. Blood was collected from the inferior vena cava after laparotomy, for the biochemical analysis of blood glycaemia, triglycerides and total proteins. The retroperitoneal, periepididymal and mesenteric adipose deposits were collected and weighed. The small intestine was removed, measured, and the jejunum was collected for histological processing in paraffin inclusion, with hematoxylin and eosin (HE) staining for the morphometric analyses of the total wall, mucous and muscle tunics, and immunohistochemistry for serotonergic enteroendocrine cells. Jejunum samples of all groups were also processed in historesin inclusion to evaluate the villi height, crypts depth and metaphasic index (MI) with HE staining, and the goblet cells index with P.A.S. staining. Myenteric neurons and glial cells were quantified and measured in whole-mount preparations

of the jejunum in rats of the groups S, SCa, SF and SCAF. Immunofluorescence techniques were performed with the double staining of HuC/D-S100 to evaluate the overall neuronal population and glial cells, and double staining of nNOS-ChAT to evaluate nitrergic and cholinergic neurons, respectively. Neuronal metabolic activity was assessed by histochemistry technique for the NADH diaphorase enzyme. Statistical analyses were performed with the software GraphPadPrism® 5.0 (GraphPad Software, Inc.), with one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey post-test with 5 % significance level. **RESULTS AND DISCUSSION:** The obese animals induced by cafeteria diet (SCa, SCaF, TCa and TCaF) did not develop hyperphagia and the energy surplus was caused by higher caloric intake ( $p < 0.05$ ). The increase in the retroperitoneal, periepididymal and mesenteric abdominal adipose tissue deposits ( $p < 0.05$ ) confirmed the obesity in this experimental model. We observed positive effects in the supplementation of standard rodent chow with water-soluble fibers, as it caused lower caloric and food consumption, lower body weight and less deposition of mesenteric fat. These results support those described in the literature, since water-soluble fibers decrease the metabolisable energy when added to a low-fat diet. Physical treadmill training for 10 weeks decreased the body weight in the groups T and TF compared to TCa due to increased energy expenditure, but did not influence the biochemical blood parameters. Triglycerides and total protein levels were maintained in the 8 studied groups, and high blood glucose ( $p < 0.05$ ) was observed in the groups SF, TF, SCaF and TCaF, compared to S and T. Nevertheless, the animals were not characterized as diabetics as glycaemia levels were within the reference values for Wistar rats. The cafeteria diet with fibers supplementation increased the total wall and mucosa tunic thickness, villi height and crypt depth ( $p < 0.05$ ), without interfering in the proliferative index or the villus/crypt ratio. Muscular tunic thickness was reduced in the groups SCa and SCaF, showing that the small intestine has adapted itself to the higher caloric intake of the diet. The fact that the villus/crypt ratio did not change between groups is an indicative that the absorptive ability was maintained. Higher rates of goblet cells ( $p < 0.05$ ) were detected in cafeteria animals (SCa and TCa), with maintenance in the other groups including the cafeteria animals supplemented with fibers (SCaFeTCaF). This response demonstrates that the intestinal epithelial barrier function has been changed by the cafeteria diet. High-fat diets are associated with changes in the intestinal microbiota, which increase the translocation of bacterial products that activate the innate and adaptive immunity of the intestine, triggering the action of various inflammatory factors and changing intestinal mucus. This condition may have been normalized by the inclusion of dietary fibers, indicating a protective effect. These results are in accordance with those obtained for the enteroendocrine

cells immunoreactive for serotonin, with significantly higher values in the cafeteria animals only in the group TCa compared to T. Serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) is produced in the intestine by enteroendocrine cells and is considered a pro-inflammatory factor by stimulating 5-HT receptors of dendritic cells in early innate immunity mechanisms. These receptors can also be activated by lipids present in the lumen, and it is suggestive that the obtained results for serotonergic cells are related to the inflammatory mechanism that can be generated by the diet. The changes caused by cafeteria diet and supplementation with fibers observed in the mucosa did not influence the intestinal intrinsic innervation, since there was no change on the average number of NADH diaphorase neurons, HuC/D, nNOS and ChAT neurons and enteric glial cells (S100) in the myenteric plexus. Regarding the cellular profile, the maintenance of the cell body area was observed in all neuronal populations and enteric glia analyzed, except for the nitrergic subpopulation, with higher cell body area in the groups SF and SCaF ( $p < 0.05$ ), compared to S and SCa. Such changes may be related to the role of water-soluble fibers in reducing the speed of intestinal transit, as these neurons are classified as inhibitory neurons and increased cell body is an indicative of higher cellular activity.

**CONCLUSIONS:** The inclusion of water-soluble fibers and the physical activity associated with cafeteria diet were not efficient to reverse the obesity condition, and they did not influence the intestinal intrinsic innervation, except for higher activity of nitrergic neurons in SF and SCaF animals, as demonstrated by the increase of the cell body. However, the mucosa is sensitive to changes in lumen, adapting itself to the nutritional conditions. The results observed for serotonergic and goblet cells can be associated with the inflammatory mechanisms caused by the diet, which were normalized by the fibers demonstrating a protective effect. Thus, further studies would help to elucidate the inflammatory mechanisms caused by diet on the small intestine.

**KEYWORDS:** enteric glia, enteric neurons, obesity, intestinal wall, water-soluble fibers, cafeteria diet, physical exercise.

---

---

*A dieta de cafeteria associada à suplementação  
com fibras hidrossolúveis promove alterações na  
morfologia do jejuno de ratos sedentários e  
treinados*

Artigo Original - Trato Alimentar

Journal of Gastroenterology

**A dieta de cafeteria associada à suplementação com fibras hidrossolúveis promove alterações na morfologia do jejuno de ratos sedentários e treinados**

Carla Possani Cirilo· Maria Raquel Marçal Natali

---

C. P. Cirilo

Faculdade Ingá (UNINGÁ). Rodovia PR 317, 6114 – Maringá, Paraná, Brasil. CEP 87035-510, Tel.: +55-44-3033 5009. e-mail: carlapossani@yahoo.com.br

M. R. M. Natali

Departamento de Ciências Morfológicas – Universidade Estadual de Maringá (UEM). Av. Colombo, 5.790, Jardim Universitário - Maringá, Paraná, Brasil. CEP 87020-900, Tel.:+55-44-30114706, Fax: +55-44-30114340. e-mail: mrmnatali@uem.br

## **Resumo**

*Introdução* A dieta de cafeteria é um modelo experimental que provoca um quadro de obesidade semelhante a humana, caracterizada como hipercalórica, hiperlipídica e hipoproteica. Considerando que o intestino delgado é sensível a alterações do lúmen, o objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento morfológico e morfométrico do jejuno de ratos obesos pela dieta de cafeteria associada a suplementação de fibras hidrossolúveis, em condição de sedentarismo e treinamento físico.

*Métodos* Ratos Wistar com 60 dias foram distribuídos em 8 grupos: Sedentários (S), Sedentários Cafeteria (SCa), Sedentários Fibras (SF), Sedentários Cafeteria fibras (SCaF), Treinados (T), Treinados Cafeteria (TCa), Treinados Fibras (TF) e Treinados Cafeteria Fibras (TCaF). A obesidade foi induzida por dieta de cafeteria (*ad libitum*) por 14 semanas, e a suplementação com fibras e treinamento em esteira por 10 semanas. Posteriormente os animais foram anestesiados, o sangue coletado para análises bioquímicas e o jejuno retirado e fixado para as seguintes técnicas: processamento histológico e análise morfométrica (espessura da parede total, túnica mucosa, altura dos vilos, profundidade das criptas e índice metafásico); histoquímica para quantificação de células caliciformes e imunohistoquímica para avaliar a frequência de células enteroendócrinas serotoninérgicas.

*Resultados* Houve manutenção nos níveis de triglicerídeos e proteínas totais nos oito grupos analisados, exceto para a glicemia elevada ( $p < 0,05$ ) nos animais SF, TF, SCaF e TCaF comparada aos grupos S e T. A dieta de cafeteria e a suplementação com fibras promoveram aumento ( $p < 0,05$ ) na parede total, espessura da túnica mucosa, altura de vilos e profundidade das criptas sem interferência sobre o índice proliferativo e razão vilo/cripta. Maiores índices de células caliciformes ( $p < 0,05$ ) foi detectado nos animais cafeteria (SCa e TCa) e manutenção nos demais grupos, acompanhado do maior número de células enteroendócrinas imunoreativas para serotonina nos animais cafeteria sendo significativo apenas para o grupo TCa em relação aos animais T, sem interferência do treinamento para todos os parâmetros analisados no intestino.

*Conclusões* A dieta de cafeteria promoveu alterações morfométricas no jejuno, com aumento no número de células caliciformes e enteroendócrinas imunoreativas para serotonina que podem estar associados a mecanismos inflamatórios ocasionados pela dieta, atenuado pela presença das fibras hidrossolúveis.

**Palavras-chave:** dieta de cafeteria, exercício físico, fibras, morfologia intestinal, obesidade

## Abstract

*Introduction:* The cafeteria diet is an experimental model that causes obesity in conditions similar to humans due to intake of high palatable food, and it is characterized as a high-calorie, high-fat and hypoproteic diet. As the small intestine is sensitive to changes in the lumen, the aim of this study was to evaluate the morphologic and morphometric characteristics of the jejunum of rats with cafeteria diet-induced obesity and associated with the supplementation of water-soluble fibers, both in sedentary conditions and under physical training. *Methods:* Wistar rats (60 days old) were distributed into 8 groups: sedentary (S), sedentary cafeteria (SCa), sedentary fibers (SF), sedentary cafeteria and fibers (SCaF), trained (T), trained cafeteria (TCa), trained fibers (TF) and trained cafeteria and fibers (TCaF). Obesity was induced by cafeteria diet (*ad libitum*) for 14 weeks, with the fibers supplementation and treadmill training beginning after 4 weeks and maintained for the last 10 weeks of treatment. At the end of the experimental period the animals were anesthetized, blood was collected for biochemical analysis and the jejunum was removed and fixed for the following techniques: histological processing and morphometric analyses (total wall thickness, mucous tunic, villi height, crypt depth and metaphasic index); histochemistry for goblet cells quantification and immunohistochemistry to evaluate the frequency of serotonergic enteroendocrine cells. *Results:* Triglycerides and total protein levels were maintained in the 8 studied groups, and high blood glucose ( $p < 0.05$ ) was observed in the groups SF, TF, SCaF and TCaF, compared to S and T. The cafeteria diet with fibers supplementation increased the total wall thickness of the mucosa, villi height and crypts depth ( $p < 0.05$ ), without interfering in the proliferative index or the villus/crypt ratio. Higher rates of goblet cells ( $p < 0.05$ ) were detected in cafeteria animals (SCa and TCa), with maintenance in the other groups. The number of enteroendocrine cells immunoreactive for serotonin was significant higher only in the group TCa compared to T, and physical training did not interfere on all the others analysed parameters in the intestine. *Conclusions:* The cafeteria diet promoted morphometric changes in the jejunum with increased number of goblet cells and enteroendocrine cells immunoreactive for serotonin, which may be associated with inflammatory mechanisms caused by the diet and attenuated by the presence of water-soluble fibers.

**Keywords:** cafeteria diet, physical exercise, fibers, intestinal morphology, obesity.

## INTRODUÇÃO

A incidência da obesidade atinge proporções alarmantes em todo o mundo [1], em 2014, mais de 1,9 bilhão de adultos estavam acima do peso, e destes, mais de 600 milhões considerados obesos [2]. No Brasil, pesquisas indicam que, nos últimos 35 anos, a frequência de sobrepeso e obesidade aumentou significativamente em todas as faixas etárias [3], causando várias consequências à saúde, como doenças cardiovasculares, diabetes mellitus, desordens musculoesqueléticas, alguns tipos de cânceres [2], distúrbios metabólicos como resistência à insulina, hipertensão arterial e distúrbios no metabolismo das lipoproteínas [4].

A obesidade pode ser considerada um problema multifatorial, envolvendo principalmente aspectos ambientais e comportamentais como aumento da porcentagem de gordura na dieta diária, consumo exagerado de produtos industrializados e falta de atividade física [2, 5, 6]. Com o advento dos produtos industrializados, o homem passou a utilizar cada vez mais alimentos processados, em prejuízo do consumo de alimentos naturais ricos em fibras, em proteínas, lipídios vegetais, sais minerais e vitaminas [5].

A dieta de cafeteria é caracterizada por ser hipercalórica, hiperlipídica e hipoproteica em roedores [7, 8], a qual simula refeições *fast-food* é aceita como um dos modelos que mais se aproxima da obesidade humana [9]. Este modelo experimental baseia-se no acréscimo ou associação, à ração padrão, de substâncias altamente calóricas [10] e de baixo valor nutritivo, com sobrecarga de carboidratos e gorduras [11].

Modificações nos hábitos de vida como a redução do consumo calórico, associado à atividade física são eficientes medidas na prevenção e tratamento do sobrepeso e da obesidade [11]. O equilíbrio entre a ingestão alimentar e o gasto energético é importante medida para manutenção do peso corporal. Quando o consumo calórico supera o gasto energético o peso corporal é elevado, resultando no sobrepeso e obesidade [12]. Neste sentido, a prática de atividade física pode atuar prevenindo a obesidade, por causar balanço energético negativo, além de melhorar a defesa antioxidante [13].

Outro fator que poderia contribuir positivamente é a inclusão de fibras na dieta por, intervir no metabolismo dos lipídios e carboidratos e na fisiologia do trato

gastrointestinal, além de assegurar uma absorção mais lenta dos nutrientes e promover a sensação de saciedade [14]. O aumento do consumo de fibras pode diminuir a absorção de energia por meio da diluição da disponibilidade de energia da dieta, e reduzir o peso corporal ou atenuar o ganho de peso. As fibras hidrossolúveis quando fermentadas no intestino grosso estimulam a produção de peptídeo semelhante a glucagon (GLP-1) e peptídeo YY (PYY), que são hormônios intestinais com papel de indutor da saciedade. As fibras também podem reduzir o consumo de gordura na dieta e diminuir a energia metabolizável (que é a energia bruta menos a energia perdida nas fezes) [15].

O intestino delgado adapta-se estruturalmente as condições no lúmen, especialmente a túnica mucosa, atrofiando quando há menor aporte de nutrientes e hipertrofiando quando há sobrecarga alimentar [16]. Esta mucosa é revestida por camada única e distinta de células epiteliais, os enterócitos envolvidos na fragmentação e absorção dos nutrientes, células-tronco para renovação do epitélio, células caliciformes secretoras de muco e células enteroendócrinas produtoras de vários hormônios, dentre eles a serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) [17].

Para proteger a superfície intestinal da presença de antígenos e microorganismos comensais potencialmente prejudiciais como bactérias e vírus presentes no lúmen [18], as superfícies mucosas são cobertas por uma camada de muco, constituído principalmente por mucinas secretadas pelas células caliciformes, formando a primeira linha de defesa da mucosa intestinal [19]. Assim, alterações no número destas células ou na produção de muco pode afetar a eficiência da barreira protetora, podendo desencadear importantes implicações fisiológicas ou patológicas [17, 20].

Na mucosa as células enteroendócrinas serotoninérgicas também desempenham importante papel, atuando no controle da proliferação e conseqüente diferenciação celular [21], como transdutores de sinal no epitélio da mucosa intestinal [22] e como sensores para a imunidade inata [23]. Alterações nestas células e nos mecanismos de sinalização mediada pela 5-HT podem levar a quadros patológicos como a hipersensibilidade visceral, dismotilidade intestinal e disfunções secretomotoras [24].

Soares e colaboradores [25] observaram alterações morfométricas na parede intestinal e no número de células caliciformes e enteroendócrinas em camundongos

obesos por dieta hiperlipídica. Outros parâmetros da parede intestinal como altura de vilos, profundidade de criptas, espessura da parede total e túnica mucosa[7, 8, 26], podem ser alterados em função da obesidade, mas não há estudos que associe os efeitos da obesidade acompanhada da suplementação com fibras e atividade física sobre os elementos da parede intestinal.

