

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO – BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

**EVANDRO JOSÉ BERARDI**

**NEURODEGENERAÇÃO NO PLEXO MIOENTÉRICO DO INTESTINO GROSSO:  
ESTUDO EM DIFERENTES MODELOS EXPERIMENTAIS**

**Maringá**

**2016**

**EVANDRO JOSÉ BERALDI**

**NEURODEGENERAÇÃO NO PLEXO MIOENTÉRICO DO INTESTINO GROSSO:  
ESTUDO EM DIFERENTES MODELOS EXPERIMENTAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Área de concentração - Biologia Celular e Molecular) da Universidade Estadual de Maringá, para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Nilza Cristina  
Buttow

**Maringá**

**2016**

## **BIOGRAFIA**

Evandro José Beraldi nasceu em Apucarana, Paraná, no dia 26 de agosto 1985. Licenciado em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Maringá (2009), desenvolveu atividades de iniciação científica com as professoras Dr<sup>a</sup> Evanilde Buzzo Romano e Dr<sup>a</sup> Nilza Cristina Buttow durante a graduação, no departamento de Ciências Morfológicas. Em 2012, obteve o título de Mestre pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Área de concentração - Biologia Celular e Molecular) da Universidade Estadual de Maringá. Ainda em 2012, deu continuidade à sua formação científica na condição de doutorando do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Área de concentração - Biologia Celular e Molecular), na mesma instituição. Possui experiência na área de biologia celular e tecidual, atuando principalmente nos seguintes temas: sistema nervoso entérico, neuroplasticidade, dieta hiperlipídica, técnicas imunohistoquímicas e de imunofluorescência.

## AGRADECIMENTOS

À minha família e familiares, pelos momentos de alegria, de apoio e pela paciência. Principalmente ao meu pai, José Otávio Beraldi, pelo exemplo de caráter e determinação, e por acreditar na minha capacidade.

À minha orientadora, Nilza C. Buttow, pela oportunidade, pela confiança em minha capacidade, pelos conhecimentos ensinados, pela dedicação e paciência, não só durante a realização deste trabalho como também durante a iniciação científica e mestrado.

Aos docentes e técnicos da Universidade Estadual de Maringá que contribuíram para a minha formação, em especial às professoras Maria Raquel Natali e Fernanda Losi Alves de Almeida, pelos conhecimentos prestados e apoio material e científico.

Ao professor Mario José Abdalla Saad e ao biólogo Andrey dos Santos, da Universidade Estadual de Campinas, por terem se dispostos a realizar algumas das análises importantes ao trabalho.

Às técnicas do laboratório de Histotécnica Animal, Maria Euride, Maria dos Anjos, e Maria Ângela, pelo excelente apoio técnico prestado durante todos esses anos e pela disposição em nos ajudar com sua experiência e amizade.

A todos os colegas e ex-colegas de trabalho no laboratório: Lia, Jean, Karina, Isabella, Rosiane, Paulo, Aline, Fernando, Bruna, Jackson, Ana Paula, Débora, Taiane, Carlos, Jéssica, Rodrigo e Marcelo, por me proporcionarem ajuda, troca de experiências e

conhecimentos, além dos momentos de alegria e descontração. Em especial, Stephanie e Larissa, que desenvolveram suas atividades de pesquisa comigo durante este experimento, compartilhando os sucessos e decepções em nosso trabalho, pela amizade, pelo apoio e dedicação.

Aos meus amigos, Rudnei, Everton, Daniela, Dafne, Milani e Jessica, pelos momentos de alegria e apoio na vida.

A todos os colegas da graduação, do mestrado, doutorado e de fora da universidade, pela contribuição em meu crescimento pessoal e profissional.

À Universidade Estadual de Maringá e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas pela oportunidade. Também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro necessário a realização desta tese de Doutorado e pelo auxílio da taxa de bancada, indispensável para a realização de várias das técnicas neste trabalho.

Aos membros da banca, por terem aceitado o convite e assim, poderem contribuir com sabedoria e experiência para o enriquecimento deste estudo.

E a todos que, por ventura não tenha lembrado, contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho e para meu crescimento.

A todos, o meu muito Obrigado!

## APRESENTAÇÃO

Esta tese é composta de dois artigos científicos, apresentando resultados de estudos sobre a neurodegeneração no sistema nervoso entérico em modelos de obesidade induzida por dieta hiperlipídica e diabetes experimental. O primeiro trabalho, “Perda neuronal colônica e atraso na motilidade em camundongos Swiss com obesidade induzida por dieta hiperlipídica é independente de alterações na microbiota”, investiga os efeitos da dieta hiperlipídica e da suplementação com inulina sobre o sistema nervoso entérico de camundongos, sobre a microbiota intestinal e inflamação. O segundo trabalho, “Resveratrol protege neurônios do plexo mioentérico contra a neurodegeneração no intestino grosso de ratos com diabetes experimental”, investiga os efeitos do tratamento com resveratrol no sistema nervoso entérico de ratos com diabetes experimental. Em consonância com as regras do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, os artigos foram redigidos de acordo com as revistas *PLOS ONE* e *Digestive Diseases and Sciences*:

Beraldi, EJ; Borges, SC; Schneider, LCL; Almeida, FLA; Santos, A; Saad, MJA; Buttow, NC. Colonic neuronal loss and delayed motility in Swiss mice with high-fat diet-induced obesity is independent of changes in the microbiota. *PLOS ONE*

Beraldi, EJ; Kido, KK; Ferreira, PEM; Buttow, NC. Resveratrol protects neurons of the myenteric plexus against neurodegeneration in the large intestine of rats with experimental diabetes. *Digestive Diseases and Sciences*.

## RESUMO GERAL

**INTRODUÇÃO** – Diabetes e obesidade são condições comumente associadas à distúrbios gastrointestinais. A obesidade é normalmente relacionada ao atraso na motilidade intestinal e dietas hiperlipídicas causam a perda de neurônios mioentéricos no intestino delgado e grosso, atribuída à alterações na microbiota associadas à inflamação. No diabetes, diarreia e dor abdominal são complicações frequentemente observadas. O funcionamento anormal do trato gastrointestinal indica complicações e danos ao sistema nervoso entérico, em especial ao plexo mioentérico, responsável pela inervação de motilidade intrínseca. Além da microbiota, o estresse oxidativo é apontado com uma das principais causas da neurodegeneração e compostos antioxidantes podem atuar reduzindo os efeitos danosos do diabetes no organismo.

**OBJETIVOS** – No primeiro trabalho, nós investigamos se a suplementação da dieta hiperlipídica (DHL) com inulina, um prebiótico metabolizado pela microbiota principalmente no intestino grosso, seria capaz de modular as populações bacterianas em direção à presença de comunidades consideradas menos danosas ao organismo. Investigamos também diferentes populações neuronais mioentéricas para avaliar se a perda neuronal poderia ser amenizada e seletiva, além de analisar a associação da inervação com a motilidade colônica. No segundo trabalho, investigamos se o tratamento com resveratrol em ratos com diabetes experimental seria capaz de minimizar os danos causados pelo estresse oxidativo na inervação mioentérica do intestino grosso, uma vez que é um composto com comprovada capacidade antioxidante.

**MÉTODOS** – Na avaliação da obesidade, camundongos Swiss foram alimentados com dieta purificada para roedores ou dieta hiperlipídica (59 % kcal de gordura), ou a suplementação das dietas com inulina por 17 semanas. Foram realizadas análises de motilidade intestinal total e colônica, dosagens bioquímicas sanguíneas, análise metagenômica da microbiota colônica, nível de expressão gênica dos marcadores inflamatórios TNF- $\alpha$ , IL6 e IL1b, e

imunofluorescência para análises de densidade neuronal e morfometria do corpo celular de diferentes tipos de neurônios mioentéricos do colo distal, como as populações positivas para miosina-V, óxido nítrico sintase neuronal, peptídeo intestinal vasoativo e calretinina. No estudo com diabetes experimental, ratos com diabetes induzida por estreptozotocina foram tratados com resveratrol (10 mg/kg) por 17 semanas. Foram realizadas a avaliação de parâmetros fisiológicos e análises de densidade neuronal e morfometria do corpo celular através de imunofluorescência no plexo mioentérico do colo distal.

**RESULTADOS** - A dieta hiperlipídica causou obesidade e atraso na motilidade colônica. A perda de neurônios mioentéricos no colo distal dos animais obesos afetou todas as populações estudadas, com redução na densidade neuronal positiva para miosina-V, óxido nítrico sintase neuronal, peptídeo intestinal vasoativo e calretinina. Esta perda foi acompanhada de alterações no tamanho do corpo celular neuronal em algumas das subpopulações estudadas. Em especial, os neurônios marcados para calretinina parecem ser mais sensíveis aos efeitos da dieta. Embora os animais obesos suplementados com inulina tenham apresentado uma melhora na motilidade colônica, a perda neuronal se manteve constante. Tanto a dieta hiperlipídica quanto a suplementação com inulina não causaram alterações significativas no perfil da microbiota intestinal ou nos níveis de expressão de citocinas inflamatórias no intestino. Nos ratos diabéticos, observamos sinais clínicos típicos do modelo experimental, como alta glicemia sanguínea, perda de massa corporal e aumento na velocidade do trânsito gastrointestinal, além de neurodegeneração na população total e subpopulação nitrérgica. O resveratrol não foi capaz de impedir totalmente a perda neuronal, mas amenizou em parte os danos aos neurônios mioentéricos em ratos diabéticos, indicando seu papel antioxidante e neuroprotetor. Embora o tratamento também não tenha reduzido a glicemia dos animais diabéticos, alguns parâmetros fisiológicos tiveram melhoras, como a perda de peso e consumo de água.

**CONCLUSÕES** - A alimentação com dieta hiperlipídica ou a suplementação com inulina por longo período não alterou a microbiota intestinal ou os níveis de expressão gênica de marcadores inflamatórios no colo distal de camundongos Swiss, indicando que os animais desta linhagem são aparentemente mais resistentes a mudanças causadas pela dieta nestes parâmetros. Ainda assim, os camundongos obesos apresentaram perda neuronal em todas as subpopulações estudadas e conseqüente atraso na motilidade colônica. No diabetes, o tratamento com resveratrol em ratos amenizou os danos causados aos neurônios do colo distal, embora não tenha prevenido totalmente a perda neuronal no plexo mioentérico. Além disso, o tratamento melhorou alguns parâmetros fisiológicos característicos da doença.

## GENERAL ABSTRACT

**INTRODUCTION** - Diabetes and obesity are conditions commonly associated with gastrointestinal disorders. Obesity is usually linked to delayed intestinal motility and high-fat diets cause loss of myenteric neurons in the small and large intestine, a reduction attributed to changes in the microbiota associated with inflammation. In diabetes, diarrhea and abdominal pain are frequent complications. The abnormal functioning of the gastrointestinal tract indicates complications and damage to the enteric nervous system, especially in the myenteric plexus, responsible for the intrinsic motor innervation. In addition to the microbiota, oxidative stress is indicated as a major cause of neurodegeneration and antioxidants can reduce the damaging effects of diabetes in the body.

**OBJECTIVES** - In the first study, we investigated if supplementation of a DHL with inulin, a prebiotic mainly metabolized in the colon by the microbiota, is able to modulate the bacterial populations toward the prevalence of communities considered less harmful to the body. We also investigated different myenteric neuronal populations to assess whether the neuronal loss could be mitigated and to analyze the association of innervation with colonic motility. In the second study, we investigated if treatment with resveratrol in rats with experimental diabetes is capable of acting attenuating the damage to the myenteric innervation of the colon, since resveratrol is a compound with proven antioxidant capacity.