O objetivo deste trabalho foi investigar possíveis alterações bioquímicas sanguíneas e o comportamento morfométrico do jejuno em ratos wistar induzidos a obesidade pelo modelo de dieta cafeteria associada à suplementação com fibras, em condição de sedentarismo e treinamento físico.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### **Animais e tratamento**

Foram utilizados 40 ratos machos da linhagem Wistar com 60 dias de idade, mantidos em caixas de polipropileno (quatro animais/caixa) com temperatura de 25<sup>0</sup>C, fotoperíodo de 12 horas claro/12 horas escuro, controlados por timer *Brasfort*®. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em oito grupos experimentais (n=5): Sedentários (S), Sedentários cafeteria (SCa), Sedentários + Fibras (SF), Sedentários cafeteria + Fibras (SCaF), Treinados (T), Treinados cafeteria (TCa), Treinados + Fibras (TF) e Treinados cafeteria + Fibras (TCaF). Todos os procedimentos envolvendo a experimentação animal foram aprovados pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação da Universidade Estadual de Maringá (Protocolo 093/2012).

Os grupos S, SF, T e TF receberam ração padrão para roedores NuvilabCr1® (22g de proteína/100g de ração e 7g de fibras/100g de ração) recomendada pelo National Research Council (1995) e National Institute of Health – USA, composta por carbonato de cálcio, farelo de milho, de soja e de trigo, fosfato bicálcio, cloreto de sódio, multivitamínico e aminoácidos, além de água *ad libitum*.

Nos grupos SCa, SCaF, TCa e TCaF, a obesidade foi induzida por meio da oferta da dieta de cafeteria[7]por 14 semanas, sendo iniciada aos 60 dias de idade dos animais. Esta dieta foi composta por: chips, marshmallow, geléia de mocotó, salsichas, mortadela, refrigerante, pão francês e bolachas, além da ração comercial e água oferecida aos demais grupos. A média da ingestão alimentar, de todos os grupos, foi obtida diariamente por meio da subtração entre a pesagem do alimento oferecido e a sobra deste na gaiola, sendo também estimado o consumo de líquidos e valor calórico da dieta (embalagens dos produtos).

### ***Suplementação com fibras***

Após 4 semanas de tratamento os grupos SF, SCaF, TF, TCaF passaram a receber suplementação com fibras hidrossolúveis (17%) composta de 40% de inulina e 60% de

goma guar (Fiber Mais Nestlé), administrada por gavagem 0,5ml/dia/animal (0,2g de fibras/ml), durante 10 semanas.

### ***Treinamento físico***

Após 4 semanas de tratamento foi iniciado o treinamento aeróbio dos grupos T, TCa, TF e TCaF, 5 vezes/semana, durante 10 semanas. Os animais foram submetidos a exercício físico em esteira ergométrica programável (Imbramed, mod.KT3000), adaptada para treinar 8 ratos simultaneamente. Inicialmente os ratos foram selecionados e submetidos a uma semana de adaptação (10 minutos/dia em esteira à velocidade de 0,3 Km/h a 0,6 Km/h em estágios de 2 minutos cada), logo após, a velocidade e o tempo foram gradativamente aumentados até se atingirem a frequência de 5 vezes/semana, uma hora/dia, em intensidade moderada, de acordo com protocolo estabelecido por Duflothet *al.* [27] e adaptado por Negrão *et al.* [28] no Laboratório de Fisiologia do Esforço (Labfise) da UEM.

### ***Coleta de sangue e tecidos***

Ao final das 14 semanas os ratos foram pesados e duas horas antes da eutanásia receberam aplicação via veia peniana de sulfato de vincristina (0,5 mg/Kg), um agente bloqueador do fuso mitótico para posterior análise da proliferação celular. Após este período, os animais foram anestesiados intraperitonealmente com tiopental sódico (Thionembutal<sup>®</sup>) (40mg/kg) e mensurados o comprimento naso-anal para a determinação do índice de Lee [peso corporal<sup>1/3</sup> (g)/comprimento naso-anal (cm)X1000].

Posteriormente foi realizada laparotomia para a coleta de sangue (4 mL) da veia cava inferior e remoção de tecidos. As amostras de sangue foram destinadas para dosagem da glicose, colesterol total, triglicérides e proteínas totais utilizando kits da Gold Analisa kits da Analisa (Gold Analisa Diagnóstica Ltda, Minas Gerais – Brasil).

Também foram coletadas e pesadas as gorduras periepídimal, retroperitoneal e mesentérica. O intestino delgado foi retirado e mensurado seu comprimento a partir do piloro até a junção ileocecal. Em seguida o jejuno foi isolado, mensurado sua largura e

amostras foram destinadas para análise histológica da parede intestinal, histoquímica e imunohistoquímica de células caliciformes e serotoninérgicas, respectivamente.

### ***Análise morfológica da parede jejunal***

#### ***Inclusão em parafina***

Amostras do jejuno foram abertas na borda mesentérica e fixadas em formol tamponado, posteriormente desidratadas em séries de concentrações crescentes de álcool (80%, 90% e 100%), diafanizadas em xilol e incluídas em parafina para obtenção de cortes histológicos semi-seriados com 6  $\mu\text{m}$  de espessura, em micrótomo Leica RM 2145, os quais foram corados pelo método de Hematoxilina-Eosina (HE), com objetivo de avaliar a espessura da parede total intestinal e das túnica mucosa. Foram mensurados 100 pontos aleatórios da parede intestinal (ápice da vilosidade até túnica serosa) e espessura da túnica mucosa (ápice da vilosidade até a muscular da mucosa) em 10 cortes histológicos/animal ( $\mu\text{m}$ ).

#### ***Inclusão em Histoiresina***

Para esta técnica amostras do jejuno foram abertas na borda mesentérica, fixadas em formol tamponado e transferidas para álcool 70%. Posteriormente foram desidratadas em álcool 95%, 100%, álcool 100% com solução de infiltração (resina com ativador) na proporção de 1:1 e estocados overnight a 4°C em solução de infiltração. Após este período as amostras foram mantidas em formas específicas com solução para inclusão (solução de infiltração com endurecedor) e os blocos obtidos permaneceram em estufa a 37°C por aproximadamente 10 dias para secagem. Os blocos foram então, submetidos à microtomia para obtenção de cortes semi-seriados com 3  $\mu\text{m}$  de espessura e posteriormente colocados sobre lâminas de vidro para microscopia. Os cortes foram corados com Hematoxilina-Eosina (HE) para mensuração da altura dos vilos, profundidade da criptas intestinais e determinação do índice metafásico. Cortes também foram submetidos à técnica histoquímica com Ácido Periódico de Schiff (P.A.S.) para evidenciação e quantificação das células caliciformes.

### *Análise morfológica de vilosidades e criptas intestinais*

A partir da coloração com HE, foram mensuradas (Software Image-Pro Plus versão 4.5- Media Cybernetics) a altura de 90 vilos e 90 criptas orientadas longitudinalmente por animal a partir de imagens capturadas em objetiva de 10X em microscópio óptico Olympus BX41 acoplado com câmara de alta resolução Q Color 3 Olympus American INC, sendo os resultados expressos em  $\mu\text{m}$ .

### *Proliferação celular*

O índice metafásico (IM) expresso como a porcentagem de núcleos metafásicos divididos pelo número total de núcleos contados, foi obtido em criptas longitudinais bem orientadas, que apresentavam lúmen evidente. Foram contadas 2.500 células [29] por animal em microscópio óptico, binocular Olympus BX41, com objetiva de 40X. O IM foi multiplicado pela constante de Tannok ( $Kt = 0,57$ ) para a correção da geometria tecidual evitando uma superestimação do número de metáfases [30], assim:  $IM = N^\circ \text{ de células em metáfase} \times 100 \times Kt / N^\circ \text{ total de células nas criptas}$ .

### *Histoquímica para células caliciformes*

Para avaliar o número de células caliciformes evidenciadas pelo método histoquímico P.A.S, foram quantificadas aproximadamente 2500 células em vilosidades íntegras e orientadas longitudinalmente, com o auxílio do microscópio óptico Olympus BX41, utilizando objetiva de 40X. A razão entre o número de células caliciformes e o número de enterócitos na vilosidade foi definida como o índice de células caliciformes (IC) [29], sendo:  $IC = (N^\circ \text{ de células caliciformes} / N^\circ \text{ total de células na vilosidade}) \times 100$ .

### *Imunohistoquímica para células enteroendócrinas serotoninérgicas*

A partir de amostras do jejuno fixadas em formol tamponado, foram realizados cortes histológicos semi-seriados com 6  $\mu\text{m}$  de espessura. Após desparafinização e hidratação, os cortes foram tratados com  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 3% em metanol por 10 minutos, para eliminar a ação das peroxidases endógenas. Após duas lavagens com PBS 0,1M (pH 7,4) por 5 minutos, os cortes foram bloqueados com solução contendo soro de cabra a

10% (10 minutos). Posteriormente os tecidos foram incubados com solução contendo anticorpo primário anti-serotonina produzido em coelho (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>), diluído 1:100 em PBS por 1 h. Após duas lavagens com PBS 0,1M (pH 7,4) por 5 minutos, os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotilado (anti-coelho) por 10 minutos, lavados novamente e, em seguida, tratados com o conjugado estreptavidina-peroxidase (10 minutos). Depois de novas lavagens com PBS para retirar o excesso do conjugado enzimático, a reação imunohistoquímica foi revelada por diaminobenzidina (DAB) em PBS e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 15 minutos. Após lavagem em água destilada, os cortes foram contracorados com hematoxilina, desidratados em etanol, diafanizados com xilol e montados sob lamínula com resina sintética Permount<sup>®</sup>. Todos os procedimentos foram conduzidos à temperatura ambiente. Para a realização desta técnica o Kit Histostain<sup>®</sup> Plus (Invitrogen<sup>®</sup>) foi utilizado.

A quantificação das células enteroendócrinas serotoninérgicas imunoreativas na mucosa (vilo e criptas) do jejuno, foi realizada com auxílio do software Image-Pro Plus<sup>®</sup> 4.5, em 50 imagens microscópicas capturadas em microscópio de luz Olympus BX41 acoplado com câmera Q Color 3 Olympus American Inc., com objetiva de 40X, com total de 4,8mm<sup>2</sup>/animal.

### **Análise estatística**

A análise estatística dos dados foi realizada com o auxílio do programa estatístico GraphPadPrism<sup>®</sup> 5.0 (GraphPad Software, Inc.). Os dados numéricos foram inicialmente submetidos ao teste Kolmogorov-Smirnov (K-S) para a verificação da normalidade. Todos os dados foram paramétricos e submetidos à análise de variância (ANOVA) e como pós teste para comparação das médias foi utilizado o teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5% e os resultados expressos como média ± erro padrão.

## RESULTADOS

### *Comportamento alimentar e parâmetros corporais*

O consumo alimentar e parâmetros corporais de ratos alimentados com dieta de cafeteria com e sem suplementação de fibras hidrossolúveis, e com ou sem treinamento aeróbico por 10 semanas são apresentados nas tabelas 1 e 2, respectivamente.

O comportamento alimentar diante da dieta de cafeteria indica que nos grupos SCa, TCa, SCaF e TCaF), comparados ao grupo controle (S) não aumentou a ingestão alimentar total, porém reduziu o consumo de ração e água ( $p<0,05$ ) em preferência à dieta de cafeteria. O consumo calórico nestes grupos também apresentou-se aumentado com relação aos respectivos controles ( $p<0,05$ ) (Tab.1). Este comportamento refletiu na produção de animais obesos comprovado pelo aumento significativo ( $p<0,05$ ) de coxins adiposos e peso relativo (expresso em g de coxins adiposos/100g do peso corporal) comparado aos animais do grupo S sem interferir no peso corporal e Índice de Lee (Tab.2).

A adição de fibras na dieta promoveu redução no consumo de ração ( $p<0,05$ ) nos ratos SF e TF em relação ao controle S, com menor consumo calórico (Tab. 1), levando a redução do peso corporal e Índice de Lee ( $p<0,05$ ), com manutenção dos coxins adiposos e peso relativo (Tab.2), sem efeito em animais obesos. Para animais que apenas receberam treinamento (T), houve manutenção do consumo calórico, de ração e líquidos, bem como do peso relativo dos coxins adiposos, no entanto, o peso corporal foi reduzido ( $p<0,05$ ) quando comparado aos animais controle (S) (Tab.1 e 2).

### *Análise bioquímica sanguínea*

A dieta de cafeteria, a adição de fibras na dieta e o treinamento físico não promoveram alterações significativas nos níveis de triglicerídeos e proteína total. Aumento nos níveis glicêmicos nos animais suplementados com fibras hidrossolúveis (SF, TF, SCaF e TCaF) foi detectado em relação ao controle (S) e ao animais treinados (T), sem diferenças significativas em relação aos animais cafeteria (SCa e TCa) Valores apresentados na Tabela 3.

### *Análise morfométrica da parede jejunal*

A análise morfométrica do jejuno é apresentada na tabela 4.

Comparado ao grupo controle (S) o aumento na disponibilidade de alimentos calóricos (dieta de cafeteria) e suplementação com fibras, exibiram resposta uniforme com aumento ( $p < 0,05$ ) na espessura da túnica mucosa e parede total do jejuno, sem efeito do treinamento físico. O consumo isolado da dieta de cafeteria (SCa) e de fibras (SF) resultou em vilos e criptas maiores ( $p < 0,05$ ) quando comparado aos grupos S, T, TF. A razão vilos/cripta foi mantida para todos os grupos, bem como a análise da proliferação celular, por meio do índice metafásico obtido entre os grupos.

O índice de células caliciformes aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) nos animais cafeteria (SCa e TCa) em relação aos demais grupos, demonstrando maior produção de muco nesses animais. Manutenção do índice de células caliciformes nos demais grupos (T, SF, TF, SCaF e TF) em relação ao controle S foi observado. O treinamento físico não promoveu alterações neste parâmetro já que os animais T não apresentaram diferença ( $p < 0,05$ ) em relação aos demais grupos (Tab.4)

As células enteroendócrinas imunoreativas para serotonina foram identificadas nas criptas e ao longo de todo o vilos, inclusive no seu ápice. Manutenção no número de células serotoninérgicas foi observado nos grupos T, SCa, TCa, SF, SCaF, TF e TCaF em relação ao controle S, ressalte-se que constante aumento ( $p > 0,05$ ) no número de células imunomarcadas foi detectado nos grupos cafeteria. No grupo TCa o aumento no número das células serotoninérgicas foi significativo ( $p < 0,05$ ) em relação aos animais treinados T (Fig.1).

## DISCUSSÃO

### *Comportamento alimentar e parâmetros corporais*

A obesidade induzida por dieta de cafeteria é o modelo experimental que mais se assemelha a obesidade humana [10]. É uma dieta composta por um alto valor calórico e baixo valor nutritivo, com sobrecarga de carboidratos e gorduras [11], que é modelo para o estudo de mecanismos e danos ao organismo pelo maior aporte calórico, caracterizada por ser hipercalórica, hiperlipídica e hipoprotéica [7,9]

Nossos resultados demonstram que os animais cafeteria reduziram o consumo de ração com preferência da dieta de cafeteria, mas não apresentaram diferença no consumo total em gramas quando comparado ao controle. Menor consumo de água também foi observado em relação ao consumo de refrigerantes. Este comportamento alimentar refletiu em maior consumo calórico nos animais cafeteria, independente do treinamento e suplementação com fibras.

A alta palatabilidade da dieta faz com que os animais a prefiram, comparado à ração padrão [10], o que explica o menor consumo de água e ração. O maior consumo calórico, com o mesmo consumo alimentar em gramas é observado na literatura [31] caracterizando a obesidade em ratos sem o desenvolvimento de hiperfagia [32], o que corrobora com nossos resultados.

Os animais da dieta cafeteria apresentaram aumento significativo dos coxins adiposos e peso relativo comprovando o desenvolvimento da obesidade pelo aumento da adiposidade visceral [8, 31].

A suplementação com fibras hidrossolúveis administrada por gavagem durante 10 semanas, foi capaz de reduzir o consumo alimentar nos animais sedentários e treinados com conseqüente redução do consumo calórico, peso corporal e índice de Lee, sem efeito sobre os animais com dieta cafeteria. Isso indica que a suplementação com fibras nestas condições experimentais não foi capaz de reverter a absorção do aporte calórico gerado na dieta cafeteria, com efeito positivo apenas em animais que ingeriam ração padrão.