**METHODS** – In the obesity study, Swiss mice were fed a purified diet for rodents or a high-fat diet (59% kcal fat), or the diets supplemented with inulin for 17 weeks. We investigated the intestinal and colonic motility, blood biochemical measurements, metagenomic analysis of colonic microbiota and gene expression levels of the inflammatory markers TNF- $\alpha$ , IL6 and IL1B. We also performed immunofluorescence techniques for analysis of the neuronal density and cell body morphometry of different types of myenteric neurons of the distal

colon, such as populations positive for myosin-V neuronal nitric oxide synthase, vasoactive intestinal peptide and calretinin. In the study with experimental diabetes, rats with streptozotocin-induced diabetes were treated with resveratrol (10 mg / kg) for 17 weeks. We evaluated physiological parameters and analyzed the neuronal density and cell body morphometry in the myenteric plexus of the distal colon, by immunofluorescence techniques.

**RESULTS** – High-fat diet caused obesity and delayed colonic motility. The loss of myenteric neurons in the distal colon of obese animals affected all populations studied, with reduction in neuronal density of myosin-V, neuronal nitric oxide synthase, vasoactive intestinal peptide and calretinin positive neurons. This loss was accompanied by alterations in neuronal cell body size in some of the studied subpopulations. In particular, calretinin positive neurons appear to be more sensitive to the effects of the diet. Although obese animals supplemented with inulin had improved colonic motility, neuronal loss remained constant. Both the high-fat diet and the supplementation with inulin did not alter the metagenomic profile of the intestinal tract or the expression levels of inflammatory cytokines in the colon. In diabetic rats, we observed typical symptoms of the experimental model such as high blood glucose levels, body weight loss and increased speed of gastrointestinal transit, and neurodegeneration in the total population and nitrergic subpopulation. Resveratrol was not able to completely prevent neuronal loss, but mitigated in part the damage to myenteric neurons in the treated diabetic group, indicating its antioxidant and neuroprotective role. Although the treatment did not reduce the blood glucose of diabetic animals, some physiological parameters were improved such as weight loss and water consumption.

**CONCLUSIONS** – High-fat diet or supplementation with inulin for a long time did not change the intestinal microbiota or gene expression levels of inflammatory markers in the distal colon of Swiss mice, indicating that the animals of this lineage are apparently more resistant to changes caused by diet these parameters. Nevertheless, obese mice showed

neuronal loss in all studied neuronal populations, with consequently delayed colonic motility. In diabetic rats, resveratrol treatment minimized the damage to neurons in the distal colon, although it did not totally prevented neuronal loss in the myenteric plexus. Furthermore, resveratrol improved some characteristic physiological parameters of the disease.

**Perda neuronal colônica e atraso na motilidade em camundongos Swiss com obesidade induzida por dieta hiperlipídica é independente de alterações na microbiota**

Evandro José Beraldi<sup>1</sup>, Stephanie Carvalho Borges<sup>1</sup>, Larissa Carla Lauer Schneider<sup>1</sup>, Fernanda Losi Alves de Almeida<sup>1</sup>, Andrey dos Santos<sup>2</sup>, Mario José Abdalla Saad<sup>2</sup>, Nilza Cristina Buttow\*<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Medicina Interna, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

\*Autor correspondente

E-mail: [ncbuttow@gmail.com](mailto:ncbuttow@gmail.com)

Contribuição dos autores

Elaboração e design do estudo: EJB, NCB. Criação, coleta e organização dos dados: EJB, SCB, LCLS, FLAA, AS, MJAS. Análise e interpretação dos dados: EJB, NCB. Escrita e revisão do manuscrito: EJB, NCB

## **Abstract**

*Introduction:* Obesity has been linked to gastrointestinal disorders, especially delayed intestinal transit. High-fat diets cause loss of myenteric neurons in the small and large intestine, due changes in the microbiota and inflammation. We investigated if the prebiotic inulin is able to modulate the bacterial populations and alleviate neuronal loss in mice fed high-fat diet. *Methods:* Swiss mice were fed a purified diet for rodents or a high-fat diet (59% kcal fat), both with and without supplementation with inulin for 17 weeks. Intestinal transit analyzes were performed, as well as blood biochemical tests, metagenomic analysis of the colonic microbiota, genetic expression level of inflammatory markers and immunofluorescence for different types of myenteric neurons of the distal colon. *Results:* High-fat diet caused obesity and delayed colonic transit. Obese mice presented loss of myenteric neurons positive for myosin-V, neuronal nitric oxide synthase, vasoactive intestinal peptide and calretinin. It was accompanied by alterations in neuronal cell body size of some of the studied subpopulations. Although obese mice supplemented with inulin had improved in colonic transit, neuronal loss did not change. Both the high-fat diet and the supplementation with inulin did not alter the metagenomic profile of colonic microbiota or the expression levels of inflammatory cytokines in the intestine. *Conclusion:* High-fat diet or the supplementation with inulin was not able to change the microbiota and promote inflammation in Swiss mice. Nevertheless, the different studied neuronal populations were reduced and mice showed delayed colonic transit.

## Resumo

*Introdução:* A obesidade tem sido associada a distúrbios gastrintestinais, principalmente atraso no trânsito intestinal. Dietas hiperlipídicas causam a perda de neurônios mioentéricos no intestino delgado e grosso, atribuída a alterações na microbiota associadas à inflamação. Nós investigamos se o prebiótico inulina é capaz de modular as populações bacterianas e amenizar a perda neuronal em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica. *Métodos:* Camundongos *Swiss* foram alimentados com dieta purificada para roedores (AIN-93G) ou dieta hiperlipídica (59 % kcal de gordura), ambas com e sem suplementação com inulina, durante 17 semanas. Foram realizadas análises de trânsito intestinal, dosagens bioquímicas sanguíneas, análise metagenômica da microbiota colônica, nível de expressão gênica de marcadores inflamatórios e imunofluorescência para diferentes tipos de neurônios mioentéricos do colo distal. *Resultados:* A dieta hiperlipídica causou obesidade e atraso no trânsito colônico. A perda de neurônios mioentéricos no colo distal dos animais obesos afetou todas as populações estudadas, com redução na densidade neuronal positiva para miosina-V, óxido nítrico sintase neuronal, peptídeo intestinal vasoativo e calretinina. Esta perda foi acompanhada de alterações no tamanho do corpo celular neuronal em algumas das subpopulações estudadas. Embora os animais obesos suplementados com inulina tenham apresentado uma melhora no trânsito colônico, a perda neuronal não foi alterada. Tanto a dieta hiperlipídica quanto a suplementação com inulina não causaram alterações significativas no perfil da microbiota intestinal ou nos níveis de expressão de citocinas inflamatórias no intestino. *Conclusão:* Houve redução significativa nas diferentes populações neuronais estudadas e atraso no trânsito intestinal. No entanto, em camundongos *Swiss*, a dieta hiperlipídica ou suplementada com inulina não foi capaz de alterar a microbiota e promover inflamação.

## Introdução

A incidência da obesidade vem aumentando drasticamente nas últimas décadas e, juntamente com as complicações crônicas associadas, tem sido motivo de preocupação na saúde pública [1]. Novas evidências cada vez mais relacionam a obesidade com o desenvolvimento de doenças crônicas como o diabetes, câncer, doenças cardiovasculares e no sistema nervoso[2]. Além disso, a obesidade também tem sido associada a distúrbios de motilidade gastrointestinal [3]. Constipação e retardo no trânsito colônico são achados frequentes em modelos de estudos experimentais nos quais há consumo excessivo de gordura na alimentação [4-6].

A motilidade intestinal em níveis fisiológicos envolve o funcionamento coordenado da inervação extrínseca do intestino e do sistema nervoso entérico [7], e neurônios entéricos são capazes de responder diretamente aos carboidratos, aminoácidos e ácidos graxos presentes na alimentação [8]. Sabe-se que o consumo de dietas hiperlipídicas (DHL) em modelos experimentais causa perda neuronal de neurônios mioentéricos, relacionados com a inervação motora do trato gastrointestinal. Estudos já relataram os efeitos deletérios da DHL na inervação do ceco [9], intestino delgado [9-14] e intestino grosso [4, 5, 9, 10, 15]. Esta neurodegeneração já foi observada, em diferentes intensidades, em neurônios que expressam diversos neurotransmissores e com diferentes funções, tais como neurônios positivos para HuC/D, periferina, miosina-V, nNOS, VIP, ChAT e calretinina. Além disso, vários desses estudos mostram que ácidos graxos encontrados em grande quantidade na DHL possuem efeito neurodegenerativo direto em células neuronais *in vitro* [4, 5, 10].

Várias hipóteses têm sido sugeridas para explicar a neurodegeneração causada pela DHL. Estudos reportam que dietas ricas em lipídios causam alterações significativas na microbiota intestinal [4, 16, 17] e aumento na permeabilidade do intestino [18], ativando

processos inflamatórios através da maior produção de lipopolissacarídeos (LPS) pela microbiota e ativação dos receptores *Toll-like* (TLR) [19]. Em modelos experimentais já foi encontrado aumento na produção de citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 6 (IL6), no tecido adiposo [20] e intestino [18, 21], bem como aumento na ativação de vias de sinalização do TLR [22]. *In vitro*, a ativação da via de sinalização do TLR4 por LPS resulta em morte neuronal [4, 23, 24]. Ácidos graxos saturados presentes na dieta, como o palmitato, também podem ativar diretamente a sinalização dos TLR4 e causar efeitos deletérios em neurônios entéricos [4, 10, 25], indicando a lipotoxicidade pelo excesso de lipídios na alimentação [5]. O processo inflamatório e a endotoxemia relacionada com o consumo de dietas hiperlipídicas podem ser atenuados através do uso de prebióticos na alimentação [4, 19, 26], nutrientes não digeríveis que estimulam o crescimento ou atividade de grupos específicos de bactérias no intestino grosso [27, 28].

Num estudo anterior realizado pelo nosso grupo, observou-se que a DHL causou perda neuronal mioentérica no intestino grosso de camundongos Swiss [15]. Este estudo demonstrou que os neurônios do colo distal parecem ser os mais afetados. Uma de nossas hipóteses para explicar a perda neuronal causada pela DHL foi a inflamação associada a mudanças na microbiota. No presente trabalho, nós investigamos se a suplementação da DHL com inulina, um prebiótico metabolizado principalmente no intestino grosso pela microbiota [29], é capaz de modular as populações bacterianas em direção à presença de comunidades consideradas menos danosas ao organismo. Para isto, realizamos a análise metagenômica da microbiota colônica em associação com a análise de expressão de marcadores inflamatórios no intestino. Investigamos também diferentes populações neuronais mioentéricas para avaliar se a perda neuronal poderia ser amenizada nos animais alimentados com DHL e

suplementados com inulina, além de analisar a associação da inervação com a motilidade colônica.

## **Métodos**

### *Delineamento experimental*

Todos os procedimentos que envolveram o uso de animais neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Maringá (parecer nº 115/2012), e estavam de acordo com os princípios éticos adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Foram utilizados 20 camundongos adultos, machos, da espécie *Mus musculus*, linhagem Swiss, com idade inicial de 42 dias e peso médio de 34 g. Os animais foram provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá e mantidos no biotério setorial do Departamento de Ciências Morfológicas durante o período de tratamento, em ambiente com temperatura ( $22 \pm 2^\circ \text{C}$ ) e iluminação controladas (ciclo claro/escuro de 12 h).

De acordo com a alimentação que receberam, os camundongos foram divididos em quatro grupos com cinco animais cada: grupo controle (C), alimentado com a dieta purificada AIN 93G [30]; grupo controle suplementado (Ci), alimentado com a dieta purificada AIN 93G e suplementada com inulina na proporção 9:1; grupo obeso (H), alimentado com a dieta AIN 93G modificada rica em gordura saturada (Tabela 1); e grupo obeso suplementado (Hi), alimentado com a dieta AIN 93G modificada e suplementada com inulina na proporção 9:1. Os grupos foram alimentados por 17 semanas e todos os animais tiveram acesso à água e ração *ad libitum* durante o experimento. A avaliação do consumo de ração foi realizada por 5 dias durante a última semana, com resultados expressos em g/dia por animal.

**Tabela 1:** Dieta AIN 93G padrão e dieta hiperlipídica modificada

| Ingredientes AIN 93G        | Padrão (g) | Hiperlipídica (g) |
|-----------------------------|------------|-------------------|
| Amido                       | 397,5      | 115,5             |
| Caseína                     | 200,0      | 200,0             |
| Amido de milho dextrinizado | 132,0      | 132,0             |
| Sacarose                    | 100,0      | 100,0             |
| Óleo de soja                | 70,0       | 40,0              |
| Banha                       | 0,0        | 312,0             |
| Celulose microfina (Fibra)  | 50,0       | 50,0              |
| Mix minerais                | 35,0       | 35,0              |
| Mix vitaminas               | 10,0       | 10,0              |
| L-Cistina                   | 3,0        | 3,0               |
| Bitartarato de colina       | 2,5        | 2,5               |
| Total                       | 1000       | 1000              |

Ração hiperlipídica rica em gordura saturada utilizada no tratamento dos animais dos grupos H e Hi, preparada a partir de alterações na quantidade de amido, óleo de soja e a adição de banha, tendo como base a ração purificada AIN 93G.

#### *Tempo de trânsito gastrintestinal e umidade das fezes*

Os camundongos receberam uma solução contendo 0,1 ml de um corante não absorvível (3 % Carmine Red, 0,5 % metilcelulose) [31] via gavagem, e o tempo até a eliminação da primeira pelota fecal colorida foi determinado e expresso em minutos. O teste

foi realizado na última semana de experimento e os camundongos foram mantidos em gaiolas individuais durante a observação. Além disso, durante os primeiros 60 minutos de observação, as pelotas fecais eliminadas foram coletadas e imediatamente colocadas em microtubos fechados, sendo realizadas as avaliações do peso úmido, peso seco e volume de água nas fezes.

#### *Tempo de trânsito colônico*

Para o teste de expulsão, uma esfera de metal de 2 mm de diâmetro foi introduzida via retal à 2 cm da abertura anal, utilizando uma pipeta Pasteur levemente lubrificada. O tempo entre a inserção até a expulsão da esfera foi determinado como tempo de trânsito colônico, expresso em minutos.

#### *Coleta dos materiais de estudo*

Após completar o período de tratamento, os animais deixados em jejum por 12 h foram pesados e anestesiados com uma dose letal (80 mg/kg de peso corporal) de tiopental (Laboratórios Abbott, Chicago, IL, EUA), via intraperitoneal. O sangue foi coletado por punção cardíaca e após a avaliação da glicemia de jejum (mg/dl) por fita reativa e glicosímetro, o restante foi centrifugado à 13000 g por 5 min e o plasma armazenado à -20 °C para as análises bioquímicas posteriores. Os depósitos de gordura abdominais retroperitoneal, periepididimal e mesentérica foram coletados e pesados, sendo expressos como gorduras abdominais.

O intestino grosso foi removido e a porção distal à ocorrência das pregas mucosas foi considerada como colo distal. As pelotas fecais presentes no lúmen do colo distal foram imediatamente coletados em criotubos, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas à -80

°C para a avaliação metagenômica da microbiota. O colo distal foi mensurado em comprimento e circunferência para a avaliação da área distendida, expressa em cm<sup>2</sup>.

Um segmento de aproximadamente 1 cm de comprimento foi coletado, rapidamente lavado com tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,4 (PBS) e congelado em nitrogênio líquido, sendo posteriormente estocados à -80 °C para as análises de PCR quantitativo em tempo real.

O restante do colo distal foi lavado fixado por 2 horas em solução de paraformaldeído 4 % (pH 7,4), posteriormente sendo aberto ao longo da borda mesocólica e lavado em PBS para a remoção do excesso de fixador. O intestino foi cortado em segmentos transversais menores de aproximadamente 1 cm de comprimento e dissecados com o auxílio de pinças sob estereomicroscópio para obtenção de preparados totais da túnica muscular, através da remoção da túnica mucosa e tela submucosa. Os preparados totais foram então armazenados sob refrigeração em PBS e azida sódica 0,08 %, até a realização das técnicas de imunofluorescência.

#### *Análises bioquímicas sanguíneas*

O plasma armazenado foi utilizado para a dosagem de proteínas totais (g/dl), triglicérides (mg/dl) e colesterol total (mg/dl) por espectrofotometria (analisador bioquímico semiautomático, BIO 200FL, Bio Plus, São Paulo, SP, Brasil) e de acordo com as instruções dos kits comerciais (Gold Analisa, Belo Horizonte, MG, Brasil).

#### *Imunofluorescência do plexo mioentérico*

Os anticorpos primários e secundários utilizados estão resumidos na Tabela 2. Preparados totais de membrana foram incubados com anticorpos imunorreativos (-IR) para as proteínas: miosina-V (população neuronal geral, miosina-V-IR), óxido nítrico sintase neuronal (subpopulação nitrérgica, nNOS-IR), peptídeo intestinal vasoativo (subpopulação

VIP-IR) e calretinina (subpopulação CALR-IR). O anticorpo anti-miosina-V foi utilizado para a marcação da população neuronal geral, uma vez que ele não é seletivo para subpopulações específicas e já foi utilizado em diferentes modelos experimentais e segmentos intestinais [15, 32-35]. Duplas marcações foram feitas com nNOS/VIP, enquanto a miosina-V e CALR foram analisados por marcações simples. Cada técnica foi realizada em um preparado de membrana diferente e a omissão do anticorpo primário não mostrou nenhuma marcação após testes de controle negativo.

**Tabela 2:** Anticorpos

| Primário  | Hospedeiro | Empresa                      | Secundário                  | Empresa                      |
|-----------|------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| Miosina-V | Rabbit     | [36]                         | Anti-rabbit Alexa Fluor 546 | Molecular Probes, Invitrogen |
| nNOS      | Rabbit     | Zymed                        | Anti-rabbit Alexa Fluor 546 | Molecular Probes, Invitrogen |
| VIP       | Rabbit     | Península Laboratories, Inc. | Anti-rabbit Alexa Fluor 350 | Molecular Probes, Invitrogen |
| CALR      | Goat       | Abcam                        | Anti-goat Alexa Fluor 568   | Molecular Probes, Invitrogen |

Anticorpos utilizados para as técnicas de imunofluorescência. Anti: Miosina-V; óxido nítrico sintase neuronal (nNOS); peptídeo intestinal vasoativo (VIP); calretinina (CALR).

Os preparados de membrana foram lavados (2 x 10 min) em PBS e posteriormente colocados em uma solução de bloqueio contendo PBS, 0,5 % de Triton, 2 % de albumina de soro bovino (BSA) e 10 % de soro de cabra. Depois de 1 h, os preparados foram incubados

com o anticorpo primário por 48 h em temperatura ambiente sob agitação, em um meio de incubação contendo PBS, 2 % de BSA e 2 % de soro de burro. Após lavagem em PBS (5 x 10 min), os preparados foram incubados com os anticorpos secundários utilizando o mesmo meio de incubação acima por 2 h em temperatura ambiente, sob agitação e ao abrigo da luz. Por fim, os preparados foram lavados em PBS e montados em lâminas histológicas com meio de montagem Prolong® Gold Antifade Reagent (Molecular Probes, Life Technologies, Eugene, OR, USA).

#### *Análises quantitativas no plexo mioentérico*

As análises quantitativas foram realizadas em imagens capturadas com um microscópio de fluorescência FSX100, transferidas para o computador através do programa associado e posteriormente analisadas com o auxílio do programa Image-Pro Plus, (Media Cybernetics, Inc). As imagens foram capturadas em aumento total de 170x por amostragem aleatória em todo o preparado de membrana na lâmina histológica, sem a escolha de campos visuais específicos e sem o mesmo campo ser capturado mais de uma vez. Todos os neurônios presentes em 30 imagens capturadas por animal foram contados para cada técnica. A área de cada imagem foi de aproximadamente 0,19 mm<sup>2</sup> e a área total quantificada foi de 5,99 mm<sup>2</sup>, sendo os resultados expressos como neurônios por cm<sup>2</sup>.

#### *Análises morfométricas no plexo mioentérico*

Para a morfometria das populações neuronais no plexo mioentérico, as imagens capturadas em aumento total de 170x foram analisadas com o auxílio do programa Image Pro-Plus. As áreas de 100 corpos celulares neuronais por animal foram mensuradas, para um total de 500 por grupo. As medidas foram realizadas em neurônios onde era possível ver

claramente os limites do corpo celular e os resultados morfométricos foram expressos em  $\mu\text{m}^2$ .

#### *RT-PCR quantitativo em tempo real*

O RNA foi extraído do tecido homogeneizado pelo método de reagente Trizol (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) e extração de fenol/clorofórmio. A transcrição reversa do RNA total foi realizada para 100 ng. A expressão do mRNA foi quantificada por qRT-PCR utilizando o termociclador em tempo real Rotorgene™ 3000 (Qiagen), com primers (Invitrogen) para: TNF- $\alpha$  (forward) 5'-TCATGCACCACCATCAAGGA-3' e TNF- $\alpha$  (reverse) 5'-GACATTCGAGGCTCCAGTGAA-3'; IL6 (forward) 5'-CTCTGGGAAATCGTGGAAATG-3' e IL6 (reverse) 5'-TGCAAGTGCATCATCGTTGTT-3'; IL1b (forward) 5'-TCGCTCAGGGTCACAAGAAA-3' e IL1b (reverse) 5'-TCAGAGGCAAGGAGGAAAACA-3'. Os dados foram analisados com o programa Rotor-Gene Q (Qiagen). A expressão do mRNA foi normalizada para o rRNA 18S e expressa como unidades arbitrárias.

#### *Perfil metagenômico da microbiota*

Amostras das fezes coletadas diretamente do lúmen do colo distal foram mantidas em freezer -80 °C até a análise metagenômica. O DNA foi extraído utilizando o QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) e quantificado. Livrarias foram sintetizadas a partir de 500 ng de DNA total seguindo as instruções do kit Rapid Library Preparation Kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). As amostras foram analisadas no Bioanalyzer com o kit High Sensitive DNA Kit (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, California, USA), e submetidas ao PCR de grande volume, seguindo as instruções do kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). Em seguida, foram sequenciadas pelo GS

FLX Titanium, utilizando o kits GS FLX Titanium PicoTiterPlate Kit e GS FLX Titanium Sequencing Kit XLR70 (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). Dados obtidos pelo sequenciamento foram submetidos ao servidor MG-RAST e comparados entre os grupos [37].