Estes resultados justificam-se uma vez que fibras hidrossolúveis tem a capacidade de se ligar a água formando géis, que no trato gastrointestinal retardam o esvaziamento gástrico e o transito intestinal [33, 34] promovendo sensação de saciedade e assegurando

absorção mais lenta dos nutrientes [14]. Alimentos ricos em fibras normalmente possuem menor conteúdo energético, contribuindo para diminuição na densidade de energia da dieta, sendo que no intestino essas fibras podem dificultar a ação das enzimas digestivas sobre seus substratos, retardando a absorção de nutrientes [35]. Porém, os efeitos benéficos das fibras hidrossolúveis estão relacionados ao tipo de dieta utilizada, já que esta pode diminuir a energia metabolizável quando adicionada a dieta de baixa gordura, e aumentar a energia metabolizável quando associada a alimentos ricos em gordura [18]. Isto justifica nossos resultados, uma vez que os animais cafeteria receberam uma dieta cujo conteúdo era hipercalórico e hiperlipídico [7, 9]. Tanto fibras hidrossolúveis quanto insolúveis podem levar a perda de peso, no entanto existe uma relação no tipo de dieta (alto ou baixo teor de gordura) e o tipo de fibras. As fibras insolúveis podem desempenhar papel mais relevante para perda de peso durante o consumo de dietas ricas em gordura, por acelerar o trânsito intestinal, diminuindo a digestão e absorção de nutrientes e de energia [18].

O treinamento moderado em esteira, 5 vezes por semana durante 10 semanas não surtiu efeito sobre o consumo de alimentos e calorias dos ratos T, TCa, TF e TCaF em relação os demais grupos, mas resultou em menor ganho de peso corporal nos animais T e TF quando ao comparado a animais sedentários e manutenção do peso nos animais cafeteria sem (TCa) e com adição de fibras na dieta (TCaF), respectivamente. Contrariamente aos nossos resultados, menor consumo calórico foi observado em ratos que foram submetidos a treinamento em esteira por 12 semanas [7] e que praticaram natação por 8 semanas [36]. Este fator é atribuído ao exercício físico como forma de agente estressor promovendo aumento da secreção hipotalâmica do hormônio liberador de corticotropina (CRH), em dependência da intensidade do estresse [37], o que leva ao efeito anorexígeno do exercício físico [38, 39].

Acreditamos que o treinamento realizado em nosso experimento não atuou como agente estressor, pois não interferiu no consumo de alimentos, e que a redução do peso corporal nos T e TF se deve a alimentação balanceada, na qual consumiam apenas ração, associada ao maior gasto energético pela atividade física [37].

### *Perfil sanguíneo*

Não houve efeito da dieta, da suplementação com fibras ou do treinamento ( $p > 0,05$ ) nos níveis de triglicerídeos nos oito grupos analisados, os quais se mantiveram dentro de valores de referência para ratos Wistar adultos [40]. No entanto, foi constatado redução ( $p > 0,05$ ) nos níveis de triglicerídeos de 40,5% no grupo SF, 38% nos TF, 16% nos T e 12% nos TCa em relação aos demais grupos. Isso demonstra efeito positivo da suplementação com fibras e em menor grau da atividade física sobre os níveis plasmáticos de triglicerídeos. As fibras, como já citado, atuam dificultando a ação enzimática sobre o substrato, diminuindo a digestão e absorção de nutrientes [35]. Nos grupos cafeteria (SCaF e TCaF) a quantidade de fibras utilizadas na suplementação não foi capaz de reduzir a absorção de nutrientes, refletindo na manutenção dos níveis de triglicerídeos.

Apesar dos resultados dos grupos T e TCa, não serem estatisticamente significativos, a redução de 16% e 12% nos níveis de triglicerídeos demonstra efeito positivo do treinamento sobre este parâmetro. Este efeito também foi observado por Aquino et al. [41] com redução nos níveis de triglicerídeos em ratos submetidos a exercício moderado de natação, atribuindo melhora no perfil lipídico e adiposidade em ratos quando tal exercício é associado a dieta balanceada.

A glicemia obtida nos animais suplementados com fibras hidrossolúveis (SF, TF, SCaF e TCaF), independente da dieta e treinamento apresentaram maiores níveis em relação aos animais controle (S) e (T), e manutenção em relação aos grupos cafeteria (SCa e TCa).

Esta resposta encontra divergência na literatura. Segundo Chery e colaboradores [42], o consumo de fibras hidrossolúveis como inulina e goma guar, como utilizada em nossa suplementação, possuem natureza viscosa e podem provocar respostas fisiológicas benéficas como atenuação da glicose pós-prandial no sangue. Fibras hidrossolúveis, não são absorvidas no estômago ou no intestino delgado, mas são degradadas por bactérias no intestino grosso [43], servindo como prebiótico com importante papel na microbiota e prevenindo doenças como obesidade e diabetes [44].

Ressaltamos que apesar da variação nos valores plasmáticos de glicose obtidos entre os grupos, principalmente dos grupos cafeteria em relação ao controle, não caracterizam um estado pré ou diabético, e encontram-se dentro dos valores de referência

[40]. Estudo com ratos obesos com diabetes induzidos por dieta hiperlipídica e baixa dose de estreptozotocina a glicemia média foi de 344,2 mg/dL [45], reforçando que os animais neste experimento não se encontravam diabéticos.

Independente da dieta, suplementação com fibras ou treinamento, houve manutenção nos níveis de proteínas totais, e estão contidos nos valores de referência para ratos Wistar adultos[40].

#### *Análise morfoquantitativa da parede intestinal*

O treinamento em esteira por 10 semanas, imposto aos animais independente da dieta ou suplementação com fibras, não interferiu na espessura da parede total, túnica mucosa, altura dos vilos e profundidade das criptas. Scoaris et al [7] verificaram aumento na altura dos vilos e profundidade das criptas no jejuno de ratos obesos treinados em esteira por 12 semanas. Estes resultados também foram observados por Almeida et al [8] para o jejuno porém, encontraram manutenção destes parâmetros no duodeno. Na literatura, poucos dados são encontrados sobre a influência da atividade física na morfologia intestinal.

A dieta de cafeteria e a suplementação com fibras hidrossolúveis promoveu aumento na espessura da parede total, túnica mucosa, altura dos vilos e profundidade das criptas, em relação ao controle S, destacando que a suplementação com fibras associada à dieta cafeteria (SCaF e TCaF) potencializou este aumento. Esta resposta é esperada, pois o intestino delgado é estruturalmente adaptado para a execução de suas funções e dependendo das condições do lúmen o aumento de sua superfície garante a homeostase energética [46]. Este comportamento é atribuído principalmente como uma resposta tecidual da mucosa, por ser esta túnica bastante susceptível a influência do ambiente no lúmen intestinal [47], hipertrofiando quando há sobrecarga alimentar e atrofiando quando há escassez [16].

Em ratos adultos submetidos à restrição alimentar de 50% foi detectado no íleo redução da espessura da parede total, túnica mucosa, altura dos vilos e profundidade de criptas [48]. Consideramos que o tipo de obesidade pode provocar diferentes respostas deste órgão. Na obesidade induzida pela administração de glutamato monossódico (MSG), que leva morte de neurônios no sistema nervoso central, com danos no núcleo arqueado do hipotálamo, observou-se manutenção desses parâmetros morfométricos

intestinais no jejuno de camundongos [49] e no íleo de ratos [50]. Porém, na obesidade induzida pela dieta de cafeteria devido maior aporte calórico resultou em aumento na parede total, altura de vilos e profundidade das criptas do jejuno e duodeno, em resposta ao maior consumo de energia[7,8]. Desta forma, nossos resultados tem convergência com os descritos na literatura. A resposta obtida na análise morfométrica dos elementos da parede intestinal, para os animais cafeteria, mesmo não desenvolvendo hiperfagia, demonstra que o intestino se adaptou para o maior aporte calórico oferecido, a fim de garantir a absorção, e o fato de ocorrer manutenção da razão vilo/cripta entre os grupos é indicativo que a capacidade absorptiva foi mantida. Outro fator a ser considerado é que as fibras hidrossolúveis tem natureza viscosa e a sua inclusão na dieta promove lentidão no trânsito intestinal[33,34], e este fator em associação com a dieta potencializou em 11% o aumento da mucosa já elevada pela dieta de cafeteria.

Manutenção no índice metafásico foi observado, nos oito grupos analisados. A renovação das células do epitélio intestinal é um processo dinâmico decorrente da renovação celular nas criptas e extrusão de células no ápice dos vilos. Quando o intestino responde a uma determinada condição com aumento na taxa de extrusão, havendo manutenção ou diminuição da taxa de proliferação, a resposta é a redução na altura dos vilos e conseqüente comprometimento funcional [21]. Consideramos que a dieta de cafeteria e inclusão de fibras na dieta promoveu menor taxa de extrusão, acompanhada da manutenção do índice metafásico. Estes dois fatores em associação, foram responsáveis pelo aumento dos elementos da parede intestinal, em resposta ao maior aporte calórico, com a finalidade de garantir a absorção.

A dieta de cafeteria também provocou aumento significativo no índice de células caliciformes (SCa e TCa) em relação aos animais controle, e manutenção desse parâmetro foi observado nos demais grupos, inclusive nos animais cafeteria suplementados com fibras (SCaF e TCaF).

As células caliciformes sintetizam e secretam a maioria das proteínas que compreendem o muco intestinal. Fazem a biossíntese, montam e secretam principalmente mucina MUC2, que forma o esqueleto do muco intestinal [19]. No intestino delgado, há uma única camada de muco, na qual não se encontra ancorada ao epitélio [18], com o papel de lubrificação e proteção contra a agressão ocasionada por antígenos, toxinas e enzimas digestivas existentes no interior da luz intestinal [51].

Além disso, estas células atuam como sensores interagindo com as células dendríticas da lâmina própria [19].

O tipo de dieta pode modificar a quantidade de mucinas [52], o que implicaria em variações no número das células caliciformes. Schoffen e colaboradores [53], identificaram que o menor aporte de nutrientes em ratos promoveu redução do número de células caliciformes no colo proximal. Divergindo de nossos resultados, Scoariset al [7] obtiveram redução no número destas células no jejuno de ratos obesos por dieta de cafeteria, enquanto que manutenção deste número foi obtido por Soares et al [25] no duodeno e jejuno e redução no íleo de camundongos tornados obesos por dieta hiperlipídica.

Vários fatores são associados aos mecanismo de regulação na produção de muco. Estudos recentes, tem demonstrado que interleucinas produzidas por células T da lâmina própria podem afetar diretamente a produção de muco pelas células caliciformes e a propriedade do muco, e que o sistema de muco pode ser modulado por células do sistema imune [19].

Outro fator a ser considerado é que dietas ricas em gorduras são associadas com mudanças na microbiota intestinal [54], refletindo na dinâmica de funcionamento das células do epitélio intestinal. Os constituintes alimentares, a presença da microbiota e produtos de fermentação podem determinar a forma e secreção do muco no epitélio intestinal por regular a função secretora das células caliciformes [52].

A microbiota tem emergido como um dos fatores chaves que regulam os primeiros eventos que desencadeiam a inflamação associada com a obesidade e disfunções metabólicas. Este efeito parece estar relacionado com alterações na composição da microbiota influenciada pela dieta, aumentando a translocação de produtos bacterianos imunogênicos, que ativam a imunidade inata e adaptativa no intestino. Lipídeos da dieta e componentes microbianos específicos podem ativar receptores Toll-like (TLRs), desencadeando vias de transdução de várias sinalizações, levando a produção de citocinas inflamatórias e quimiocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1, MCP1) e o recrutamento de células inflamatórias [55].

Atribuímos assim, o aumento do número de células caliciformes como mecanismo de defesa, aumentando a produção de muco para proteger a mucosa em função de possíveis alterações na microbiota, devido a natureza hiperlipídica da dieta de

cafeteria, e que a fibra quando adicionada a dieta foi capaz de modular a composição da microbiota, como um possível mecanismo de normalização da dinâmica da células do epitélio intestinal.

Esta hipótese estaria também associada a resposta obtida para as células serotoninérgicas em nosso experimento, que apresentaram crescente aumento do seu número nos animais cafeteria, significativo apenas no grupo TCa. Constatamos na literatura, manutenção no número destas células no jejuno e aumento no íleo de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica [25], aumento no colo de ratos submetidos a restrição alimentar [53] e aumento no número e nos níveis de 5-HT em modelos experimentais de colite [56] e pacientes com doenças inflamatórias intestinais [57].

A obesidade é considerada um processo inflamatório e está associada a liberação de vários fatores pró-inflamatórios pelo tecido adiposo, entre eles, TNF- $\alpha$ , a interleucina-6 (IL-6) e a leptina [58]. A 5-HT, produzida pelas células enteroendócrinas do intestino, também é considerada como fator pró-inflamatório, por estimular receptores 5-HT de células dendríticas para lançar mecanismos de imunidade inata [22]. Estudos tem demonstrado, que os receptores TRLs também são encontrados nas células enteroendócrinas, atribuindo a estas células o papel de sensores da imunidade inata [23], e que 5-HT participa da infiltração de células do sistema imune na mucosa intestinal, aumentando a produção de mediadores inflamatórios [59]. Como já citado, os receptores TRLs podem ser ativados por lipídios presentes no lúmen [55] assim, é sugestivo que os resultados obtidos para células serotoninérgicas esteja relacionado a possível mecanismo inflamatório gerado pela dieta.

Com base nos resultados obtidos, concluímos que a inclusão de fibras hidrossolúveis e atividade física associadas à dieta cafeteria, não foram eficientes para reverter o quadro de obesidade. Porém as fibras protegeram a mucosa de possível processo inflamatório ocasionado por lipídeos da dieta, já que nos animais obesos o aumento no índice de células caliciformes é indicativo de modificações da função protetora da barreira intestinal, a qual foi normalizada pela adição de fibras. Além disso, os resultados para as células serotoninérgicas podem estar associados a maior liberação de fatores pró-inflamatórios, assim, estudos buscando elucidar os mecanismos inflamatórios ocasionados pela dieta sobre o intestino delgado se fazem necessários.

**Agradecimentos** Os autores agradecem o suporte financeiro da Fundação Araucária - Secretaria da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior do Estado do Paraná e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e o apoio técnico dos laboratórios de Histotécnica Animal e Fisiologia da Universidade Estadual de Maringá.

## REFERÊNCIAS

1. Finucane MM, Stevens GA, Cowan MJ, et al. National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. *Lancet*. 2011; 377:557–67.
2. WHO - World Health Organization. Obesity and overweight. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>>. Acesso em: 20 junho 2015
3. IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009: antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008\\_2009\\_enc\\_aa/default.shtm](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_enc_aa/default.shtm)>. Acesso em: 20 junho 2015.
4. Krauss RM, Winston M, Fletcher BJ, et al. Obesity: impact on cardiovascular disease. *Circulation*. 1998; 98:1472-76.
5. Kingma JJ, Silva JN, Santos HFT. Constipação, Fibra Alimentar e Fecaloma. In Dani R, Castro LP. *Gastroenterologia Clínica*, 2ª edição Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.
6. Jequier E. Pathways to obesity. *Int J Obesity*. 2002;26:12-7.
7. Scoaris CR, Rizo GV, Roldi LP, et al. Effects of cafeteria diet on the jejunum in sedentary and physically trained rats. *Nutrition*. 2010; 26:312-20.
8. Almeida FN, Andrade ML, Moraes SMF, et al. Obese adult phenotype: Adaptations of small intestine to cafeteria diet and aerobic physical training after weaning. *Science & Sport*. 2014; 29:20-26
9. Mendes, FCV, Moreira BMT, Marsiglio GN, et al. Dieta de cafeteria remodela a estrutura da aorta de ratos obesos. *SaBios: Rev. Saúde e Biol*. 2013; 8:85-91.
10. Cesaretti MLR, Kohlmann Jr. O. Modelos experimentais de resistência à insulina e obesidade: lições aprendidas. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2006; 50:190-7.
11. Kretschmer BD, Schelling P, Beier N, et al. Modulatory role of food, feeding regime and physical exercise on body weight and insulin resistance. *Life Sciences*. 2005;76:1553-71.

12. Knöpfli BH, Radtke T, Lehmann M, et al. Effects of a multidisciplinary inpatient intervention on body composition, aerobic fitness, and quality of life in severely obese girls and boys. *J Adolesc Health*. 2008; 42:119-27
13. Radak Z, Chung YH, Goto S. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. *Free Radical Bio Med*. 2008; 44:153-59
14. Castilho AC, Magnoni D, Cukier C, et al. Prebióticos, Fibras e Prebióticos na Nutrição do Intestino Grosso. In Cukier, C. et al.; *Nutrição Baseada na fisiologia dos órgãos e sistemas – São Paulo: SARVIER, 2005.*
15. Lattimer JM, Haub, MD. Effects of dietary fiber and its components on metabolic health. *Nutrients*. 2010; 2:1266-89
16. Pluske JR, Hampson DJ, Williams IH: Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. *Livest Prod Sci*1997; 51:215-36.
17. Schoffen JPF, Rampazzo APS, Cirilo CP, et al. Food restriction enhances oxidative status in aging rats with neuroprotective effects on myenteric neuron populations in the proximal colon. *Experimental Gerontology*. 2014; 51:54-64.
18. Ermund A, Gustafsson JK, Hansson GC, Keita AV. Mucus properties and goblet cell quantification in mouse, rat and human ileal peyer's patches. *Plos One*. 2013, 8:1-7
19. Pelaseyed T, Bergström JH, Gustafsson JK, et al. The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunol Rev*. 2014; 260: 8–20.
20. Corfield AP, Myerscough N, Longman R, et al. Mucins and mucosal protection in the gastrointestinal tract: new prospects for mucins in the pathology of gastrointestinal disease. *Gut* 2000; 47: 589-94
21. Macari M, Furlan RL, Gonzales, E. Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte. São Paulo, EditoraFunep. 2002; 75-95.
22. Gershon MD. 5-Hydroxytryptamine (serotonin) in the gastrointestinal tract. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2013; 20: 14–21
23. Moran GW, Leslie FC, Levison SE, et al. Enteroendocrine cells: Neglected players in gastrointestinal disorders?. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*. 2008;1:51–60
24. Crowell MD. Role of serotonin in the pathophysiology of the irritable bowel syndrome. *Brit J Pharmacol* 2004; 141: 1285–1293
25. Soares A, Beraldi EJ, Ferreira PEB, et al. Intestinal and neuronal myenteric adaptations in the small intestine induced by a high-fat diet in mice. *BMC*

Gastroenterology. 2015; 15:1-9.

26. Mozes Š, Šefcikova Z, Lenhardt L. Functional changes of the small intestine in over- and undernourished suckling rats support the development of obesity risk on a high-energy diet in later life. *Physiol Res*. 2007; 56:183-92.

27. Duflonth DL, Morris M, Michelini LC. Modulation of exercise tachycardia by vasopressin in the nucleus tractus solitarius. *American Journal of Physiology*. 1997; 273:1271-82.

28. Negrão CE, Moreira ED, Santos MC, et al. Vagal function impairment after exercise training. *Journal of Applied Physiology*. 1992; 72:1749-53.

29. Wright N, Alison M. *The biology of epithelial cell populations*. v.2 New York: Clarendon Press Oxford; 1984.

30. Tannock IF. A comparison of the relative efficiencies of various metaphase arrest agents. *Exp Cell Res* 1967; 47:345-56.

31. Eguchi R, Cheik N, Oyama L, et al. Effects of the chronic exercise on the circulating concentration of leptin and ghrelin in rats with diet-induced obesity. *Rev Bras Med Esporte*. 2008; 14:182-7.

32. Oscai LB, Miller WC, Arnall DA. Effects of dietary sugar and of dietary fat on food intake and body fat content in rats. *Growth*. 1987; 51: 64-73.

33. Pasmán WJ, Saris WH, Wauters MA, et al. Effect of one week of fibre supplementation on hunger and satiety ratings and energy intake. *Appetite*. 1997; 29:77-87.

34. Coppini LZ, Waitzberg DL, Campos FG, et al. *Fibras Alimentares e Ácidos Graxos de Cadeia Curta*. In: Waitzberg DL. *Nutrição Oral, Enteral e Parenteral na Prática Clínica*. 3ª ed. Atheneu; 2004.

35. Slavin, JL. Dietary fiber and body weight. *Nutrition*. 2005; 21:411-8.

36. Brandão MCS, De Angelis RC, De Souza RR, Fróes LB, Liberti EA: Effects of pre- and postnatal protein energy deprivation on the myenteric plexus of the small intestine: a morphometric study in weanling rats. *Nutr Res*. 2003; 23:215-23.

37. Lana AC, Paulino CA, Gonçalves ID. Influência dos exercícios físicos de baixa e alta intensidade sobre o limiar de hipernocicepção e outros parâmetros em ratos. *Rev Bras Med Esporte*. 2006; 12:248-54

38. Rivest S, Richard D. Hypothalamic paraventricular nucleus lesions do not prevent anorectic effect of exercise in male rats. *Am J Physiol* 1990; 259:579-84.

39. Kibenge MT, Chan CB. The effects of high-fat diet on exercise-induced changes in metabolic parameters in Zucker fa/fa rats. *Metabolism* . 2002; 51:708 -15.
40. Lima CM, Lima AK, Melo MGD, et al. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem *Wistar*) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. *Scientia Plena*. 2014;10:1-9
41. Aquino Junior AE, Dourado GKZS, Duarte FO, et al. Effect of conjugated linoleic acid supplementation and swimming training on the body composition and biochemical parameters of Wistar pups. *Rev. Nutr.* 2009; 22:493-502.
42. Dikeman CL, Murphy MR, Fahey Jr.GC. Dietary Fibers affect viscosity of solutions and simulated human gastric and small intestinal digesta. *J Nutr.* 2006; 913-19.
43. López-Molina D, Chazarra S, How CW, et al. Cinnamate of inulin as a vehicle for delivery of colonic drugs. *Int J Pharm.* 2015;479:96–102
44. Holscher HD, Bauer LL, Gourineni V, et al. Agave inulin supplementation affects the fecal microbiota of healthy adults participating in a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial. *J Nutr.* 2015; 1-8
45. Correia-Santos AM, Suzuki A, Anjos JS, et al. Indução de diabetes tipo 2 por dieta hiperlipídica e baixa dose de estreptozotocina em ratas wistar. *Medicina.* 2012;45:436-44.
46. Konturek SJ, Konturek JW, Pawlik T, Brzozowski T. Brain–gut axis and its role in the control of food intake. *J PhysiolPharmacol* 2004; 55:137–54.
47. Firmansyah AF, Suwandito L, Penn D, Lebenthal E: Biochemical and morphological changes in the digestive tract of rats after prenatal and postnatal malnutrition. *Am J Clin Nutr* Aug. 1989;50:261-68.
48. Cirilo CP, Schoffen JPF, Santi-Rampazzo AP, et al. Dietary restriction interferes with oxidative status and intrinsic intestinal innervation in aging rats. *Nutrition.* 2013;29:673-80.
49. Hamaoka K, Kusunoki T. Morphological and cell proliferative study on the growth of visceral organs in monosodium L-glutamate-treated obese mice. *J Nutr Sci Vitaminol.* 1986;32:395-411.
50. Soares A, Schoffen JPF, Gouveia EM, et al. Effects of the neonatal treatment with monosodium glutamate on myenteric neurons and the intestine wall in the ileum of rats. *J Gastroenterol.* 2006;41:674–680.
51. Gaudier E, Hoebler C. Physiological role mucins in the colonic barrier integrity. *Gastroenterol Clin Biol.* 2006; 30: 965-974
52. Sharma R, Schumacher U. Morphometric analysis of intestinal mucins under

different dietary conditions and gut flora in rats. *Dig Dis Sci.* 1995;40:2532–9

53. Schoffen JPF, Vicentini FA, Marcelino CG, et al. Food restriction beginning at lactation interferes with the cellular dynamics of the mucosa and colonic myenteric innervation in adult rats. *An Acad Bras Cienc.* 2014;86:1833-47.

54. Hildebrandt MA, Hoffman C, Sherrill-Mix SA, et al. High fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity. *Gastroenterology.* 2009;137:1716–24.

55. Sanz Y, Moya-Pérez A. Microbiota, inflammation and obesity. In: Lyte M, Cryan JF, editors. *Microbial endocrinology: the microbiota-gut-brain axis in health and disease.* Texas: Springer; 2014. pp 291-317.

56. Oshima S, Fujimura M, Fujimiya M. Changes in number of serotonin-containing cells and serotonin levels in the intestinal mucosa of rats with colitis induced by dextran sodium sulfate. *Histochem Cell Biol*1999; 112: 257–263.

57. Belai A, Boulos PB, Robson T, Burnstock G. Neurochemical coding in the small intestine of patients with Crohn's disease. *Gut.* 1997; 40: 767–774.

58. Bastos DHM, Rogero MM, Arêas JAG. Mecanismos de ação de compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade. *ArqBrasEndocrinolMetab.* 2009;53:646-56.

59. Li Z, Chalazonitis A, Huang Y, et al. Essential roles of enteric neuronal serotonin in gastrointestinal motility and the development/survival of enteric dopaminergic neurons. *J Neurosci.* 2011; 31:8998-9009

**TABELA 1.** Consumo de ração (g), consumo total da dieta de cafeteria (g) incluindo a ração, líquidos (ml) e calórico (Kcal) de ratos dos grupos sedentários (S), sedentários cafeteria (SCa), treinados (T), treinados cafeteria (TCa), sedentários fibras (SF), sedentários cafeteria fibras (SCaF), treinados fibras (TF) e treinados cafeteria fibras (TCaF). Os valores são expressos como média  $\pm$  erro padrão (n=5).

GRUPOS	CONSUMO DE SÓLIDOS		CONSUMO DE LÍQUIDOS			CALORIAS
	CONSUMO DE RAÇÃO	CONSUMO TOTAL DE SÓLIDOS	ÁGUA	REFRIGERANTE	TOTAL DE LÍQUIDOS	
<b>S</b>	112,0 $\pm$ 1,6a	112,0 $\pm$ 1,6a	209,2 $\pm$ 42,7a	_____	209,2 $\pm$ 42,7a	306,7 $\pm$ 9,0a
<b>SCa</b>	15,09 $\pm$ 1,07b	107,7 $\pm$ 3,0a	82,3 $\pm$ 17,3b	166,0 $\pm$ 13,6 <sup>a</sup>	248,3 $\pm$ 31,2b	417,0 $\pm$ 12,7b
<b>T</b>	111,9 $\pm$ 1,72a	111,9 $\pm$ 1,72a	215,8 $\pm$ 18,3a	_____	215,8 $\pm$ 18,3a	310,2 $\pm$ 14,3a
<b>TCa</b>	13,2 $\pm$ 0,75b	109,3 $\pm$ 3,2a	98,1 $\pm$ 27,4b	178,4 $\pm$ 4,3 <sup>a</sup>	276,5 $\pm$ 32,9b	421,0 $\pm$ 8,4b
<b>SF</b>	95,86 $\pm$ 1,2c	95,86 $\pm$ 1,2b	183,1 $\pm$ 28,7a	_____	183,1 $\pm$ 28,7a	265,6 $\pm$ 9,9c
<b>SCaF</b>	14,24 $\pm$ 1,1b	103,9 $\pm$ 3,0a	74,7 $\pm$ 14,8b	168,1 $\pm$ 6,4 <sup>a</sup>	242,8 $\pm$ 21,2b	411,7 $\pm$ 12,1b
<b>TF</b>	92,2 $\pm$ 0,83c	92,2 $\pm$ 0,83b	210,3 $\pm$ 31,7a	_____	210,3 $\pm$ 31,7a	285,3 $\pm$ 14,9c
<b>TCaF</b>	13,48 $\pm$ 0,71b	106,8 $\pm$ 3,7a	95,8 $\pm$ 19,3b	165,3 $\pm$ 8,4 <sup>a</sup>	261,7 $\pm$ 24,3b	410,7 $\pm$ 7,8b

(1) Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ). Análise de variância One-Way ANOVA, pós teste de Tukey.

**TABELA 2.** Peso corporal inicial e final(g), índice de Lee (peso corporal<sup>1/3</sup>/comprimento naso-anal x 1000), somatória dos coxins adiposos (g) e peso relativo dos tecidos adiposos (g dos coxins adiposos/100g do peso corporal) de ratos dos grupos sedentários (S), sedentários cafeteria (SCa), treinados (T), treinados cafeteria (TCa), sedentários fibras (SF), sedentários cafeteria fibras (SCaF), treinados fibras (TF) e treinados cafeteria fibras (TCaF). Os valores são expressos como média ± erro padrão (n=5).

	<b>PESO INICIAL</b>	<b>PESO FINAL</b>	<b>ÍNDICE DE LEE</b>	<b>COXINS ADIPOSOS</b>	<b>g/100g</b>
<b>S</b>	249,8±5,0a	500,0±21,29a	311,7±4,15a	24,2±3,22 <sup>a</sup>	0,04±0,006a
<b>SCa</b>	244,3±1,5 <sup>a</sup>	510,7±18,32a	320,5 ± 4,87a,b	50,2±3,6b	0,10±0,009b
<b>T</b>	263,7±2,2 <sup>a</sup>	397,5±12,89b	297,6 ± 4,10a,c	17,7±2,0a	0,04±0,004a
<b>TCa</b>	273,8±3,5 <sup>a</sup>	498,8±7,67a	323,5 ± 2,90b	38,5±2,4b	0,08±0,006b
<b>SF</b>	259,8±6,3 <sup>a</sup>	413,0±18,36b	283,2 ± 2,06c	16,2±1,2 <sup>a</sup>	0,04±0,004a
<b>SCaF</b>	260,4±4,2 <sup>a</sup>	510,3±17,83a	314,3 ± 5,22a	40,5±3,9b	0,08±0,003b
<b>TF</b>	252,9±6,2 <sup>a</sup>	372,4±17,83b	282,9 ± 5,29c	13,2±1,6 <sup>a</sup>	0,03±0,003a
<b>TCaF</b>	267,2±4,9 <sup>a</sup>	491,2±15,46a	305,0 ± 3,89a	43,6±4,3b	0,08±0,005b

(1) Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ). Análise de variância One-Way ANOVA, pós teste de Tukey.

**TABELA 3.** Perfil lipídico (mg/dl), glicêmico(mg/dl) e proteínas totais(g/dl) de ratos dos grupos sedentários (S), sedentários cafeteria (SCa), treinados (T), treinados cafeteria (TCa), sedentários fibras (SF), sedentários cafeteria fibras (SCaF), treinados fibras (TF) e treinados cafeteria fibras (TCaF). Os valores são expressos como média  $\pm$  erro padrão (n=5).