### *Análise estatística*

A análise estatística dos dados obtidos foi realizada através do programa GraphPad Prism (v 5.01, GraphPad Software, Inc), sendo expressos como média  $\pm$  erro padrão. Para a comparação entre os grupos foram realizadas análises de variância one-way (ANOVA), seguida de teste *post hoc* de Tukey, onde o valor de  $p$  menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

## **Resultados**

### *Obesidade, parâmetros sanguíneos e trânsito intestinal*

A DHL promoveu um aumento significativo no peso corporal dos animais do grupo H após as 17 semanas de tratamento (Tabela 3), quando comparados com os grupos controles C ( $p < 0,05$ ) e Ci ( $p < 0,01$ ). O peso da gordura abdominal também aumentou significativamente no grupo H em relação aos grupos C ( $p < 0,01$ ) e Ci ( $p < 0,05$ ). Nos grupos suplementados com inulina não houve diferença nestes parâmetros, quando comparados aos seus respectivos controles. Entretanto, o grupo Hi também não apresentou diferença significativa nestes parâmetros em relação ao grupo C, apenas em relação ao Ci ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 3:** Parâmetros corporais.

|                           | C          | Ci         | H                        | Hi                      |
|---------------------------|------------|------------|--------------------------|-------------------------|
| Peso                      | 53,6 ± 1,4 | 51,2 ± 1,4 | 62,0 ± 1,8 <sup>ab</sup> | 59,6 ± 2,7 <sup>b</sup> |
| Gordura abdominal         | 2,5 ± 0,2  | 1,7 ± 0,3  | 4,3 ± 0,4 <sup>ab</sup>  | 3,6 ± 0,1 <sup>b</sup>  |
| Consumo ração             | 4,4 ± 0,5  | 3,8 ± 0,2  | 4,6 ± 0,3                | 4,0 ± 0,1               |
| Trânsito gastrointestinal | 118 ± 21,3 | 296 ± 21,8 | 76 ± 2,4 <sup>b</sup>    | 128 ± 17,7              |
| Trânsito colônico         | 7,5 ± 0,7  | 8,7 ± 0,5  | 13,3 ± 0,5 <sup>ab</sup> | 6,8 ± 0,5 <sup>c</sup>  |
| Umidade das fezes         | 56,1 ± 3,4 | 57,8 ± 3,0 | 38,4 ± 3,4 <sup>ab</sup> | 58,3 ± 1,9 <sup>c</sup> |
| Glicemia                  | 179 ± 10,6 | 160 ± 10,5 | 191 ± 7,9                | 167 ± 8,2               |
| Proteínas                 | 5,0 ± 0,2  | 5,2 ± 0,1  | 5,5 ± 0,1                | 5,2 ± 0,1               |
| Triglicerídeos            | 130 ± 4,9  | 131 ± 5,6  | 119 ± 2,8                | 133 ± 7,4               |
| Colesterol                | 148 ± 5,2  | 125 ± 7,3  | 184 ± 9,8 <sup>ab</sup>  | 142 ± 12,1 <sup>c</sup> |
| Área do colo distal       | 2,5 ± 0,1  | 3,6 ± 0,2  | 3,4 ± 0,3                | 3,3 ± 0,3               |

Parâmetros corporais avaliados. Peso final (g); peso das gorduras abdominais (g); consumo de ração (g/dia); tempo de trânsito gastrointestinal (min); tempo de trânsito colônico (min); glicemia de jejum (mg/dl); proteínas totais sanguíneas (g/dl); triglicerídeos sanguíneos (mg/dl) colesterol total sanguíneo (mg/ml); área do colo distal (cm<sup>2</sup>). Grupos: controle (C), controle com inulina (Ci), obeso (H) e obeso com inulina (Hi). <sup>a</sup>*p* < 0,05 versus C; <sup>b</sup>*p* < 0,05 versus Ci; <sup>c</sup>*p* < 0,05 versus H. Resultados expressos como média ± erro padrão; n = 5 por grupo.

Tanto o consumo de ração quanto os parâmetros sanguíneos de glicemia de jejum, proteínas totais e triglicerídeos não apresentaram diferenças significativas entre nenhum dos grupos (Tabela 3). O colesterol total foi o único parâmetro sanguíneo alterado, com um

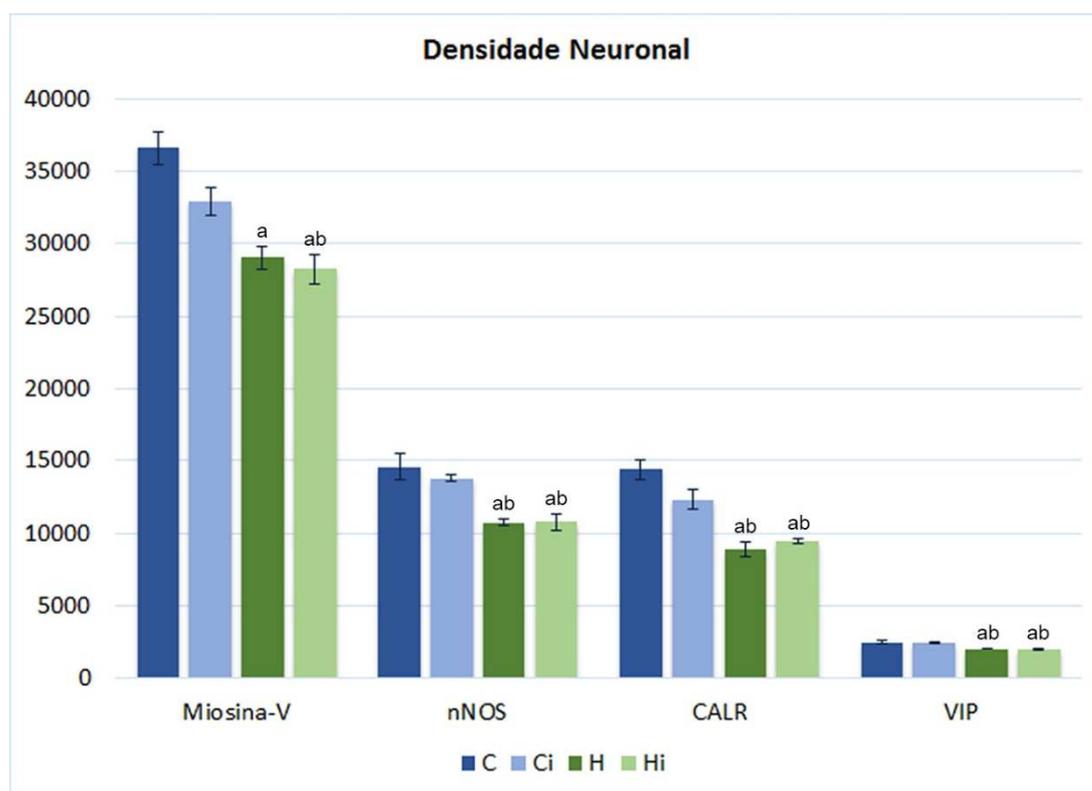
aumento no grupo H em relação aos grupos C ( $p < 0,05$ ) e Ci ( $p < 0,05$ ), e uma redução significativa aos níveis padrão no grupo Hi, quando comparado ao H ( $p < 0,05$ ).

A DHL não causou alteração significativa no tempo de trânsito gastrintestinal, observado pelo teste por gavagem com corante (Tabela 3). No entanto, a motilidade colônica distal foi reduzida no grupo H comparado aos grupos C e Ci ( $p < 0,001$ ), indicada pelo maior tempo de expulsão da esfera. A suplementação do grupo Hi com inulina melhorou a motilidade colônica em relação ao grupo H ( $p < 0,001$ ), com valores similares aos do grupo controle. Em concordância com os resultados de motilidade colônica, a avaliação da umidade nas fezes no grupo H mostrou uma menor quantidade de água em relação aos grupos C ( $p < 0,01$ ) e Ci ( $p < 0,001$ ), e a suplementação no grupo Hi normalizou estes valores ao nível do grupo C ( $p < 0,001$ ).

#### *Densidade neuronal*

A área total do colo distal (comprimento x diâmetro) não apresentou diferença significativa entre nenhum dos grupos (Tabela 3), não sendo necessária a utilização de fator de correção para as estimativas de densidade neuronal. O consumo de DHL por 17 semanas causou mudanças semelhantes nas quatro populações neuronais mioentéricas avaliadas (Figura 1). Houve uma redução significativa na densidade da população neuronal miosina-V-IR (20,5 %) e subpopulações nNOS-IR (26,2 %), CALR-IR (38,2 %) e VIP-IR (18,1 %), quando comparados os grupos H e C ( $p < 0,001$ ). A suplementação com inulina no grupo Hi não resultou em alterações na densidade neuronal para nenhuma das populações estudadas, quando comparado ao grupo H. A perda neuronal causada pela DHL se manteve para todas as subpopulações no grupo Hi, quando comparados os grupos Hi e C ( $p < 0,01$ ).

**Figura 1:** Densidade neuronal mioentérica



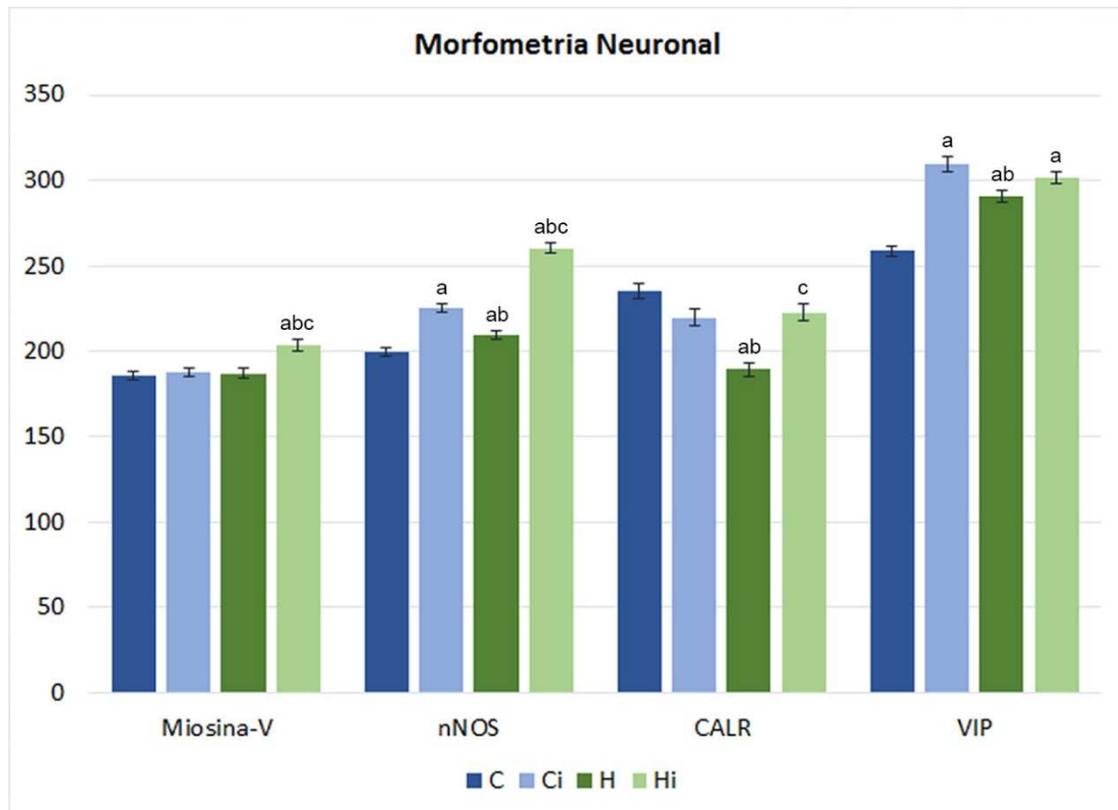
Densidade neuronal geral (neurônios/cm<sup>2</sup>) no plexo mioentérico do colo distal, neurônios marcados para miosina-V, nNOS, calretinina (CALR) e VIP. Grupos: controle (C), controle com inulina (Ci), obeso (H) e obeso com inulina (Hi). <sup>a</sup> $p < 0,05$  versus C; <sup>b</sup> $p < 0,05$  versus Ci. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão; n = 5 por grupo.

### *Morfometria neuronal*

Diferente dos resultados de densidade neuronal, os resultados de morfometria foram distintos entre as populações neuronais avaliadas no colo distal (Figura 2). A área média do corpo celular na população neuronal geral miosina-V-IR não sofreu alteração no grupo H quando comparado ao grupo C, mas o grupo Hi apresentou uma maior área em relação aos grupos H e C ( $p < 0,05$ ). A subpopulação nNOS-IR apresentou um aumento na área do corpo celular neuronal do grupo H em relação ao C ( $p < 0,05$ ), e a suplementação com inulina no grupo Hi resultou em um aumento ainda maior, quando comparado aos grupos H e C ( $p <$

0,05). Nos neurônios CALR-IR, a DHL causou uma redução na área do corpo celular no grupo H em relação ao grupo C ( $p < 0,05$ ), enquanto a suplementação com inulina no grupo Hi restaurou a área do corpo celular neuronal aos valores do grupo controle, quando comparados os grupos Hi e H ( $p < 0,05$ ). Na subpopulação VIP-IR, a DHL aumentou a área do corpo celular neuronal nos grupos H e Hi em relação ao grupo C ( $p < 0,05$ ), enquanto a suplementação com inulina no grupo Hi não promoveu alterações no tamanho do corpo celular quando comparado ao grupo H.