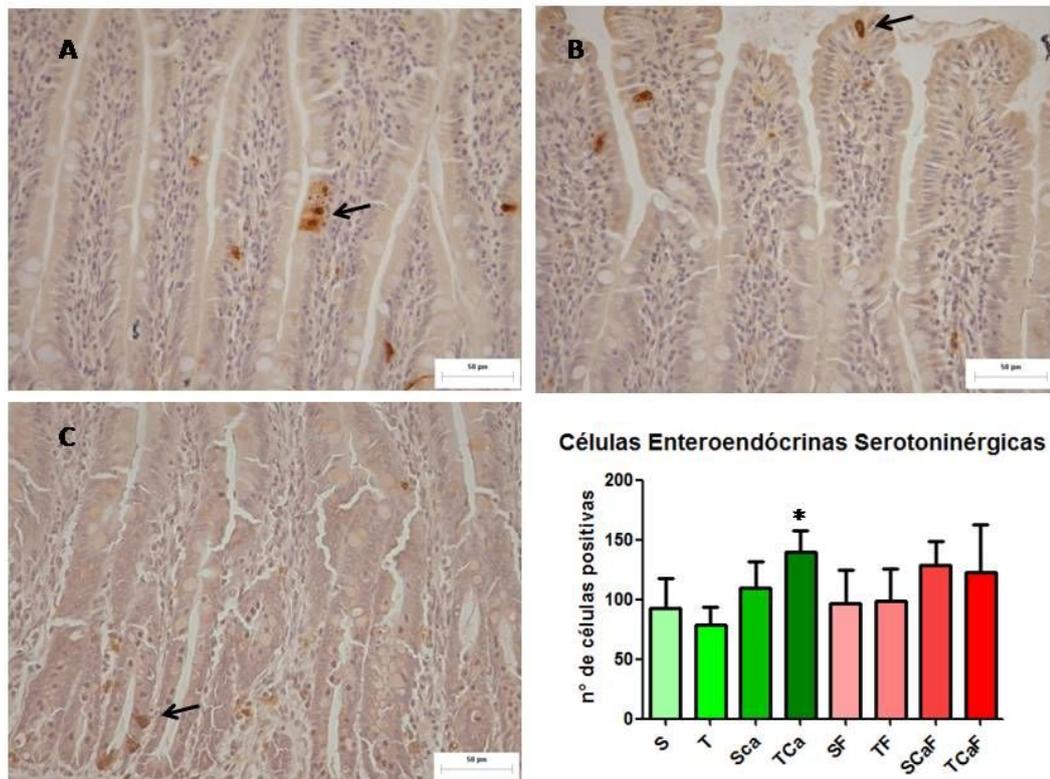
	<b>TRIGLICERÍDEOS</b>	<b>GLICOSE</b>	<b>PROTEÍNAS TOTAIS</b>
<b>S</b>	79,9 $\pm$ 16,5a	85,9 $\pm$ 7,6a	6,8 $\pm$ 0,9a
<b>SCa</b>	94,8 $\pm$ 13,1a	112,1 $\pm$ 18,9a,b	6,9 $\pm$ 0,5a
<b>T</b>	71,4 $\pm$ 11,5a	83,6 $\pm$ 6,59a	7,6 $\pm$ 1,6a
<b>TCa</b>	76,6 $\pm$ 10,2a	137,3 $\pm$ 12,0a,b	6,4 $\pm$ 0,3a
<b>SF</b>	47,5 $\pm$ 5,4a	153,9 $\pm$ 10,9b	5,4 $\pm$ 0,4a
<b>SCaF</b>	79,6 $\pm$ 14,4a	165,4 $\pm$ 15,5b	7,9 $\pm$ 0,4a
<b>TF</b>	49,5 $\pm$ 6,1a	148,5 $\pm$ 6,49b	6,3 $\pm$ 0,2a
<b>TCaF</b>	89,3 $\pm$ 13,0a	146,6 $\pm$ 8,9b	7,2 $\pm$ 0,6a

(1) Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ). Análise de variância One-Way ANOVA, pós teste de Tukey.

**TABELA 4.** Análise da parede intestinal: espessura da parede total ( $\mu\text{m}$ ), túnica mucosa e muscular ( $\mu\text{m}$ ), altura de vilos ( $\mu\text{m}$ ), profundidade de criptas ( $\mu\text{m}$ ), razão vilos/cripta, índice metafásico (%) e índice de células caliciformes (%) de ratos dos grupos sedentários (S), sedentários cafeteria (SCa), treinados (T), treinados cafeteria (TCa), sedentários fibras (SF), sedentários cafeteria fibras (SCaF), treinados fibras (TF) e treinados cafeteria fibras (TCaF). Os valores são expressos como média  $\pm$  erro padrão (n=5).

	<b>PAREDE TOTAL</b>	<b>TÚNICA MUCOSA</b>	<b>TÚNICA MUSCULAR</b>	<b>ALTURA DE VILO</b>	<b>PROFUNDIDADE DE CRIPTA</b>	<b>RAZÃO VILO/CRYPTA</b>	<b>ÍNDICE METAFÁSICO</b>	<b>ÍNDICE DE CÉLULAS CALICIFORMES</b>
<b>S</b>	635,6 $\pm$ 2,7a	502,8 $\pm$ 1,8a	70,05 $\pm$ 0,84 <sup>a</sup>	305,3 $\pm$ 24,0a	170,4 $\pm$ 4,1a	1,83 $\pm$ 0,10a	5,1 $\pm$ 1,1a	15,4 $\pm$ 0,7a
<b>SCa</b>	655,8 $\pm$ 3,36b	562,8 $\pm$ 2,7b	64,91 $\pm$ 0,89b	368,5 $\pm$ 13,6b,c	210,9 $\pm$ 16,01b	1,72 $\pm$ 0,06a	6,2 $\pm$ 1,0a	22,2 $\pm$ 2,1b
<b>T</b>	639,0 $\pm$ 2,71a	497,5 $\pm$ 2,7a	68,86 $\pm$ 0,65a,b	313,4 $\pm$ 13,6a	163,7 $\pm$ 7,1a	1,91 $\pm$ 0,10a	6,4 $\pm$ 1,0a	12,1 $\pm$ 0,1a
<b>TCa</b>	653,8 $\pm$ 3,48b	564,8 $\pm$ 2,7b	58,86 $\pm$ 1,07c	363,5 $\pm$ 10,7b	156,0 $\pm$ 2,0a	1,83 $\pm$ 0,07a	4,9 $\pm$ 0,9a	19,2 $\pm$ 1,4b
<b>SF</b>	732,6 $\pm$ 22,27c	548,6 $\pm$ 3,8c	65,81 $\pm$ 0,95a,b	364,5 $\pm$ 13,7b	240,8 $\pm$ 4,8b	1,70 $\pm$ 0,04a	5,48 $\pm$ 1,1a	13,6 $\pm$ 0,4a
<b>SCaF</b>	771,4 $\pm$ 5,24d	632,9 $\pm$ 5,5d	75,61 $\pm$ 0,90d	449,2 $\pm$ 20,0c	241,7 $\pm$ 7,2b	2,01 $\pm$ 0,08a	5,43 $\pm$ 0,8a	14,8 $\pm$ 0,9a
<b>TF</b>	696,8 $\pm$ 4,18c	542,4 $\pm$ 2,87c	82,94 $\pm$ 1,53d	337,9 $\pm$ 4,1a	172,1 $\pm$ 8,9a	1,79 $\pm$ 0,03a	6,1 $\pm$ 1,1a	13,52 $\pm$ 0,5a
<b>TCaF</b>	763,0 $\pm$ 3,91d	630,3 $\pm$ 5,57d	75,72 $\pm$ 0,60d	419,7 $\pm$ 20,75b,c	182,4 $\pm$ 9,95a	2,10 $\pm$ 0,013a	5,8 $\pm$ 0,7a	13,58 $\pm$ 0,2a

(1) Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ). Análise de variância One-Way ANOVA, pós teste de Tukey.



**Fig.2**Imunohistoquímica evidenciando células enteroendócrinas serotoninérgicas positivas ao longo do vilão (A e B) e cripta (C). O gráfico apresenta o número médio de células positivas dos grupos sedentários (S), sedentários cafeteria (Sca), treinados (T), treinados cafeteria (TCa), sedentários fibras (SF), sedentários cafeteria fibras (ScaF), treinados fibras (TF) e treinados cafeteria fibras (TCaF). (\*) $p < 0,05$  em relação ao grupo T. Análise de variância One-Way ANOVA, pós teste de Tukey.

---

---

*Efeitos da dieta de cafeteria associada à  
suplementação com fibras hidrossolúveis  
sobre a inervação intrínseca do jejuno de  
ratos wistar*

**EFEITOS DA DIETA DE CAFETERIA ASSOCIADA À SUPLEMENTAÇÃO COM FIBRAS HIDROSSOLÚVEIS SOBRE A INERVAÇÃO INTRÍNSECA DO JEJUNO DE RATOS WISTAR.**

- Carla Possani Cirilo<sup>1</sup>Maria Raquel Marçal Natali<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Ciências Morfológicas – Universidade Estadual de Maringá (UEM)

C. P. Cirilo

Departamento de Ciências Morfológicas – Universidade Estadual de Maringá (UEM).  
Av. Colombo, 5.790, Jardim Universitário - Maringá, Paraná, Brasil. CEP 87020-900,  
Tel.:+55-44-30114706, Fax: +55-44-30114340. e-mail: mrmnatali@uem.br

## RESUMO

**Introdução:** A obesidade é fator de risco para o desenvolvimento de várias patologias, incluindo as gastrointestinais, podendo comprometer a inervação intrínseca intestinal realizada pelo sistema nervoso entérico. A inclusão de fibras hidrossolúveis na dieta pode prevenir alterações decorrentes da obesidade, mas não há estudos que investigue possíveis efeitos desta inclusão sobre a inervação intrínseca intestinal, sendo este o objeto deste estudo. **Métodos:** Foram utilizados 20 ratos com 60 dias de idade, distribuídos em 4 grupos: Sedentários (S), Sedentários Cafeteria (SCa), Sedentários Fibras (SF) e Sedentários Cafeteria Fibras (SCaF). A obesidade foi induzida por dieta de cafeteria por 14 semanas, e a suplementação diária com fibras hidrossolúveis via gavagem 0,5ml/dia/animal(0,2g de fibras por ml) por 10 semanas. Após 14 semanas os animais foram anestesiados, e coletado os tecidos adiposos retroperitoneal, periepídicimo e mesentérico. Fragmentos do jejuno foram destinados para análise da espessura da túnica muscular, e para histoquímica dos neurônios NADH diaforase positivos e imunohistoquímica da população neuronal geral mioentérica HuC/D, subpopulações nitrérgica (nNOS) e colinérgica (ChAT) e glia entérica (S100). Os dados foram submetidos à análise estatística com nível de significância de 5%. **Resultados:** Constatou-se efeito positivo da inclusão de fibras na dieta (SF) com redução do consumo alimentar, peso corporal e gordura mesentérica, apenas quando associada a dieta padrão. Os animais obesos (SCa e SCaF) apresentaram maiores ( $p < 0,05$ ) depósitos de tecidos adiposos retroperitoneal, periepídicimo e mesentérico, independente da suplementação com fibras. A túnica muscular estava reduzida nos animais SCa e aumentada nos animais SF comparado ao grupo S. Manutenção da inervação intrínseca intestinal foi detectado pela análise morfoquantitativa nos quatro grupos analisados, porém com aumento ( $p < 0,05$ ) no perfil celular da subpopulação nitrérgica nNOS e manutenção deste parâmetro para os neurônios HuC/D, ChAT, NADH diaforase e glia entérica. **Conclusões e principais inferências:** A inervação intrínseca intestinal foi mantida nos animais obesos por dieta de cafeteria e/ou suplementados com fibras hidrossolúveis, porém o perfil celular da subpopulação nitrérgica aumentado nos animais suplementados com fibras hidrossolúveis (SF e SCaF) pode indicar maior atividade destes neurônios que possuem papel inibitório, este resultado pode estar associado ao papel da fibra hidrossolúvel em reduzir o trânsito intestinal.

**Palavras-chave:** dieta de cafeteria, fibras hidrossolúveis, obesidade, plexo mioentérico

## ABSTRACT

**Background:** Obesity is a risk factor for the development of many health complications, including gastrointestinal diseases, and it may compromise the intestinal intrinsic innervation carried out by the enteric nervous system. The inclusion of soluble fibers in the diet can prevent changes resulting from obesity, but there are no studies that investigated the possible effects of this supplementation on the intestinal intrinsic innervation, which was the aim of this study. **Methods:** Twenty rats (60 days old) were distributed into 4 groups: sedentary (S), sedentary cafeteria (SCa), sedentary fibers (SF) and sedentary cafeteria and fibers (SCAF). Obesity was induced by cafeteria diet (*ad libitum*) for 14 weeks, with the fibers supplementation via gavage beginning after 4 weeks and maintained for the last 10 weeks of treatment. Food intake and body weight were monitored during the experimental period. After 14 weeks, the animals were anesthetized and the retroperitoneal, periepididymal and mesenteric adipose deposits were collected. Segments of the jejunum were used for the immunohistochemical analysis of NADHdiaphorase-positive neurons, immunofluorescence for the myenteric general neuronal population (HuC/D), nitrergic (nNOS) and cholinergic (ChAT) subpopulations, and the enteric glia (S100). Morphoquantitative analyses were performed using the Image-Pro Plus® 4.5 software (Media Cybernetics, Inc.), and data were subjected to statistical analyses with 5% significance level. **Key Results:** The supplementation of fibers in the diet had a positive effect on food intake, body weight and mesenteric fat deposits only when associated with the standard chow. Obese animals had higher ( $p<0.05$ ) deposits of retroperitoneal, periepididymal and mesenteric adipose tissue, regardless of fiber supplementation. The morphoquantitative analyses showed that the intestinal intrinsic innervation was maintained in the four studied groups, with increased ( $p<0.05$ ) cellular profile in the nitrergic subpopulation only and the maintenance of this parameter in other cell types. **Conclusions & Inferences:** Intestinal intrinsic innervation was maintained in the animals obese by cafeteria diet and/or supplemented with soluble fibers. The increased cellular profile of the nitrergic subpopulation in animals supplemented with soluble fibers (SF and SCAF) may indicate increased activity of these neurons that have inhibitory function, and this result may be linked to the role of soluble fibers in reducing intestinal transit.

**Keywords:** cafeteria diet, obesity, water-soluble fibers, myenteric plexus.

## INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença crônica, de difícil tratamento e fator de risco para o desenvolvimento de várias patologias como diabetes melittus, hipertensão e alguns tipos de câncer, além de gerar dificuldades respiratórias, problemas cardiovasculares e no aparelho locomotor. É definida como o acúmulo excessivo de gordura corporal,<sup>1</sup> desencadeada na maioria dos casos por balanço energético positivo<sup>2</sup>.

Diferentes dietas são utilizadas para induzir a obesidade em animais experimentais como a oferta de dieta de cafeteria e dietas hiperlipídicas, com taxas aumentadas de carboidratos e/ou lipídios<sup>3</sup>. Na dieta de cafeteria, acrescenta-se num rodízio vários alimentos hipercalóricos, hiperlipídicos, hipoprotéicos e de alta palatabilidade, a qual os animais a preferem em relação à ração padrão, levando a um balanço energético positivo e indução da obesidade, semelhante a obesidade em humanos<sup>4,5</sup>.

A obesidade aumenta o risco de problemas e/ou disfunções orgânicas gerais, incluindo as gastrointestinais, como refluxo gastroesofágico, maior capacidade de distensão e volume gástrico no jejum e modificações na motilidade.<sup>6</sup> Além de mudanças em aspectos funcionais, alterações estruturais na parede dos intestinos delgado e grosso também são constatados em quadros de obesidade.<sup>4</sup> Danos que interferem no funcionamento do intestino podem resultar de alterações nos componentes que o inervam.<sup>7</sup> Para garantir um funcionamento normal de todo o TGI, é essencial que a integridade neural deste sistema seja mantida.<sup>8</sup>

A ingestão excessiva de alimentos leva as células a um estado de estresse oxidativo, que ocorre quando a produção de radicais livres excede a sua capacidade antioxidante,<sup>9</sup> podendo ocasionar danos em componentes importantes do trato gastrointestinal (TGI) comprometendo a inervação intrínseca intestinal realizada pelo sistema nervoso entérico (SNE)<sup>10</sup> já que os neurônios que compõem este sistema são mais vulneráveis aos danos causados pelo acúmulo de radicais livres devido ao seu grande tamanho, intensa atividade metabólica e reduzida defesa antioxidante.<sup>11</sup>

O SNE é formado por circuitos reflexos completos, incluindo neurônios sensitivos, interneurônios e várias classes de neurônios motores, responsáveis pelo controle da motilidade, secreção e fluxo sanguíneo do trato digestório.<sup>12</sup> Estes neurônios apresentam distribuição distinta quanto à densidade, morfologia, função de substâncias neurotransmissoras ou neuromoduladoras.<sup>13</sup> Dentre as subpopulações neuronais, destacam-se as subpopulações neuronais nitrérgica e colinérgica, que juntas

quantificam quase toda a população total do plexo mioentérico de ratos.<sup>14</sup>

Na literatura encontramos manutenção da densidade neuronal no íleo de ratos obesos por administração de glutamato monossódico (MSG),<sup>10</sup> e no jejuno de ratos obesos por dieta de cafeteria.<sup>4</sup> Em estudo com camundongos obesos por dieta hiperlipídica foi detectado redução do número de neurônios no íleo, e manutenção no duodeno e jejuno.<sup>15</sup> Apesar da manutenção da densidade neuronal nos diferentes modelos de obesidade alterações no perfil celular são observados, com maior perfil celular nos neurônios do jejuno de ratos obesos por dieta de cafeteria<sup>4</sup> e redução nos neurônios do duodeno, jejuno e íleo de camundongos obesos por dieta hiperlipídica,<sup>15</sup> demonstrando a plasticidade desses neurônios frente as dietas.