**Figura 2:** Morfometria do corpo celular neuronal

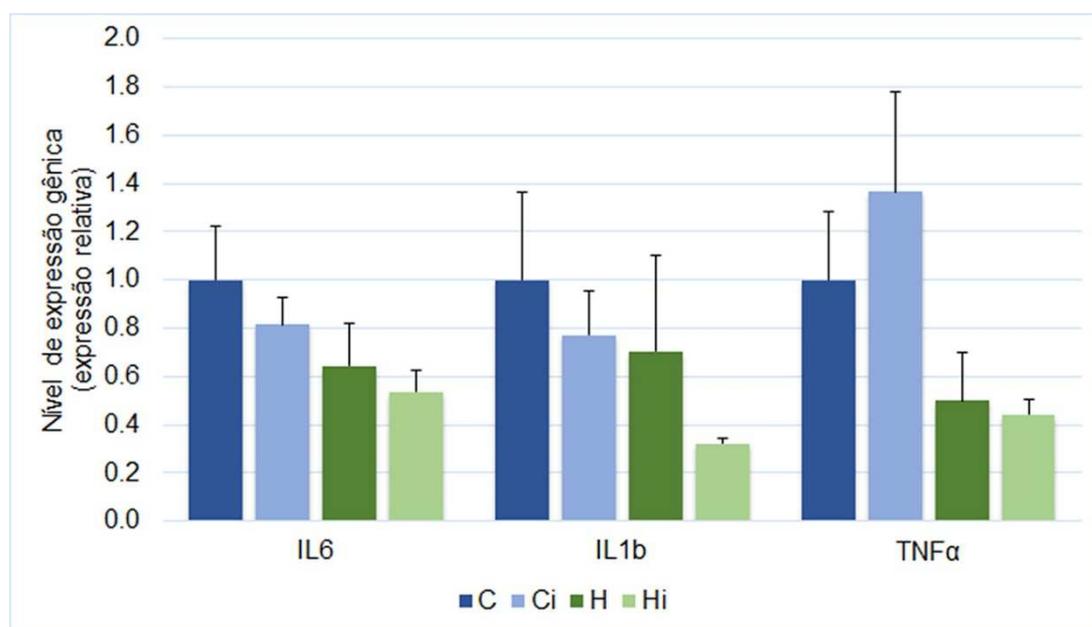


Morfometria do corpo celular neuronal ( $\mu\text{m}^2$ ) no plexo mioentérico do colo distal, neurônios marcados para miosina-V, nNOS, calretinina (CALR) e VIP. Grupos: controle (C), controle com inulina (Ci), obeso (H) e obeso com inulina (Hi). <sup>a</sup> $p < 0,05$  versus C; <sup>b</sup> $p < 0,05$  versus Ci; <sup>c</sup> $p < 0,05$  versus H. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão; n = 5 por grupo.

### RT-PCR quantitativo

Na avaliação dos marcadores de inflamação no colo distal por qRT-PCR, tanto a DHL quanto a suplementação com inulina não tiveram efeitos significativos nos níveis de expressão gênica da IL6, IL1b e TNF- $\alpha$  entre os grupos estudados (Figura 3).

**Figura 3:** Expressão gênica dos marcadores inflamatórios



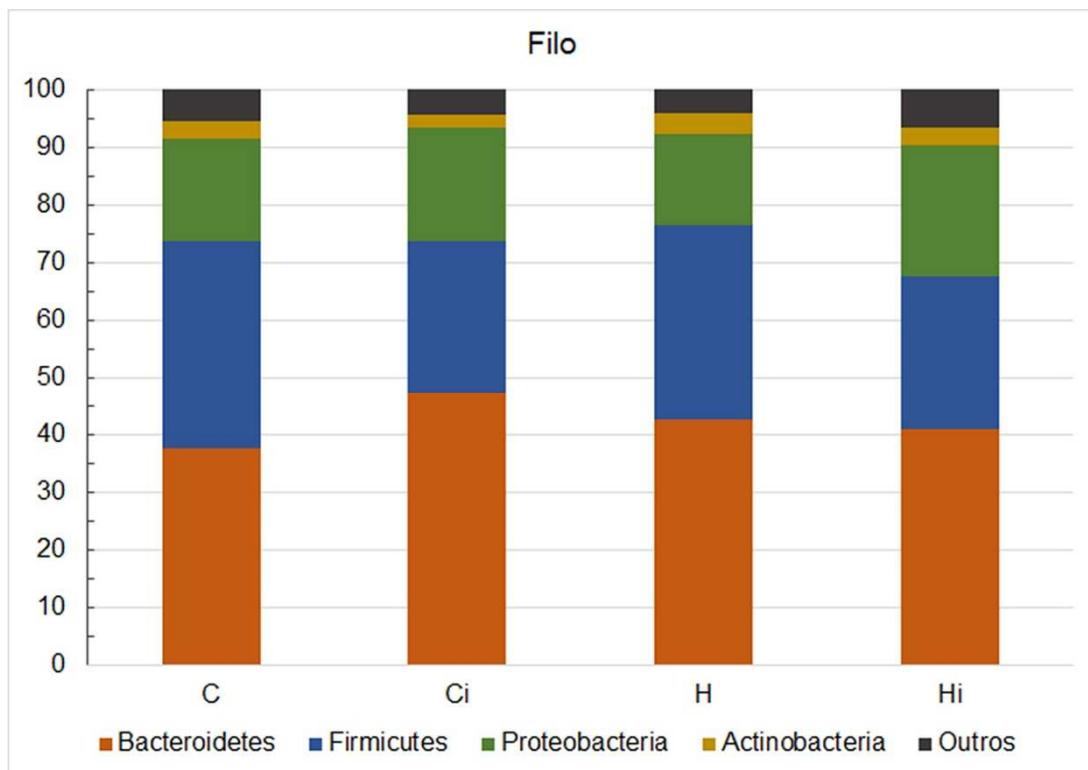
Níveis de expressão gênica dos marcadores IL6, IL1b e TNF- $\alpha$  (expressão relativa) no colo distal. Grupos: controle (C), controle com inulina (Ci), obeso (H) e obeso com inulina (Hi). Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão; n = 5 por grupo.

### Perfil metagenômico da microbiota

Para investigar se a microbiota intestinal sofreu alterações com as dietas em nossa colônia de camundongos, o RNA ribossomal 16S das fezes foi analisado por pirosequenciamento. As comunidades bacterianas do colo distal não apresentaram alterações significativas ao nível de filo ou classe entre todos os grupos. Os filos *Bacteroidetes*, *Firmicutes* e *Proteobacteria* corresponderam a mais de 90 % das leituras identificadas ao

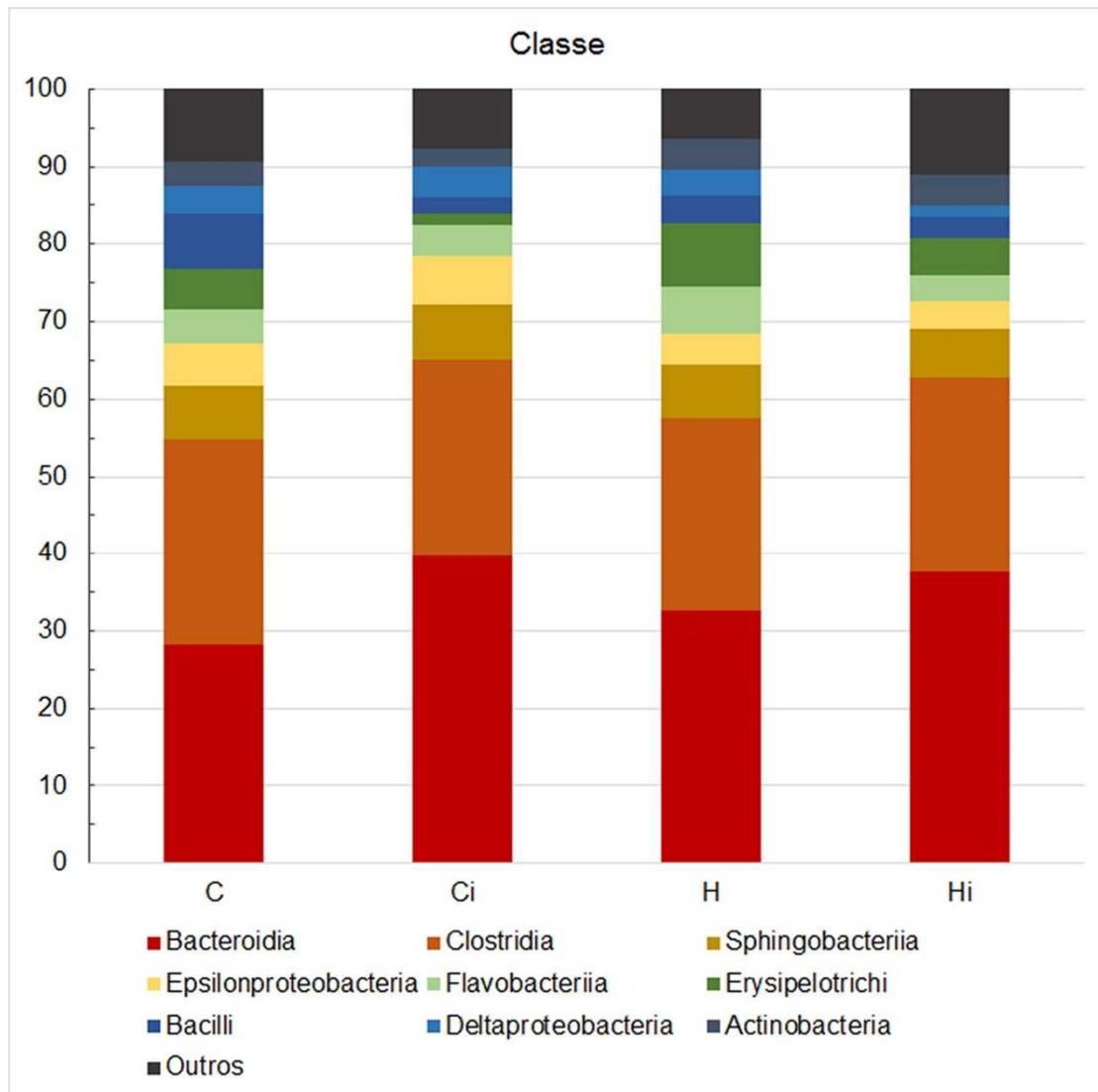
nível de filo (Figura 4). As classes mais predominantes observadas foram a *Bacteroidia* e *Clostridia*, com mais de 50 % das leituras identificadas (Figura 5). Ao nível de gênero, os grupos de interesse *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Oscilospira* e *Desulfovibrio* também não apresentaram alterações significativas entre os grupos, exceto por uma redução no gênero *Lactobacillus* quando comparados os grupos Ci e C ( $p < 0,05$ ) (Figura 6).