Além de neurônios, células gliais entéricas residem na mucosa gastrointestinal e nos plexos submucoso e mioentérico do sistema nervoso entérico, bem como nas camadas musculares do TGI, com papel de proteger os neurônios, regular a oferta de substrato auxiliando na neurotransmissão do TGI, atuar na renovação neuronal, defesa do hospedeiro gastrointestinal, motilidade, secreção e absorção.<sup>16</sup> Assim, alterações na população de células gliais podem influenciar a atividade neuronal entérica resultando em mudanças da função gastrointestinal.

A população mundial demonstra crescente preocupação com a alimentação e seus constituintes, incentivando, deste modo, o investimento da indústria em produtos saudáveis, os chamados alimentos e suplementos funcionais.<sup>17</sup> Dentre os suplementos alimentares que beneficiam a saúde e a função gastrointestinal, destaca-se as fibras alimentares, por estarem relacionadas ao metabolismo microbiano gastrointestinal, na redução da absorção de energia, na prevenção de doenças como obesidade, diabetes, dislipidemia<sup>18</sup>, além de influenciar na motilidade do TGI.<sup>19</sup>

Constatamos na literatura escassez de estudos que avaliam a influência da obesidade associada à suplementação com fibras hidrossolúveis sobre as subpopulações neuronais e células gliais do TGI. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos da dieta de cafeteria acompanhada da suplementação com fibras hidrossolúveis sobre a inervação intrínseca do jejuno de ratos Wistar.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### *Animais e tratamento*

Foram utilizados 20 ratos machos da linhagem Wistar com 60 dias de idade, mantidos em caixas de polipropileno (quatro animais/caixa) com temperatura de 25<sup>0</sup>C, fotoperíodo de 12 horas claro/12 horas escuro, controlados por timer *Brasfort*®. Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais (n=5): Sedentários (S), Sedentários Cafeteria (SCa), Sedentários Fibras (SF) e Sedentários Cafeteria Fibras (SCaF). Todos os procedimentos envolvendo a experimentação animal foram aprovados pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação da Universidade Estadual de Maringá (Protocolo 093/2012).

Os grupos S e SF receberam ração padrão para roedores NuvilabCr1®(22g de proteína/100g de ração e 7g de fibras/100g de ração)e água *ad libitum*.

Nos grupos SCa eSCaF a obesidade foi induzida por meio da oferta da dieta de cafeteria por um período de 14semanas, sendo iniciada aos 60 dias de idade dos animais. Esta dieta consistiu dos seguintes alimentos: chips, marshmallow, geléia de mocotó, salsichas, mortadela, refrigerante, pão francês e bolachas, além da ração comercial e água *ad libitum*. Os alimentos da dieta foram organizados em um cardápio, disponibilizados e monitorados diariamente (Tabela 1).

A média da ingestão alimentar de todos os grupos, foi obtida diariamente por meio da subtração entre a pesagem do alimento oferecido e a sobra deste na gaiola, sendo também estimado o consumo de líquidos, valor calórico da dieta e o peso corporal. As informações nutricionais dos alimentos presentes na dieta de cafeteria foram retiradas dos rótulos dos próprios alimentos.

Após 4 semanas de início da dieta os grupos SF e SCaF passaram a receber suplementação com fibras hidrossolúveis (17%) composta de 40% de inulina e 60% de goma-guar (Fiber Mais Nestlé), a qual foi preparada e administrada por gavagem 0,5ml/dia/animal (0,2g de fibras/ml), durante 10semanas.

### *Coleta de tecidos*

Ao final das 14 semanas os ratos foram pesados e anestesiados intraperitonealmente com tiopental sódico (Thionembital®) (40mg/kg). Posteriormente foi realizada laparotomia para a coleta das gorduras periepididimal, retroperitonal e mesentérica e o intestino delgado foi retirado a partir do piloro até a junção ileocecal, e

mensurado o seu comprimento e circunferência para cálculo da área. Amostras do jejuno foram destinadas para análise morfométrica da túnica muscular, histoquímica de neurônios mioentéricos NADH-diaforase positivos para avaliar o atividade bioquímica neuronal e imunohistoquímica para dupla marcação HuC/D-S100, marcador da população geral de neurônios e glia entérica e dupla marcação nNOS/ChAT marcador de subpopulação neuronal nitrérgica e colinérgica respectivamente.

#### *Análise histológica da túnica muscular externa*

Amostras do jejuno foram abertas na borda mesentérica e fixadas em formol tamponado, posteriormente desidratadas em séries de concentrações crescentes de álcool (80%, 90% e 100%), diafanizadas em xilol e incluídas em parafina para obtenção de cortes histológicos semi-seriados com 6  $\mu\text{m}$  de espessura, em micrótomo Leica RM 2145, os quais foram corados pelo método de Hematoxilina-Eosina (HE), com objetivo de avaliar a espessura da túnica muscular. Foram mensurados 100 pontos aleatórios da túnica muscular externa em 10 cortes histológicos/animal ( $\mu\text{m}$ ).

#### *Análise da inervação intrínseca mioentérica*

##### *Histoquímica dos neurônios NADH diaforase positivos*

Amostras do jejuno foram lavadas e preenchidas com solução tampão de Krebs, e imersas em mesma solução por 20 minutos à temperatura ambiente, em seguida foram colocadas em solução tampão Krebs com Triton X-100 a 0,3% por 5 minutos; lavadas em solução de Krebs por 10 minutos 4 vezes; incubadas por 45 minutos em 200 ml de solução contendo nitro blue tetrazolium (NBT) (Sigma) 0,5 mg/ml em água destilada (50mL), tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7.3 (50mL), água destilada (100ml) e  $\beta$ -NADH diaforase 0,5 mg/ml, posteriormente a reação foi interrompida com formol tamponado 10%, e fixadas em mesma solução. Preparados totais da túnica muscular foram obtidos através da remoção da túnica mucosa e submucosa de fragmentos do jejuno, por meio de dissecação sob estereomicroscópio com trans-iluminação. Os preparados foram lavados em água destilada, desidratados em serie de concentrações crescentes de alcoóis, diafanizados em xilol e montados entre lâmina e lamínula, com resina sintética Permout.<sup>20</sup>

### *Imunohistoquímica dos Neurônios Mioentéricos e Glia Entérica*

Amostras do jejuno foram lavadas com PBS 0,1M (pH 7.4), amarradas em suas extremidades, preenchidas, distendidas com o fixador paraformaldeído 4% pH 7.4 por 2 horas. Posteriormente foram abertas e lavadas com PBS 0,1 M pH 7.4 por 24 horas a 4°C e armazenadas em PBS 0,1 M pH 7.4 com azida sódica 0,08% a 4°C. Preparados totais da túnica muscular foram obtidos por meio de dissecação sob estereomicroscópio com trans-iluminação.

### *Dupla marcação HuC/D-S100 e nNOS-ChAT*

Os preparados totais da túnica muscular do jejuno foram submetidos às técnicas imunohistoquímicas para detecção da proteína HuC/D,<sup>21</sup> proteína S100,<sup>22</sup> da enzima óxido nítrico sintase neuronal-nNOS<sup>23</sup> e da enzima colina acetiltransferase (ChAT).<sup>24</sup> Para isto, as membranas foram lavadas duas vezes em PBS 0,1M (pH 7,4) com Triton X-100 a 0,05% por 10 minutos, e bloqueados por 1h em solução contendo PBS 0,1M (pH 7,4), Triton X-100 0,05%, BSA 2% e soro de cabra 10%, a fim de se evitar ligações inespecíficas. Posteriormente os tecidos foram incubados por 48 horas em solução contendo PBS 0,1M (pH 7,4) com Triton X-100 a 0,05%, BSA 2%, soro de cabra 2% e anticorpos primários (Tabela 2). Após a incubação, as membranas foram lavadas três vezes em PBS 0,1M (pH 7,4) com Triton X-100 a 0,05% por 5 minutos e incubadas com os anticorpos secundários (Tabela 2) por duas horas à temperatura ambiente. Posteriormente os preparados foram lavados com PBS e montados entre lâmina e lamínula com meio de montagem para lâminas fluorescentes Antifade (Invitrogen, USA).

### *Análise morfoquantitativa*

A quantificação da população neuronal mioentérica NADH diaforase positiva, população neuronal geral HuC/D, subpopulação nitrérgica nNOS-positivos e ChAT-positivos e glia entérica (S-100), foi realizada em 64 imagens microscópicas capturadas por animal nas regiões intermediária (32 imagens) e antimesentérica (32 imagens) da circunferência intestinal, utilizando microscópio óptico motorizado com câmera acoplada Olympus FSX100, utilizando objetiva de 20X. Para todas as reações a área total analisada por animal foi de 9,5 mm<sup>2</sup>. Foi mensurada a área de 100 corpos celulares/animal por técnica através do programa Image-Pro Plus versão 4.5-MediaCibernetics).

*Análise estatística*

A análise estatística dos dados foi realizada com o auxílio do programa estatístico GraphPadPrism<sup>®</sup> 5.0 (GraphPad Software, Inc.). Os dados numéricos foram inicialmente submetidos ao teste Kolmogorov-Smirnov (K-S) para a verificação da normalidade. Todos os dados foram paramétricos e submetidos à análise de variância (ANOVA) e como pós teste para comparação das médias foi utilizado o teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5% e os resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão.

## RESULTADOS

### *Ingestão alimentar e parâmetros corporais*

Os resultados para ingestão alimentar e parâmetros corporais estão apresentados da tabela 3.

Nos animais obesos pela dieta de cafeteria (SCa e SCaF) verificamos que não ocorreu hiperfagia e que o excedente energético foi provocado por maior consumo calórico ( $p < 0,05$ ), resultando em animais obesos comprovado pelo aumento da somatória do peso absoluto dos tecidos adiposos ( $p < 0,05$ ) e peso relativo dos tecidos adiposos retroperitoneal, periepididimal e mesentérico ( $p < 0,05$ ), apesar da manutenção do ganho de massa corporal e peso corporal.

A suplementação com fibras hidrossolúveis, por 10 semanas, teve efeito positivo apenas quando associada dieta padrão para roedores, pois os animais SF, comparado aos demais grupos (S, SCa e SCaF) apresentaram redução do consumo alimentar ( $p < 0,05$ ), consumo calórico ( $p > 0,05$ ) e ganho de massa corporal, com menor peso corporal final e peso relativo do tecido adiposo mesentérico, sem influência sobre o peso absoluto dos tecidos adiposos e peso relativo das gorduras retroperitoneal e periepididimal.

### *Área do intestino delgado e túnica muscular externa*

A área do intestino e espessura da túnica muscular compreendida pelas camadas musculares longitudinal interna e circular externa são apresentados na Tabela 4. A dieta de cafeteria por 14 semanas e a suplementação com fibras hidrossolúveis por 10 semanas não alterou significativamente a área do intestino delgado. Detectamos redução ( $p < 0,05$ ) da espessura da túnica muscular nos animais que receberam dieta de cafeteria (SCa) e aumento da espessura ( $p < 0,05$ ) quando associada a suplementação com fibras hidrossolúveis (SCaF), comparando aos controle S, com manutenção deste parâmetro nos animais SF.

### *Inervação intrínsecamioentérica intestinal*

Os resultados quantitativos para os neurônios mioentéricos e células da glia são apresentados na Tabela 4. A morfologia ganglionar foi preservada, independente dos grupos ou técnica utilizada para evidenciação dos neurônios mioentéricos (Fig.1 A-F).

Com a dupla marcação HuC/D-S100, evidenciou-se que os corpos celulares gliais eram menores do que os corpos neuronais, porém com predomínio numérico

sobre eles, numa proporção aproximada de 1 neurônio para 1,41; 1,47; 1,37 e 1,43 células da glia nos grupos S, S<sub>Ca</sub>, SF e S<sub>CaF</sub> respectivamente (Fig.1A,B e C).A dupla marcação nNOS-ChAT revelou que os neurônios nitrérgicos localizavam-se na periferia do gânglio, enquanto que os neurônios colinérgicos encontravam-se preferencialmente no interior do mesmo (Fig.1D,E eF).

A dieta de cafeteria e a suplementação com fibras não alterou quantitativamente a população HuC/D, as subpopulações nNOS positiva e ChAt positiva, e a glia entérica comparando os quatro grupos analisados (S, S<sub>Ca</sub>, SF e S<sub>CaF</sub>), demonstrando preservação da inervação intrínseca. Resposta semelhante foi observada para a análise quantitativa pela técnica histoquímica NADH diaforase nos quatro grupos analisados (S, S<sub>Ca</sub>, SF e S<sub>CaF</sub>), apesar de observar redução ( $p>0,05$ ) de 9,62% e 9,47% do número médio de neurônios marcados nos grupos SF e S<sub>CaF</sub> respectivamente, em relação ao controle S.

Com relação à análise morfométrica, não foi observada diferenças na área média do perfil celular (PC) da população neuronal NADH diaforase, HuC/D, subpopulação nNOS positiva e ChAT positiva e células gliais entre os grupos S e S<sub>Ca</sub>, indicando ausência do efeito da dieta sobre a inervação intrínseca intestinal. Nos animais submetidos à suplementação com fibras hidrossolúveis (SF e S<sub>CaF</sub>), observou-se aumento na área do PC da subpopulação nitrérgica ( $p<0,05$ ), sem efeito sobre a subpopulação colinérgica, população neuronal NADH diaforase, população neuronal HuC/D e glia entérica (Tabela 5).

## DISCUSSÃO

### *Ingestão alimentar e parâmetros corporais*

A dieta de cafeteria administrada aos ratos dos grupos SCa e SCaF durante 10 semanas desenvolveu a obesidade, apesar do comportamento normofágico destes animais, uma vez que ingeriram a mesma quantidade em gramas, porém com maior aporte calórico. Constatamos aumento significativo, nos depósitos de tecidos adiposos retroperitoneal, periepididimal e mesentérico nos animais SCa e SCaF. Resultados semelhantes quanto ao consumo calórico,<sup>4,5</sup> devido ao alto teor de lipídeos da dieta, levando ao acúmulo de tecidos adiposos mesmo com a manutenção do peso corporal e ganho de massa corporal<sup>25</sup> são descritos na literatura, o que comprova a eficiência do modelo experimental.

A suplementação com fibras hidrossolúveis, por 10 semanas, teve efeito positivo apenas quando associada a dieta padrão para roedores (SF), por reduzir o consumo alimentar e calórico, resultando em menor ganho de massa corporal, peso corporal final e acúmulo de tecido adiposo, sem efeito em atenuar a obesidade quando associada a dieta cafeteria.

O suplemento de fibras utilizado neste experimento é composto por 40% de inulina e 60% de goma-guar, ambos de natureza hidrossolúvel<sup>26,27</sup> e aumentam a viscosidade do conteúdo luminal, diminuindo a velocidade do trânsito intestinal.<sup>19</sup> A inulina e goma-guar não são absorvidas no intestino delgado, mas são fermentadas por bactérias no intestino grosso, modulando a microbiota intestinal.<sup>18,26</sup>

Nossos resultados para o grupo SF corroboram com os descritos na literatura. Isken e colaboradores<sup>28</sup> observaram que camundongos que ingeriram dieta rica em gordura associada a suplementação com fibras hidrossolúveis apresentaram maior ganho de massa corporal. Segundo Lattimer and Haub,<sup>19</sup> este tipo de fibra apresenta redução da absorção de energia apenas quando associada a dieta com baixo teor de gordura, assim pode ter o papel em reduzir ou aumentar o peso corporal influenciada pelo baixo ou alto teor de gordura da dieta.

### *Área do intestino delgado e espessura da túnica muscular externa*

Manutenção da área do intestino delgado foi observada nos quatro grupos analisados. O intestino delgado pode sofrer aumento no seu comprimento ao longo do desenvolvimento<sup>29</sup> ou influenciada pela dieta,<sup>15</sup> o que levaria a variação na área do

intestino, provocando diluição da densidade neuronal, ou maior concentração de neurônios por área. Para contornar este problema é descrito na literatura a utilização de um fator de correção, para evitar erros nas análises morfoquantitativas.<sup>30</sup> Como em nosso experimento a área do intestino não sofreu alterações significativas, não foi utilizado fator de correção para análise quantitativa neuronal.

Resposta diferenciada com relação à espessura da túnica muscular foi constatada frente à dieta e a suplementação com fibras. A dieta de cafeteria (SCa) isolada promoveu redução da túnica muscular, porém quando associada à suplementação com fibras hidrossolúveis (SCaF) ocorreu aumento na túnica muscular, e manutenção foi observada nos animais que se alimentavam de dieta padrão e foram suplementados com fibras (SF).