**Figura 4:** Perfil da microbiota ao nível de filo



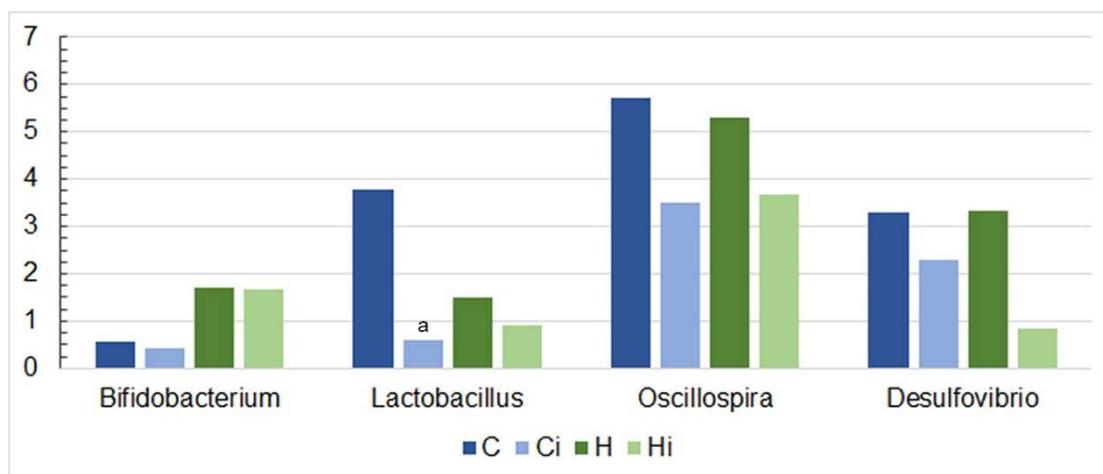
Proporção relativa (%) dos filos encontrados na microbiota colônica. Grupos: controle (C), controle com inulina (Ci), obeso (H) e obeso com inulina (Hi). Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão; n = 5 por grupo.

**Figura 5:** Perfil da microbiota ao nível de classe



Proporção relativa (%) das classes encontradas na microbiota colônica. Grupos: controle (C), controle com inulina (Ci), obeso (H) e obeso com inulina (Hi). Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão; n = 5 por grupo.

**Figura 6:** Perfil da microbiota ao nível de gênero



Proporção relativa (%) dos gêneros de interesse encontrados na microbiota colônica. Grupos: controle (C), controle com inulina (Ci), obeso (H) e obeso com inulina (Hi). Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão; n = 5 por grupo.

## Discussão

Nossos resultados mostraram que a DHL causou atraso no trânsito colônico, perda de neurônios mioentéricos no colo distal e alteração no tamanho destes neurônios em algumas das subpopulações estudadas. Embora os camundongos obesos suplementados com inulina tenham apresentado uma melhora na motilidade colônica, a suplementação com esse prebiótico não foi capaz de impedir a perda neuronal. Além disso, tanto a DHL quanto a suplementação com inulina não causaram alterações significativas no perfil da microbiota intestinal ou nos níveis de expressão de citocinas inflamatórias no intestino.

Os efeitos da DHL em estudos experimentais dependem não somente de sua composição e do tempo de tratamento [38], mas também da espécie e linhagem de roedor utilizado [38, 39]. Os animais do grupo obeso apresentaram um ganho de massa de 15,6 % em relação aos animais do grupo controle, bem como aumento de 70,9 % nos depósitos de

gordura visceral. Em um trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa com a mesma linhagem de camundongos e período de tratamento [15], mas utilizando a ração padrão para roedores como dieta controle, a média de peso dos animais controle (48,6 g) foi menor do que os alimentados com a dieta purificada neste experimento (53,6 g). É possível que a dieta purificada utilizada no presente estudo tenha favorecido o ganho de peso mais elevado observado no grupo controle, devido à mudança de polissacarídeos de plantas da ração padrão para roedores para carboidratos de maior digestibilidade da dieta purificada [40]. Os animais do grupo Hi também apresentaram ganho de peso corporal e das gorduras abdominais, mas em uma intensidade um pouco menor que no grupo H. Isso indica que a inulina teve algum papel na manutenção do peso corporal, seja pelo controle do metabolismo de lipídeos no organismo ou pela regulação da ingestão calórica, como já observado em outros estudos [29, 41].

Em relação ao consumo de ração e aos parâmetros sanguíneos analisados, não observamos diferenças significativas entre os grupos para a glicemia de jejum ou proteínas totais. Estudos com a DHL em modelos experimentais utilizando camundongos reportam resultados variáveis em relação à glicemia dos animais [9, 42], e é provável que essa divergência seja devida principalmente à linhagem dos animais, à composição da dieta e o tempo de tratamento. Camundongos Swiss alimentados por oito semanas com a mesma dieta do grupo obeso apresentaram maior glicemia de jejum, ganho de peso corporal e das gorduras abdominais [42], mas com pouca diferença entre animais controles e obesos, e é possível que a longo prazo a própria dieta controle acabe levando a glicemia aos níveis próximos dos animais obesos.

A DHL não alterou os níveis sanguíneos de triglicerídeos entre os grupos. Nos animais do grupo H houve um aumento nos níveis de colesterol total, resultados semelhantes aos já encontrados para esse modelo [42], e no grupo Hi, a suplementação com inulina

reduziu o colesterol para os níveis fisiológicos. Fibras solúveis como a inulina podem atuar aumentando a secreção de bile, reduzindo o colesterol total [29], além de alguns produtos de sua fermentação no intestino pela microbiota serem capazes de inibir a síntese de colesterol [29].

Vários trabalhos associam as DHLs a alterações nos padrões de motilidade intestinal, principalmente com atraso no tempo de trânsito e baixa atividade de propulsão [3, 4, 6, 9]. Embora nossos animais não tenham apresentado alterações significativas no tempo total de trânsito gastrointestinal total, evidenciado pelo teste por gavagem de corante, a motilidade colônica estava reduzida no grupo H com atraso no tempo do teste de expulsão da esfera, e essa menor motilidade foi acompanhada pelo menor conteúdo de água nas fezes. Assim como também descrita na literatura a associação entre atraso na motilidade e redução na densidade neuronal mioentérica [3, 4], todas as populações neuronais analisadas em nosso trabalho apresentaram densidade reduzida no grupo H. Interessantemente, a suplementação com inulina restaurou o trânsito colônico e a umidade das fezes a níveis fisiológicos nos animais do grupo Hi, mas sem que houvesse proteção neuronal.

O tamanho do intestino em comprimento e circunferência pode ser afetado por processos patológicos, causando a dispersão ou concentração dos neurônios presentes na área de análise [43]. Diferentemente de nosso trabalho anterior com esse mesmo modelo experimental, no qual a área do intestino grosso sofreu uma redução de 33 % nos animais obesos [15], a DHL ou a suplementação com inulina neste estudo não alteraram a área do colo distal dos camundongos, não sendo assim necessária a utilização de um fator de correção para as análises de densidade neuronal. Essa divergência provavelmente se deve à substituição da ração padrão para roedores pela dieta purificada AIN-93 na alimentação dos animais controle, onde a disponibilidade de ingredientes refinados e de maior digestibilidade na dieta purificada [40] parece ter adaptado a morfologia do intestino.

As análises de densidade neuronal miontérica mostram uma redução em todas as populações estudadas nos animais obesos. A população neuronal geral, observada pela marcação da proteína transportadora miosina-V [44] apresentou perda neuronal de 20,5 % nos animais obesos. Nos neurônios motores inibitórios, a subpopulação nitrérgica estava reduzida em 26,2 % e a subpopulação VIPérgica em 18,1 % nos animais obesos, em relação ao grupo controle. A subpopulação marcada para calretinina, produzida por neurônios motores excitatórios e intrínsecos sensoriais [45, 46], foi a mais afetada entre os animais obesos e controles, com perda de 38,2 %. No intestino de camundongos, neurônios positivos para calretinina são colocalizados quase exclusivamente com neurônios excitatórios, que produzem acetilcolina como principal neurotransmissor, e é extremamente rara a colocalização com a nNOS [45], indicando que os neurônios excitatórios podem ter sido mais afetados pela DHL que os neurônios inibitórios. Interessantemente, a neurodegeneração que ocorre naturalmente com o envelhecimento e atribuída ao estresse oxidativo é também associada ao atraso no trânsito colônico e se restringe aos neurônios colinérgicos (excitatórios), com a subpopulação nitrérgica mais resistente e com sua função motora mantida [47]. Várias hipóteses têm sido sugeridas para explicar a neurodegeneração causada pela DHL, incluindo alterações na microbiota e inflamação associada, lipotoxicidade, estresse oxidativo e do retículo endoplasmático [4, 5, 10, 48].

O consumo de DHLs em modelos experimentais está relacionado a alterações na microbiota intestinal de camundongos, particularmente com a redução na quantidade de Bacteroidetes e aumento de Firmicutes [2, 16-18, 49, 50]. Esta mudança na composição dos dois filos dominantes têm sido associada a um aumento nos níveis de endotoxemia sanguínea e marcadores inflamatórios, facilitados pelo aumento na permeabilidade intestinal também observado em modelos experimentais com DHL [4, 18, 21, 26, 51]. Uma de nossas hipóteses sugeridas para explicar a perda neuronal causada pela dieta em nosso trabalho anterior [15]

seria a alteração da microbiota intestinal e consequente aumento na ativação de vias inflamatórias no intestino, resultando em danos celulares. Para investigar se a microbiota colônica foi alterada pela DHL em nossa colônia de camundongos, realizamos a análise metagenômica do DNA presente nas fezes coletadas diretamente do colo distal e, curiosamente, não houve alteração significativa entre os grupos bacterianos no grupo alimentado com a DHL ao nível de filo e classe, bem como nos gêneros de interesse selecionados. Como a suplementação com prebióticos pode modular a microbiota com o aumento de algumas populações bacterianas consideradas benéficas ao organismo, como o gênero *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* [4, 26, 52], utilizamos a suplementação das dietas com inulina para investigarmos se a modulação da microbiota seria capaz de atuar impedindo a perda neuronal mioentérica. Entretanto, também não houve diferenças significativas entre as proporções das comunidades bacterianas colônicas nos grupos suplementados com inulina.

Não está claro o motivo pelo qual não observamos alterações na microbiota, mas podemos sugerir alguns fatores. Em um estudo recente utilizando mais de 100 linhagens diferentes de camundongos alimentados com DLH (32 % kcal de gordura, 8 semanas), Parks et al [39] observaram que o perfil genético dos camundongos exerce um forte papel na composição e plasticidade da microbiota após a alimentação com a DHL, com algumas linhagens apresentando pouca mudança entre os principais filos. Notavelmente, a linhagem Swiss foi uma das linhagens com variação particularmente baixa da microbiota em resposta à DHL. Destacamos também que a grande maioria dos trabalhos com DHL e análise da microbiota utilizam a linhagem C57BL/6 [4, 9, 17, 18, 40, 50], mais sensível à DHL [39], e é provável que o uso de camundongos Swiss em nosso trabalho tenha influenciado os resultados da microbiota.

A alteração na microbiota causada pela DHL favorece a maior produção de lipopolissacarídeos (LPS) e sua absorção pelo organismo [17, 26]. Os LPS são constituintes

da membrana externa de bactérias Gram-negativas e são reconhecidos pelos receptores Toll-like (TLR), ativando vias pro inflamatórias e a liberação de citocinas, além de induzir a morte neuronal *in vitro* [23]. Nós sugerimos anteriormente que a alteração na microbiota causada pela DHL e a consequente ativação de vias pro inflamatórias poderiam ter atuado em conjunto na perda neuronal observada [15], e investigamos neste trabalho o nível de expressão gênica intestinal de IL6, IL1b e TNF- $\alpha$ , marcadores inflamatórios frequentemente associados com a DHL em modelos experimentais com camundongos. Assim como na análise metagenômica, não observamos alteração significativa na expressão desses mediadores. Camundongos alimentados com DHL (45 % kcal de gordura, 16 semanas) apresentaram aumento na expressão de TNF- $\alpha$  no íleo, mas não no colo [53]. Em outro estudo, a DHL (60 % kcal de gordura, 12 semanas) causou aumento na expressão de TNF- $\alpha$ , mas não de IL6, no colo proximal, associada a uma redução na expressão de proteínas do complexo juncional epitelial e aumento na permeabilidade [18]. Em gânglios mioentéricos isolados do colo proximal de camundongos obesos, a DHL (60 % kcal de gordura, 13 semanas) também causou aumento na expressão de IL6, bem como de TLR4 e genes envolvidos na sua sinalização [4]. Apesar de esses estudos apontarem resultados variados quanto à expressão dessas citocinas no intestino, todos foram realizados com a linhagem C57BL e também foi observada a alteração na microbiota nos animais obesos, sugerindo que nossos resultados da análise metagenômica e dos níveis de expressão de mediadores inflamatórios estão relacionados.

Além dos LPS, ácidos graxos de cadeia curta também podem ativar diretamente a via de sinalização do TLR4 [21, 25], indicando que o excesso de lipídios na DHL pode ter uma ação direta na neurodegeneração causada pelas DHLs [4]. O palmitato é um ácido graxo saturado livre de cadeia curta que corresponde a aproximadamente 30 % do conteúdo lipídico presente na banha utilizada na DHL [13]. Embora seus mecanismos celulares específicos nos

neurônios ainda não tenham sido investigados, estudos *in vivo* e *in vitro* sugerem que o palmitato tenha um papel significativo nos danos aos neurônios entéricos. Voss et al [10] observaram perda neuronal mioentérica no íleo e colo em camundongos alimentados com DHL (45 % kcal da gordura, 6 meses), bem como danos gradativamente crescentes a neurônios e células musculares intestinais expostos a diferentes concentrações de palmitato *in vitro*. No metabolismo do palmitato, o transportador carnitina palmitoil-transferase nas membranas de mitocôndrias e do retículo endoplasmático faz a conversão do palmitoil-CoA para palmitoilcarnitina, um intermediário que pode promover a desestabilização da membrana, liberação de cálcio e ativação de caspases [54], e o bloqueio *in vitro* da carnitina palmitoil-transferase pela ação de inibidores é capaz de impedir a perda neuronal induzida pelo palmitato [10]. Além disso, como esse transporte envolve o acetil-CoA, altos níveis de palmitato resultam em uma menor disponibilidade deste intermediário. Como o acetil-CoA é também utilizado na produção do neurotransmissor excitatório acetilcolina [55], a manutenção celular de neurônios que expressam esse neurotransmissor pode ser comprometida pelo excesso de palmitato. Isto reforça os nossos resultados, onde os neurônios excitatórios parecem ter sido mais afetados pela dieta no grupo obeso.

Outros trabalhos recentes com a DHL também reportam perda neuronal mioentérica em camundongos. Anitha et al [4] encontraram perda neuronal no colo proximal de camundongos alimentados com DHL (60 % kcal de gordura, 13 semanas), associada ao atraso na motilidade e alteração na microbiota, e a suplementação com o prebiótico oligofrutose foi capaz de prevenir essas mudanças causadas pela dieta. Os autores ainda avaliaram a exposição de neurônios *in vitro* ao palmitato e a relação com a ativação da via do TLR4, sugerindo que a DHL afeta cronicamente a sinalização do TLR4, causando apoptose neuronal e consequente dismotilidade. Outro trabalho encontrou perda neuronal da população geral e nitrérgica no íleo, ceco e colo [9], atribuída à ação direta dos lipídios da DHL

utilizada (21 % do peso de gordura, 2 % colesterol, 33 semanas) ou de seus produtos metabólicos nos neurônios entéricos. Camundongos alimentados com DHL (72 % kcal de gordura, 8 semanas) também tiveram perda neuronal mioentérica na população geral HuC/D, nNOS e VIP no duodeno, acompanhada de colocalização de marcadores de apoptose e danos aos axônios, perda de neurofilamentos e microtúbulos do citoesqueleto [12]. Em outro trabalho do mesmo grupo com um tempo maior de tratamento, a DHL (72 % kcal de gordura, 20 semanas) causou perda neuronal apenas nos neurônios ChAT e VIP, com aumento nos neurônios nNOS, sugerindo que o sistema nervoso entérico pode passar por respostas adaptativas em resposta a tempos maiores de tratamento [13].

O estresse oxidativo e o estresse do retículo endoplasmático também parecem atuar na neurodegeneração causada pela DHL. Nezami et al [5] observaram atraso na motilidade intestinal e perda neuronal nas populações geral (periferina), inibitórias (nNOS) e excitatórias (ChAT) no colo proximal de camundongos alimentados com DHL (60 % kcal de gordura, 11 semanas), bem como associação a marcadores de apoptose. *In vitro*, os autores observaram em cultura de neurônios entéricos expostos ao palmitato um inchaço do retículo endoplasmático, aumento nos marcadores de estresse do RE, aumento nos níveis de superóxido dismutase (SOD), redução na quantidade e inchaço de mitocôndrias, resultados que indicam danos severos às organelas celulares. A resposta de estresse do RE é causada pelo acúmulo de proteínas mal enoveladas no lúmen da organela. Embora as células tenham mecanismos de autofagia em resposta ao estresse do RE buscando restaurar a sobrevivência celular, a célula pode ativar as vias de apoptose se a resposta de estresse for mantida por períodos extensos [56]. Além do estresse do retículo ER, a disfunção mitocondrial parece ter importante papel na sobrevivência de neurônios entéricos, como evidenciado pelo estudo de camundongos com disfunção seletiva para células do SNE [57].

Na avaliação da área do corpo celular neuronal, observamos que a DHL atuou de maneira distinta nas subpopulações estudadas. A população geral positiva para miosina-V não apresentou alteração no tamanho dos corpos celulares neuronais, enquanto as subpopulações positivas para nNOS e VIP, considerados neurônios motores inibitórios, apresentaram um aumento do corpo celular (4,8 % e 12,3 %, respectivamente). Estes resultados diferem do nosso trabalho anterior, no qual as duas subpopulações tiveram uma redução no tamanho do corpo celular neuronal no grupo H [15]. É possível que a substituição da ração padrão para roedores no grupo controle pela dieta purificada AIN-93 tenha sido responsável por esses resultados diferentes, uma vez que a área do colo nos animais controle também foi reduzida no presente trabalho, em relação ao anterior. Já os neurônios marcados para calretinina tiveram uma redução significativa no tamanho do corpo celular (19,4 %) nos animais do grupo H. Interessantemente, os neurônios calretinina também foram os mais afetados pela perda neuronal, sugerindo uma maior sensibilidade destes neurônios à DHL.

## **Conclusão**

Este trabalho mostrou que a alimentação com dieta hiperlipídica ou a suplementação com inulina por longo período não alterou a microbiota intestinal ou os níveis de expressão gênica de marcadores inflamatórios no colo distal de camundongos Swiss, indicando que esses animais são aparentemente mais resistentes a mudanças causadas pela dieta nestes parâmetros. Ainda assim, os camundongos obesos apresentaram perda neuronal em todas as subpopulações estudadas e consequente atraso no trânsito colônico, e a inulina não foi capaz de atenuar a perda neuronal. Isto sugere que fatores diretamente ligados ao excesso de lipídios da dieta, e não somente à alteração da microbiota e inflamação, afetem o sistema nervoso entérico em modelos experimentais de obesidade por dieta hiperlipídica. A

realização de outros estudos investigando a ação direta dos ácidos graxos sobre a perda neuronal mioentérica em camundongos dessa linhagem poderia ajudar a melhor entender o papel da dieta hiperlipídica na neurodegeneração.

## **Agradecimentos**

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular da Universidade Estadual de Maringá e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

## **Referências**

- [1] G.S. Hotamisligil, Inflammation and metabolic disorders, *Nature*, 444 (2006) 860-867.
- [2] E.A. Murphy, K.T. Velazquez, K.M. Herbert, Influence of high-fat diet on gut microbiota: a driving force for chronic disease risk, *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 18 (2015) 515-520.
- [3] M.A. Mushref, S. Srinivasan, Effect of high fat-diet and obesity on gastrointestinal motility, *Ann Transl Med*, 1 (2013) 14.
- [4] M. Anitha, F. Reichardt, S. Tabatabavakili, B.G. Nezami, B. Chassaing, S. Mwangi, M. Vijay-Kumar, A. Gewirtz, S. Srinivasan, Intestinal Dysbiosis Contributes to the Delayed Gastrointestinal Transit in High-Fat Diet Fed Mice, in, Elsevier Inc, *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2016.
- [5] B.G. Nezami, S.M. Mwangi, J.E. Lee, S. Jeppsson, M. Anitha, S.S. Yarandi, A.B. Farris, S. Srinivasan, MicroRNA 375 mediates palmitate-induced enteric neuronal damage and high-fat diet-induced delayed intestinal transit in mice, *Gastroenterology*, 146 (2014) 473-483.e473.

- [6] K.M. Park, W.J. Bowers, Tumor necrosis factor-alpha mediated signaling in neuronal homeostasis and dysfunction, *Cell Signal*, 22 (2010) 977-983.
- [7] J.B. Furness, The enteric nervous system: normal functions and enteric neuropathies, *Neurogastroenterol Motil*, 20 Suppl 1 (2008) 32-38.
- [8] M. Neunlist, M. Schemann, Nutrient-induced changes in the phenotype and function of the enteric nervous system, *J Physiol*, 592 (2014) 2959-2965.
- [9] L.R. Rivera, C. Leung, R.V. Pustovit, B.L. Hunne, S. Andrikopoulos, C. Herath, A. Testro, P.W. Angus, J.B. Furness, Damage to enteric neurons occurs in mice that develop fatty liver disease but not diabetes in response to a high-fat diet, *Neurogastroenterol Motil*, 26 (2014) 1188-1199.
- [10] U. Voss, E. Sand, B. Olde, E. Ekblad, Enteric neuropathy can be induced by high fat diet in vivo and palmitic acid exposure in vitro, *PLoS One*, 8 (2013) e81413.
- [11] U. Voss, M.F. Turesson, B. Robaye, J.M. Boeynaems, B. Olde, D. Erlinge, E. Ekblad, The enteric nervous system of P2Y<sub>13</sub> receptor null mice is resistant against high-fat-diet- and palmitic-acid-induced neuronal loss, *Purinergic Signal*, (2014).
- [12] C.M. Stenkamp-Strahm, A.J. Kappmeyer, J.T. Schmalz, M. Gericke, O. Balemba, High-fat diet ingestion correlates with neuropathy in the duodenum myenteric plexus of obese mice with symptoms of type 2 diabetes, *Cell Tissue Res*, 354 (2013) 381-394.
- [13] C.M. Stenkamp-Strahm, Y.E. Nyavor, A.J. Kappmeyer, S. Horton, M. Gericke, O.B. Balemba, Prolonged high fat diet ingestion, obesity, and type 2 diabetes symptoms correlate with phenotypic plasticity in myenteric neurons and nerve damage in the mouse duodenum, *Cell Tissue Res*, 361 (2015) 411-426.
- [14] A. Soares, E.J. Beraldi, P.E. Ferreira, R.B. Bazotte, N.C. Buttow, Intestinal and neuronal myenteric adaptations in the small intestine induced by a high-fat diet in mice, *BMC Gastroenterol*, 15 (2015) 3.