Contrariamente, dados da literatura demonstram hipertrofia da túnica muscular no jejuno de ratos obesos por dieta de cafeteria por 16 semanas<sup>4,5</sup>. Já Soares et al.<sup>15</sup> detectaram aumento da espessura da túnica muscular do duodeno, manutenção no jejuno e redução no íleo de camundongos obesos por dieta hiperlipídica. Redução da túnica muscular externa, como observado em nosso estudo para o grupo SCa, também é resultado freqüente em modelos que utilizam dieta hipoproteica<sup>31,32</sup> e restrição alimentar.<sup>33,34</sup> Esta resposta é atribuída a menor disponibilidade de aminoácidos na dieta, como a dieta de cafeteria é caracterizada como hipoprotéica,<sup>4</sup> menor aporte de aminoácidos poderia afetar a síntese de proteínas na musculatura intestinal ou levar a degradação protéica da musculatura para promover aminoácidos endógenos e compensar o consumo de aminoácidos,<sup>35</sup> justificando os resultados para os ratos do grupos SCa.

Porém, nos animais cafeteria que receberam a suplementação com fibras (SCaF) hidrossolúveis detectamos resposta contrária sobre a espessura da túnica muscular, que pode estar relacionada ao papel das fibras hidrossolúveis sobre a motilidade intestinal, em alterar a viscosidade do conteúdo luminal, atrasando o tempo do trânsito e permitindo a mais completa absorção nutriente,<sup>19</sup> isso levaria a maior aproveitamento dos aminoácidos da dieta. Outro fator a ser considerado é que o aumento da atividade inibitória dos neurônios nitrérgicos acompanhada da redução da atividade dos neurônios colinérgicos podem levar a hipertrofia da túnica muscular como mecanismo compensatório.<sup>34</sup>

A túnica muscular pode se modelar, influenciada pelo ambiente luminal, e a absorção de nutrientes no intestino delgado pode ser afetado pela motilidade

intestinal.<sup>36</sup> Fu e colaboradores,<sup>37</sup> mensuraram a tensão muscular em segmentos isolados do duodeno e íleo de ratos alimentados por dieta hiperlipídica, e verificaram a motilidade reduzida no duodeno e aumentada no íleo.

As variações observadas na espessura da túnica muscular demonstram a capacidade desta de adaptar-se a mudanças do lúmen, pelo maior aporte calórico oferecido, e quando associada à suplementação com fibras. Além disso, Schoffen e colaboradores<sup>35</sup> relatam que a influência da inervação intrínseca sobre este tecido deve ser considerada, pois, alterações no volume da musculatura lisa poderia promover aumento ou redução no número e tamanho do corpo celular de neurônios do plexo mioentérico, já que a inervação e plasticidade neuronal estão intimamente relacionadas entre si.<sup>38</sup>

#### *Análise da inervação intrínseca intestinal*

A morfologia ganglionar foi preservada, independente do grupo ou técnica utilizada para evidenciação dos neurônios do plexo mioentérico. Com a dupla marcação HuC/D-S100 constatou-se predomínio de células gliais em torno de 1,4 células da glia para 1 neurônios, corroborando com os descritos da literatura.<sup>33</sup> Com relação a técnica nNOS-ChAT observamos que a subpopulação nitrérgica encontrava-se na periferia do gânglio enquanto os neurônios colinérgicos localizavam-se preferencialmente no interior do mesmo, como observado por Schoffen e colaboradores.<sup>34</sup>

O TGI pode se adaptar rapidamente e eficientemente aos desafios dietéticos, e o sistema nervoso entérico é sensível ao estado nutricional, podendo alterar seus processos e se reprogramar, modificando o trânsito intestinal em função da dieta.<sup>39</sup> Neurônios mioentéricos estão envolvidos no controle da motilidade. O circuito entérico responsável pela peristalse, é caracterizado por uma inervação envolvendo neurônios ascendentes excitatórios como neurônios colinérgicos e neurônios descendentes inibitórios como neurônios nitrérgicos.<sup>40</sup>

Podemos considerar que o circuito entérico em termos quantitativos foi preservado, pois não verificamos alterações no número médio de neurônios HuC/D, nNOS, ChAT e NADH diaforase considerando a dieta e/ou a suplementação por 10 semanas com fibras hidrossolúveis.

A acetilcolina é o principal neurotransmissor dos neurônios motores do TGI neste tecido e outros neurotransmissores, como a substância P aparentemente desempenham papéis unicamente adicionais.<sup>41</sup> Os neurônios nitrérgicos, responsáveis

pela síntese de óxido nítrico por meio da óxido nítrico sintase, e os neurônios colinérgicos, que secretam acetilcolina sintetizada pela colina acetiltransferase, representam duas distintas subpopulações que juntas quantificam quase toda a população neuronal mioentérica de ratos.<sup>14</sup> Danos que interferem no funcionamento do intestino podem resultar em alterações nos componentes que o inervam.<sup>7</sup> Para garantir um funcionamento normal de todo o TGI, é essencial que a integridade neural deste sistema seja mantida.<sup>8</sup>

Na literatura constatamos predomínio na manutenção da densidade neuronal mioentérica com diferentes técnicas. A análise morfoquantitativa da população neuronal mioentérica em modelo experimental de obesidade induzida por dieta de cafeteria por 120 dias, detectou-se manutenção no número e na área dos corpos celulares dos neurônios mioentéricos corados pela técnica de Giemsa no jejuno de ratos Wistar adultos.<sup>4</sup> Soares et al.<sup>15</sup> também verificaram manutenção da população geral de neurônios miosina-V imunorreativos de camundongos obesos por dieta hiperlipídica, porém aumento da densidade da subpopulação nitrérgica, marcada por imunohistoquímica foi detectada. Tal resposta é sugestivo de alteração na motilidade intestinal, uma vez que 90% dos neurônios nitrérgicos nNOS que inervam o intestino delgado de roedores são neurônios motores inibitórios e 10% interneurônios<sup>42</sup> a qual estão relacionados a motilidade local reflexa.

Em nosso estudo verificamos que a integridade das populações neuronais foi mantida, nos quadro grupos analisados (S, SCa, SF e SCaF) pelas técnicas imunohistoquímicas e com manutenção também do número médio de neurônios pela técnica histoquímica NADH diaforase, a qual permite evidenciar cerca de 80% do número total de neurônios,<sup>43</sup> identificando os neurônios metabolicamente ativos. Apesar da manutenção observada, verificamos que nesta técnica (NADH diaforase), em porcentagem, os animais suplementados com fibras SF e SCaF apresentaram redução da marcação em 9,62% e 9,47% respectivamente, em relação ao controle S.

Esta técnica está relacionada com a atividade da enzima NADH-diaforase, que funciona como desidrogenase na produção de energia pelos neurônios, nos dando informações sobre os processos bioquímicos celulares, incluindo a cadeia respiratória.<sup>10</sup> Como as fibras hidrossolúveis, influenciam na motilidade intestinal, reduzindo a velocidade do trânsito intestinal,<sup>19</sup> a redução em torno de 9,5% da marcação nos animais SF e SCaF, é sugestivo que a atividade metabólica desses neurônios possam estar reduzida.

Em associação com esta resposta, verificamos que nos animais suplementados com fibras hidrossolúveis (SF e SCaF) o perfil celular na subpopulação neuronal nNOS, estava aumentado, com manutenção deste parâmetro para a subpopulação colinérgica, população geral HuC/D e NADH diaforase positiva. Esta resposta pode estar relacionada ao aumento na atividade neuronal nitrérgica, o que implicaria em trânsito intestinal mais lento e aumento na retenção e absorção de nutrientes, assim como descrito por Soares e colaboradores.<sup>15</sup>

Como mencionado, as fibras hidrossolúveis interferem na motilidade intestinal, atrasando o tempo do trânsito intestinal,<sup>19</sup> enquanto que as fibras insolúveis aceleraram a passagem.<sup>26</sup> Mitsui e colaboradores<sup>41</sup> em estudo com ratos de 60 dias alimentados com dieta contendo 5% de fibras hidrossolúvel (goma-guar) ou insolúvel (celulose) por 27 dias, verificaram redução da atividade funcional colinérgica por meio de estimulação por campo elétrico e indução por carbacol e substância P nos animais que receberam dieta contendo fibras hidrossolúveis em comparação aos suplementados com fibras insolúveis, demonstrando o efeito dessas fibras sobre a motilidade intestinal.

Em associação as respostas neuronais, detectamos manutenção da glia entérica quanto a densidade e perfil celular. Estas células se encontram dentro dos plexos ganglionados em associação com os neurônios entéricos, interconectando as fibras nervosas, com papel de suporte estrutural aos neurônios, produção de fatores neurotróficos, participação da resposta imune, fornecimento de substrato para a síntese de neurotransmissores e regulação da barreira epitelial intestinal.<sup>44,45</sup> Destaca-se o fato de que as células gliais secretam proteínas solúveis de ligação de acetilcolina (AChBP) induzida pela liberação de acetilcolina, modulando a transmissão sináptica colinérgica.<sup>46</sup>

A perda de células gliais precede a perda de neurônios entéricos.<sup>47</sup> Cirilo et al.<sup>33</sup> verificaram manutenção da população de células gliais com o envelhecimento e perda dessas células, bem como aumento do perfil celular no íleo de ratos submetidos a restrição alimentar de 50%. Resposta semelhante foi observada por Schoffen et al.<sup>34</sup> no colo proximal de ratos envelhecidos e submetidos a restrição alimentar. Em ambos os casos, a perda de células gliais foi acompanhada da perda neuronal, demonstrando a plasticidade dessas células e sua relação com a atividade neuronal.

A glia entérica possui papel central na homeostase do intestino.<sup>38</sup> Como em nosso experimento, constatamos a manutenção no número e perfil celular das células gliais acompanhada da integridade neuronal, podemos inferir que a inervação intrínseca intestinal foi mantida nos animais obesos por dieta de cafeteria e/ou suplementados com

fibras hidrossolúveis. O maior perfil celular da subpopulação nNOS nos animais SF e SCaF, confirma o papel das fibras hidrossolúveis sobre a motilidade intestinal.

Com base nos resultados obtidos, concluímos que a dieta de cafeteria acompanhada da suplementação com fibras hidrossolúveis pode induzir a modulação da túnica muscular externa, e que apesar desta resposta a inervação intrínseca intestinal foi preservada. O aumento do perfil celular da subpopulação de neurônios nitrérgicos, que possuem papel inibitório, apenas nos animais suplementados com fibras pode estar associado ao papel da fibra hidrossolúvel em reduzir a velocidade do trânsito intestinal.

**Agradecimentos** Os autores agradecem o suporte financeiro da Fundação Araucária - Secretaria da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior do Estado do Paraná e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e o apoio técnico dos laboratórios de Histotécnica Animal e Fisiologia da Universidade Estadual de Maringá.

**REFERÊNCIAS**

1. Carneiro G, Faria NA, Ribeiro Filho FF, Guimarães A, Lenário D, Ferreira SRG.; Zanella MT. Influência da distribuição da gordura corporal sobre a prevalência de hipertensão arterial e outros fatores de risco cardiovascular em indivíduos obesos. *Rev. Ass. Med. Bras.* 2003; **49**: 206-11
2. Jequier, E. Pathways to obesity. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders.* 2002; **26**: 12-17.
3. Nascimento AF, Sugizaki MM, Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Luvizotto RAM, Nogueira CR, Cicogna AC. A hypercaloric pellet-diet cycle induces obesity and comorbidities in Wistar rats. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2008; **52**: 968-974.
4. Scoaris CR, Rizo GV, Roldi LP, Moraes SMF, Proença ARG, Peralta RM, Natali MRM. Effects of cafeteria diet on the jejunum in sedentary and physically trained rats. *Nutrition.* 2010; **26**: 312-20.
5. Almeida FN, Andrade ML, Moraes SMF, Chimin P, Natali KA, Peralta MR, Natali MRM. Obese adult phenotype: Adaptations of small intestine to cafeteria diet and aerobic physical training after weaning. *Science & Sport.* 2014; **29**: 20-26
6. Xing J.; Chen JDZ. Alterations of gastrointestinal motility in obesity. *Obesity Research.* 2004; **12**: 1723-1732.
7. Furness JB, Costa M. Physiology of the gastrointestinal tract. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Leonard R. Johnson: Raven Press, 1987
8. Hansen MB. The enteric nervous system I: organization and classification. *Pharmacol Toxicol.* 2003; **92**: 105-113.
9. Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL. Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocrine Reviews.* 2004; **25**: 612-628.
10. Soares A, Schoffen JPF, Gouveia EM, Natali MRM. Effects of the neonatal treatment with monosodium glutamate on myenteric neurons and the intestine wall in the ileum of rats. *J Gastroenterol.* 2006; **41**: 674-680.
11. Sohal RS, Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science.* 1996; **273**: 59-63.
12. Furness JB, Callaghan BP, Rivera LR, Cho HJ. The enteric nervous system and gastrointestinal innervations: integrated local and central control. In: Lyte M, Cryan JF, editors. *Microbial endocrinology: the microbiota-gut-brain axis in health and disease.* Texas: Springer; 2014. pp 39-72.

13. Sternini C. Structural and chemical organization of the myenteric plexus. *Annual Review of Physiology*. 1988; **50**: 81-93.
14. Nakajima K, Tooyama I, Yasuhara O, Aimi Y, Kimura, H. Immunohistochemical demonstration of choline acetyltransferase of a peripheral type (pChAT) in the enteric nervous system of rats. *J Chem Neuroanat* 2000; **18**: 31-40.
15. Soares A, Beraldi EJ, Ferreira PEB, Bazotte RB, Buttow NC. Intestinal and neuronal myenteric adaptations in the small intestine induced by a high-fat diet in mice. *BMC Gastroenterology*. 2015; **15**:1-9.
16. Stenkamp-Strahm C, Patterson S, Boren J, Gericke M, Balemba O. High-fat diet and age-dependent effects on enteric glial cell populations of mouse small intestine. *Auton Neurosci*. 2013; **177**:199–210.
17. Marques AC, Hautrive TP, Moura CB, Callegaro MGK, Hecktheue LHR. Efeito da linhaça (*Linum usitatissimum L.*) sob diferentes formas de preparo na resposta biológica em ratos. *Rev Nutr*. 2011; **24**: 131-141.
18. Holscher HD, Bauer LL, Gourineni V, Pelkman CL, Fahey Jr. GC, Swanson KS. Agave inulin supplementation affects the fecal microbiota of healthy adults participating in a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial. *J Nutr*. 2015; **45**: 2025-2032
19. Lattimer JM, Haub, MD. Effects of dietary fiber and its components on metabolic health. *Nutrients*. 2010; **2**:1266-89
20. Gabella G. Detection of nerve cells by a histochemical technique. *Experientia*. 1969; **25**: 218-219.
21. Lin Z, Gao N, Hu HZ, Gao C, Kim G, Ren J, Xia Y, Peck OC, Wood JD. Immunoreactivity of Hu proteins facilitates identification of myenteric neurons in guinea-pig small intestine. *Neurogastroenterol Motil*. 2002; **14**: 197-204.
22. Phillips RJ, Kieffer EJ, Powley TL. Loss of glia and neurons in the myenteric plexus of the aged Fischer 344 rat. *Anat. Embryol*. 2004; **209**: 19-30.
23. Wrzos HF, Cruz A, Polavarapu R, Shearer D, Ouyang A. Nitric oxide synthase (NOS) expression in the myenteric plexus of streptozotocin-diabetic rats. *Dig. Dis. Sci*. 1997; **42**: 2106-2110.
24. Schemann M, Sann H, Schaaf C, Mader M. Identification of cholinergic neurons in enteric nervous system by antibodies against choline acetyltransferase. *A J Physiol*. 1993; **265**: 1005-1009
25. Eguchi R, Cheik N, Oyama L, Nascimento CMO, Mello MT, Tifik S, Dâmaso

- A. Effects of the chronic exercise on the circulating concentration of leptin and ghrelin in rats with diet-induced obesity. *Rev Bras Med Esporte*. 2008; **14**:182-7.
26. Dikeman CL, Murphy MR, Fahey Jr. GC. Dietary Fibers affect viscosity of solutions and simulated human gastric and small intestinal digesta. *J Nutr*. 2006; **136**: 913-19.
27. López-Molina D, Chazarra S, How CW, Pruidze N, Navarro-Perán E, García-Cánovas F, García-Ruiz P, Rojas-Melgarejo F, Rodríguez-López JN. Cinnamate of inulin as a vehicle for delivery of colonic drugs. *Int J Pharm*. 2015; **479**:96–102
28. Isken F, Klaus S, Osterhoff M, Pfeiffer AFH, Weickert MO. Effects of long-term soluble vs. insoluble dietary fiber intake on high-fat diet-induced obesity in C57BL/6J mice. *J Nutr Biochem*. 2010; **21**: 278-284.
29. Gabella G. Fall in the number of myenteric neurons in aging guinea pigs. *Gastroenterology*. 1989; **96**: 1487-1493
30. Phillips RJ, Kieffer EJ, Powley TL. Aging of the myenteric plexus: neuronal loss is specific to cholinergic neurons. *Auton Neurosci*. 2003; **106**: 69-83.
31. Natali MRM, Mirando-Neto MH, Orsi AM. Effects of hypoproteic diet supply on adult wistar rats (*Rattus norvegicus*). *Acta Sci Biol Sci*. 2000; **22**: 567-571.
32. Natali MRM, Molinari SL, Valentini LC, Miranda-Neto MH. Morphoquantitative evaluation of the duodenal myenteric neuronal population in rats fed with hipoproteic ration. *Biocell* 2005, **29**:39-46
33. Cirilo CP, Schoffen JPF, Santi-Rampazzo AP, Zapater MCVU, Vicentini FA, Comar JF, Natali MRM. Dietary restriction interferes with oxidative status and intrinsic intestinal innervation in aging rats. *Nutrition*. 2013; **29**:673-80.
34. Schoffen JPF, Rampazzo APS, Cirilo CP, Zapater MCVU, Vicentini FA, Comar JF, Bracht A, Natali MRM. Food restriction enhances oxidative status in aging rats with neuroprotective effects on myenteric neuron populations in the proximal colon. *Experimental Gerontology*. 2014; **51**:54-64.
35. Schoffen JPF, Vicentini FA, Marcelino CG, Araújo EJA, Pedrosa MMD, Natali MRM. Food restriction beginning at lactation interferes with the cellular dynamics of the mucosa and colonic myenteric innervation in adult rats. *An Acad Bras Cienc*. 2014; **86**:1833-47.
36. Pluske JR, Hampsom DJ, Williams IH. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. *Livest Prod Sci*. 1997; **51**: 215-236.
37. Fu XY, Zhang N, Yu HT, Wang SR, Liu JR. Effects of gastrointestinal motility on

obesity. *Nutr Metab.* 2014; **11**: 1-12.

38. Gabella G. Structure of muscles and nerves in the gastrointestinal tract. In Johnson LR. *Physiology of the gastrointestinal tract*. 2th ed. New York: Raven Press, 1987: 335-381.

39. Bertrand PP. Obesity and plasticity: how your gut learns to deal with yours diet. *J Physiol.* 2013; **591**: 4955.

40. Baudry C, Reichardt F, Marchix J, Bodo A, Schemann M, Varannes SB, Neunlist M, Moriez R. Diet-induced obesity has neuroprotective effects in murine gastric enteric nervous system: involvement of leptin and glial cell line-derived neurotrophic factor. *J Physiol.* 2012; **590**:533-544.

41. Mitsui R, Karaki SL, Kubo Y, Sugiura Y, Kuwahara A. Fibre-free diet leads to impairment of neuronally mediated muscle contractile response in rat distal colon. *Neurogastroenterol Motil.* 2006; **18**: 1093-1101.

42. Qu ZD, Thacker M, Castelucci P, Bagyánszki M, Epstein ML, Furness JB. Immunohistochemical analysis of neuron types in the mouse small intestine. *Cell Tissue Res.* 2008; **334**:147-61.

43. Young HM, Furness JB, Sewell P, Burcher EF, Kandiah CJ. Total numbers of neurons in myenteric ganglia of the guinea-pig small intestine. *Cell Tissue Res.* 1993; **272**:197-200.

44. Rühl A, Nasser Y, Sharkey KA. Enteric glia. *Neurogastroenterol Motility.* 2004; **16**: 44-49.

45. Ruhl A, Hoppe S, Frey I. Functional expression of the peptide transporter PEPT2 in the mammalian enteric nervous system. *J Comp Neurol* 2005; **490**: 1-11.

46. Smit AB, Syed DS, Minnen JV, Klumperman J, Kits KS, Lodder H, Schors RC, Elk R, Sorgedraeger B, Brejc K, Sixma TK, Geraerts WP. A glia-derived acetylcholine-binding protein that modulates synaptic transmission. *Nature.* 2001; **411**: 261-268.

47. Phillips RJ, Powley TL. Innervation of the gastrointestinal tract: patterns of aging. *AutonNeurosci.* 2007; **136**: 1-19.

48. Neunlist M, Rolli-Derkinderen M, Latorre R, Landeghem LV, Coron E, Derkinderen P, Giorgio R. Enteric glial cells: recent developments and future directions. *Gastroenterology.* 2014, **147**: 1230-1237.

**Tabela 1.** Distribuição diária dos alimentos oferecidos aos grupos sedentários cafeteria (SCa) e sedentários cafeteria fibras (SCaF)

<b>Dia da semana</b>	<b>Alimentos</b>
Segunda-feira	Mortadela, marshmallow, chips bacon, bolacha waffer e ração
Terça-feira	Bolacha recheada, chips queijo, ração, salsicha e ração
Quarta-feira	Pão francês, ração, mortadela, chips queijo e ração
Quinta-feira	Mortadela, bolacha waffer, paçoca, chips bacon e ração
Sexta-feira	Bolacha recheada, salsicha, chips queijo, ração, geléia de mocotó e ração
Sábado	Bolacha recheada, salsicha, chips queijo, ração, geléia de mocotó e ração
Domingo	Bolacha recheada, salsicha, chips queijo, ração, geléia de mocotó e ração

**Tabela 2.** Características dos anticorpos primários e secundários utilizados para análises imunohistoquímicas.

Anticorpo 1°	Fornecedor	Diluição	Anticorpo 2°*
Anti-HuC/HuD (camundongo)	Invitrogen, USA	1:500	Alexa fluor 546 (anti-camundongo)
Anti-S-100 (coelho)	Sigma, USA	1:500	Alexa fluor 488 (anti-coelho)
Anti-nNOS (coelho)	Santa Cruz Biotechnology, USA	1:500	Alexa fluor 488 (anti-coelho)
Anti-ChAT (cabra)	Millipore, USA	1:30	Alexa fluor 546 (anti-cabra)

\*Os anticorpos secundários foram utilizados com diluição de 1:500 e fornecidos pela Invitrogen, USA.

**Tabela 3.** Consumo alimentar (g), consumo calórico (kcal), peso corporal final (g), ganho de massa corporal (g), somatória do peso absoluto dos tecidos adiposos ( $\Sigma$  T.A.) retroperitoneal, periepididimal e mesentérico (g) e peso relativo dos tecidos adiposos retroperitoneal, periepididimal e mesentérico (gramas/100g de massa corporal) de ratos dos grupos sedentários (S), sedentários cafeteria (SCa), sedentários fibras (SF), e sedentários cafeteria fibras (SCaF). Os valores são expressos como média  $\pm$  erro padrão (n=5).

	<b>S</b>	<b>SCa</b>	<b>SF</b>	<b>SCaF</b>
<b>Consumo alimentar</b>	26,26 $\pm$ 0,50a	26,98 $\pm$ 0,54a	23,44 $\pm$ 0,51b	26,94 $\pm$ 0,36a
<b>Consumo calórico</b>	77,70 $\pm$ 1,5a	100,5 $\pm$ 3,30b	72,44 $\pm$ 2,71a	97,39 $\pm$ 2,35b
<b>Peso Corporal</b>	488,4 $\pm$ 21,87a,b	519,0 $\pm$ 19,97a	402,2 $\pm$ 18,19b	522,2 $\pm$ 16,35a
<b>Ganho de massa corporal</b>	229,6 $\pm$ 21,11a	276,8 $\pm$ 16,75a	140,7 $\pm$ 19,27b	268,0 $\pm$ 15,14a
<b><math>\Sigma</math> T. A.</b>	18,96 $\pm$ 2,45a	44,44 $\pm$ 3,65b	14,41 $\pm$ 0,70a	33,44 $\pm$ 1,58b
<b>T.A. retroperitoneal</b>	1,92 $\pm$ 0,20a	4,19 $\pm$ 0,43b	1,47 $\pm$ 0,15a	3,37 $\pm$ 0,21b
<b>T. A. periepididimal</b>	2,11 $\pm$ 0,27a	3,83 $\pm$ 0,35b	1,36 $\pm$ 0,09a	2,85 $\pm$ 0,22b
<b>T. A. mesentérico</b>	1,38 $\pm$ 0,17a	2,80 $\pm$ 0,12b	0,77 $\pm$ 0,07c	2,06 $\pm$ 0,15d

\*Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente (p<0,05)

**Tabela 4.** Área do intestino delgado (ID) (cm<sup>2</sup>), espessura da túnica muscular (T.M.) (µm) e número médios de neurônios do plexomioentérico do jejuno de ratos marcados em 9,25 mm<sup>2</sup> por técnica de histoquímica: NADH-diaforase positivos; e imunohistoquímica:HuC/D (população geral), nNOS (subpopulação nitrérgicas) e ChAT (subpopulação colinérgica); e células da glia entérica imunomarcadas (S100) de ratos dos grupos sedentários (S), sedentários cafeteria (SCa), sedentários fibras (SF) e sedentários cafeteria fibras (SCaF). Os valores são expressos como média ± erro padrão (n=5).

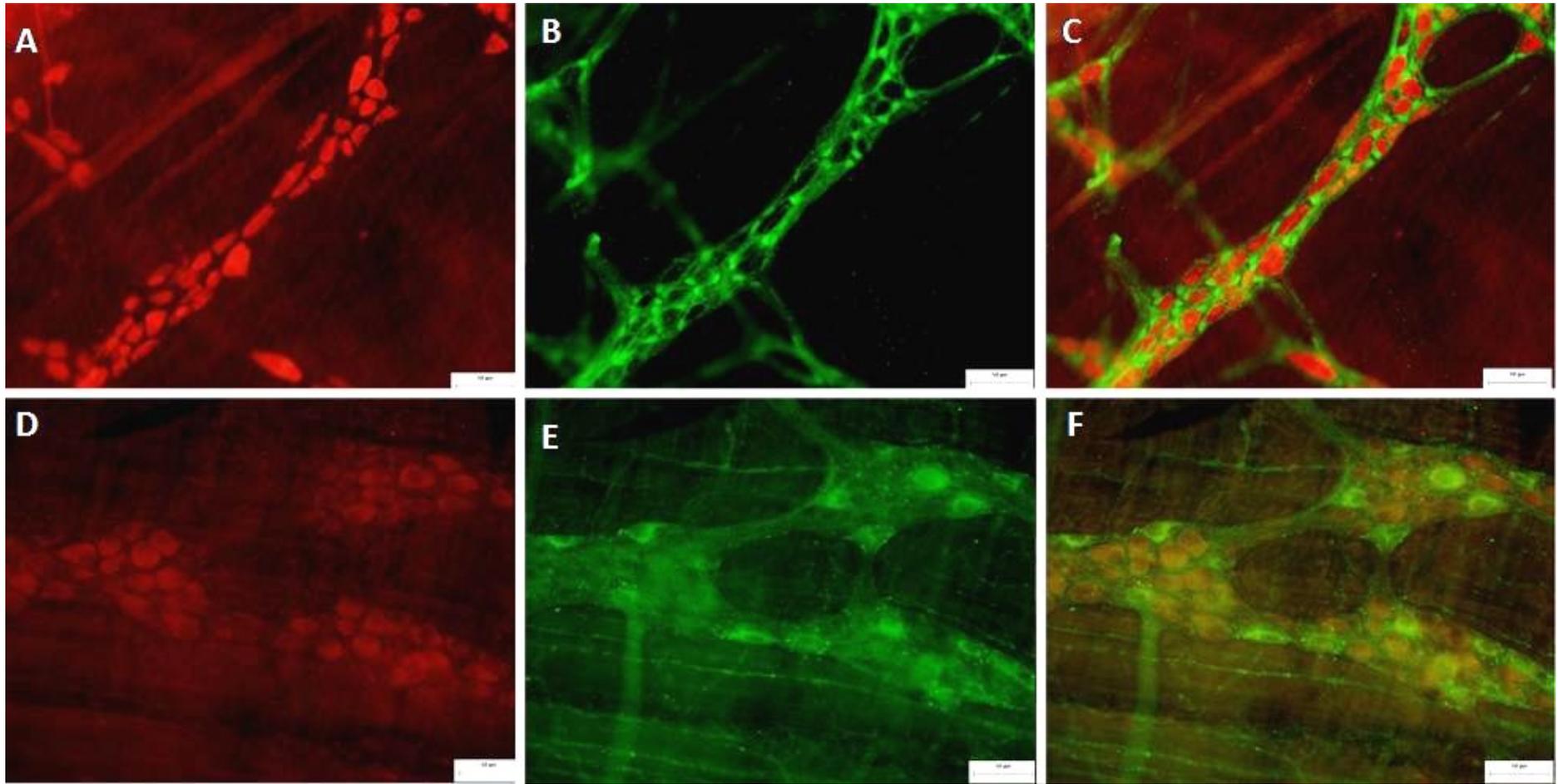
	<b>S</b>	<b>SCa</b>	<b>SF</b>	<b>SCaF</b>
<b>Área do ID</b>	105,0±2,50a	105,3±3,80a	105,9±9,11a	89,9±4,93a
<b>T. M.</b>	68,63±0,50a	58,63±0,61b	67,73±0,58a	71,87±0,73c
<b>NADH</b>	1013±29,06a	999,0±30,77a	915,8±44,05a	917,0±37,82a
<b>HuC/D</b>	1123±45,13a	1257±50,67a	1244±89,42a	1249±95,81a
<b>nNOS</b>	287,6±6,57a	281,8±6,43a	278,0±17,73a	281,6±7,25a
<b>ChAT</b>	785,0±9,43a	816,2±9,35a	818,4±6,56a	813,8±12,99a
<b>S100</b>	1587±87,75a	1859±86,06a	1716±123,40a	1794±141,4a

\*Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente (p<0,05)

**Tabela 5.** Perfil celular (área) de neurônios HuC/D, nNOS, ChAT, NADH e glia entérica ( $\mu\text{m}^2$ ) de ratos dos grupos sedentários (S), sedentários cafeteria (SCa), sedentários fibras (SF) e sedentários cafeteria fibras (SCaF). Os valores são expressos como média  $\pm$  erro padrão (n=5).

	<b>S</b>	<b>SCa</b>	<b>SF</b>	<b>SCaF</b>
<b>HuC/D</b>	264,0 $\pm$ 3,75a	263,3 $\pm$ 2,94a	265,7 $\pm$ 3,93a	268,8 $\pm$ 3,05a
<b>ChaT</b>	264,4 $\pm$ 3,90a	265,4 $\pm$ 3,41a	253,5 $\pm$ 3,69a	252,5 $\pm$ 1,87a
<b>nNOS</b>	251,8 $\pm$ 2,63a	249,7 $\pm$ 1,66a	271,1 $\pm$ 1,09b	267,7 $\pm$ 3,79b
<b>NADH</b>	207,5 $\pm$ 3,44a	210,9 $\pm$ 1,80a	207,3 $\pm$ 4,28a	209,2 $\pm$ 4,29a
<b>S100</b>	82,36 $\pm$ 0,99a	83,04 $\pm$ 0,79a	82,52 $\pm$ 1,51a	83,28 $\pm$ 1,48a

\*Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente (p<0,05)



**Fig. 1.** Neurônios do plexo mioentérico do jejuno de ratos. (A) População neuronal geral HuC/D; (B) Glia entérica (S100); (C) Sobreposição das imagens A e B; (D) Subpopulação colinérgica (ChAT); (E) Subpopulação nitrérgica nNOS; (F) Sobreposição das imagens E e F.

---

---

*Parecer do Comitê de Ética*

---

---

*Normas para Autores*