- [15] E.J. Beraldi, A. Soares, S.C. Borges, A.C. de Souza, M.R. Natali, R.B. Bazotte, N.C. Buttow, High-Fat Diet Promotes Neuronal Loss in the Myenteric Plexus of the Large Intestine in Mice, *Dig Dis Sci*, (2014).
- [16] T. Liu, H. Hougen, A.C. Vollmer, S.M. Hiebert, Gut bacteria profiles of *Mus musculus* at the phylum and family levels are influenced by saturation of dietary fatty acids, *Anaerobe*, (2012).
- [17] M. Serino, E. Luche, S. Gres, A. Baylac, M. Bergé, C. Cenac, A. Waget, P. Klopp, J. Iacovoni, C. Klopp, J. Mariette, O. Bouchez, J. Lluch, F. Ouarné, P. Monsan, P. Valet, C. Roques, J. Amar, A. Bouloumié, V. Théodorou, R. Burcelin, Metabolic adaptation to a high-fat diet is associated with a change in the gut microbiota, *Gut*, 61 (2012) 543-553.
- [18] Y.Y. Lam, C.W. Ha, C.R. Campbell, A.J. Mitchell, A. Dinudom, J. Oscarsson, D.I. Cook, N.H. Hunt, I.D. Caterson, A.J. Holmes, L.H. Storlien, Increased gut permeability and microbiota change associate with mesenteric fat inflammation and metabolic dysfunction in diet-induced obese mice, *PLoS One*, 7 (2012) e34233.
- [19] P.D. Cani, R. Bibiloni, C. Knauf, A. Waget, A.M. Neyrinck, N.M. Delzenne, R. Burcelin, Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice, *Diabetes*, 57 (2008) 1470-1481.
- [20] H. Li, C. Lelliott, P. Håkansson, K. Ploj, A. Tuneld, M. Verolin-Johansson, L. Benthem, B. Carlsson, L. Storlien, E. Michaëlsson, Intestinal, adipose, and liver inflammation in diet-induced obese mice, *Metabolism*, 57 (2008) 1704-1710.
- [21] N. Wang, H. Wang, H. Yao, Q. Wei, X.M. Mao, T. Jiang, J. Xiang, N. Dila, Expression and activity of the TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway in mouse intestine following administration of a short-term high-fat diet, *Exp Ther Med*, 6 (2013) 635-640.
- [22] S.E. Lakhan, A. Kirchgessner, Gut microbiota and sirtuins in obesity-related inflammation and bowel dysfunction, *J Transl Med*, 9 (2011) 202.

- [23] M.B. Arciszewski, E. Sand, E. Ekblad, Vasoactive intestinal peptide rescues cultured rat myenteric neurons from lipopolysaccharide induced cell death, *Regul Pept*, 146 (2008) 218-223.
- [24] S. Coquenlorge, E. Duchalais, J. Chevalier, F. Cossais, M. Rolli-Derkinderen, M. Neunlist, Modulation of lipopolysaccharide-induced neuronal response by activation of the enteric nervous system, *J Neuroinflammation*, 11 (2014) 202.
- [25] S. Huang, J.M. Rutkowski, R.G. Snodgrass, K.D. Ono-Moore, D.A. Schneider, J.W. Newman, S.H. Adams, D.H. Hwang, Saturated fatty acids activate TLR-mediated proinflammatory signaling pathways, *J Lipid Res*, 53 (2012) 2002-2013.
- [26] P.D. Cani, A.M. Neyrinck, F. Fava, C. Knauf, R.G. Burcelin, K.M. Tuohy, G.R. Gibson, N.M. Delzenne, Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia, *Diabetologia*, 50 (2007) 2374-2383.
- [27] M. Tsurumaki, M. Kotake, M. Iwasaki, M. Saito, K. Tanaka, W. Aw, S. Fukuda, M. Tomita, The application of omics technologies in the functional evaluation of inulin and inulin-containing prebiotics dietary supplementation, *Nutr Diabetes*, 5 (2015) e185.
- [28] M.B. Roberfroid, Inulin-type fructans: functional food ingredients, *J Nutr*, 137 (2007) 2493S-2502S.
- [29] J.M. Lattimer, M.D. Haub, Effects of dietary fiber and its components on metabolic health, *Nutrients*, 2 (2010) 1266-1289.
- [30] P.G. Reeves, Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet, *J Nutr*, 127 (1997) 838S-841S.
- [31] F. Calcina, E. Barocelli, S. Bertoni, O. Furukawa, J. Kaunitz, M. Impicciatore, C. Sternini, Effect of N-methyl-d-aspartate receptor blockade on neuronal plasticity and

gastrointestinal transit delay induced by ischemia/reperfusion in rats, *Neuroscience*, 134 (2005) 39-49.

[32] A.C. Drengk, J.K. Kajiwarra, S.B. Garcia, V.S. Carmo, R.E. Larson, S. Zucoloto, E.M. Espreafico, Immunolocalisation of myosin-V in the enteric nervous system of the rat, *J Auton Nerv Syst*, 78 (2000) 109-112.

[33] N.C. Buttow, S. Zucoloto, E.M. Espreafico, P. Gama, E.P. Alvares, Substance P enhances neuronal area and epithelial cell proliferation after colon denervation in rats, *Dig Dis Sci*, 48 (2003) 2069-2076.

[34] J.P. Schoffen, A. Soares, P. de Freitas, N.C. Buttow, M.R. Natali, Effects of a hypoproteic diet on myosin-V immunostained myenteric neurons and the proximal colon wall of aging rats, *Auton Neurosci*, 122 (2005) 77-83.

[35] I.D. Souza, J.S. Ribeiro, C.A. Bersani-Amado, J.N. Zanoni, Analysis of myosin-V immunoreactive myenteric neurons from arthritic rats, *Arq Gastroenterol*, 48 (2011) 205-210.

[36] N.C. Buttow, S. Zucoloto, E.M. Espreafico, P. Gama, E.P. Alvares, Substance P enhances neuronal area and epithelial cell proliferation after colon denervation in rats., *Dig Dis Sci*, 48 (2003) 2069-2076.

[37] A.M. Caricilli, P.K. Picardi, L.L. de Abreu, M. Ueno, P.O. Prada, E.R. Ropelle, S.M. Hirabara, Â. Castoldi, P. Vieira, N.O. Camara, R. Curi, J.B. Carvalheira, M.J. Saad, Gut microbiota is a key modulator of insulin resistance in TLR 2 knockout mice, *PLoS Biol*, 9 (2011) e1001212.

[38] R. Buettner, J. Schölmerich, L.C. Bollheimer, High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents., *Obesity (Silver Spring)*, 15 (2007) 798-808.

[39] B.W. Parks, E. Nam, E. Org, E. Kostem, F. Norheim, S.T. Hui, C. Pan, M. Civelek, C.D. Rau, B.J. Bennett, M. Mehrabian, L.K. Ursell, A. He, L.W. Castellani, B. Zinker, M. Kirby, T.A. Drake, C.A. Drevon, R. Knight, P. Gargalovic, T. Kirchgessner, E. Eskin, A.J. Lusic,

Genetic control of obesity and gut microbiota composition in response to high-fat, high-sucrose diet in mice, *Cell Metab*, 17 (2013) 141-152.

[40] R.N. Carmody, G.K. Gerber, J.M. Luevano, D.M. Gatti, L. Somes, K.L. Svenson, P.J. Turnbaugh, Diet dominates host genotype in shaping the murine gut microbiota, *Cell Host Microbe*, 17 (2015) 72-84.

[41] N.M. Delzenne, A.M. Neyrinck, P.D. Cani, Modulation of the gut microbiota by nutrients with prebiotic properties: consequences for host health in the context of obesity and metabolic syndrome, *Microb Cell Fact*, 10 Suppl 1 (2011) S10.

[42] S. Obici, T.M. Tavoni, H.C. Barrena, R. Curi, R.B. Bazotte, Time sequence of the intensification of the liver glucose production induced by high-fat diet in mice, *Cell Biochem Funct*, 30 (2012) 335-339.

[43] R.J. Phillips, T.L. Powley, Innervation of the gastrointestinal tract: patterns of aging, *Auton Neurosci*, 136 (2007) 1-19.

[44] J.A. Hammer, W. Wagner, Functions of class V myosins in neurons, *J Biol Chem*, 288 (2013) 28428-28434.

[45] Z.D. Qu, M. Thacker, P. Castelucci, M. Bagyánszki, M.L. Epstein, J.B. Furness, Immunohistochemical analysis of neuron types in the mouse small intestine, *Cell Tissue Res*, 334 (2008) 147-161.

[46] J.B. Furness, *The Enteric Nervous System*, 1 ed., Blackwell Publishing, Inc., Victoria, Australia, 2006.

[47] B. Wiskur, B. Greenwood-Van Meerveld, The aging colon: the role of enteric neurodegeneration in constipation, *Curr Gastroenterol Rep*, 12 (2010) 507-512.

[48] C. Stenkamp-Strahm, S. Patterson, J. Boren, M. Gericke, O. Balemba, High-fat diet and age-dependent effects on enteric glial cell populations of mouse small intestine, *Auton Neurosci*, 177 (2013) 199-210.

- [49] M. Anitha, M. Vijay-Kumar, S.V. Sitaraman, A.T. Gewirtz, S. Srinivasan, Gut microbial products regulate murine gastrointestinal motility via Toll-like receptor 4 signaling, *Gastroenterology*, 143 (2012) 1006-1016.e1004.
- [50] M.A. Hildebrandt, C. Hoffmann, S.A. Sherrill-Mix, S.A. Keilbaugh, M. Hamady, Y.Y. Chen, R. Knight, R.S. Ahima, F. Bushman, G.D. Wu, High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity, *Gastroenterology*, 137 (2009) 1716-1724.e1711-1712.
- [51] P.D. Cani, J. Amar, M.A. Iglesias, M. Poggi, C. Knauf, D. Bastelica, A.M. Neyrinck, F. Fava, K.M. Tuohy, C. Chabo, A. Waget, E. Delmée, B. Cousin, T. Sulpice, B. Chamontin, J. Ferrières, J.F. Tanti, G.R. Gibson, L. Casteilla, N.M. Delzenne, M.C. Alessi, R. Burcelin, Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance, *Diabetes*, 56 (2007) 1761-1772.
- [52] P.D. Cani, N.M. Delzenne, J. Amar, R. Burcelin, Role of gut microflora in the development of obesity and insulin resistance following high-fat diet feeding, *Pathol Biol (Paris)*, 56 (2008) 305-309.
- [53] S. Ding, M.M. Chi, B.P. Scull, R. Rigby, N.M. Schwerbrock, S. Magness, C. Jobin, P.K. Lund, High-fat diet: bacteria interactions promote intestinal inflammation which precedes and correlates with obesity and insulin resistance in mouse, *PLoS One*, 5 (2010) e12191.
- [54] A.Y. Sierra, E. Gratacós, P. Carrasco, J. Clotet, J. Ureña, D. Serra, G. Asins, F.G. Hegardt, N. Casals, CPT1c is localized in endoplasmic reticulum of neurons and has carnitine palmitoyltransferase activity, *J Biol Chem*, 283 (2008) 6878-6885.
- [55] A. Virmani, Z. Binienda, Role of carnitine esters in brain neuropathology, *Mol Aspects Med*, 25 (2004) 533-549.
- [56] G. Jing, J.J. Wang, S.X. Zhang, ER stress and apoptosis: a new mechanism for retinal cell death, *Exp Diabetes Res*, 2012 (2012) 589589.

[57] A. Viader, E.C. Wright-Jin, B.P. Vohra, R.O. Heuckeroth, J. Milbrandt, Differential regional and subtype-specific vulnerability of enteric neurons to mitochondrial dysfunction, *PLoS One*, 6 (2011) e27727.

**Resveratrol promove neuroproteção mioentérica no intestino grosso de ratos com diabetes experimental**

Evandro José Beraldi, Karina Keiko Kido, Paulo Emílio Botura Ferreira, Nilza Cristina Buttow.

Evandro José Beraldi, Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil. E-mail: evandroberaldi@gmail.com

Karina Keiko Kido, Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil. E-mail: karina.kido@gmail.com

Paulo Emílio Botura Ferreira, Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, RS, Brasil. E-mail: pbotura@gmail.com

Nilza Cristina Buttow, Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil. E-mail: ncbuttow@gmail.com

Autor correspondente: Nilza Cristina Buttow, e-mail: ncbuttow@gmail.com

## **Abstract**

*Introduction:* Gastrointestinal symptoms associated with diabetes, such as diarrhea and abdominal pain, are related to damage to the enteric nervous system. Oxidative stress is indicated as a major cause of neurodegeneration and antioxidants can act reducing the damaging effects of diabetes in the body.

*Objectives:* We investigated if the treatment with resveratrol is capable of minimize the damage to the myenteric innervation of the large intestine in rats with experimental diabetes.

*Methods:* Rats with streptozotocin-induced diabetes were treated with resveratrol (10 mg / kg) for 17 weeks. We assessed physiological parameters, neuronal density and cell body morphometry in the myenteric plexus by immunofluorescence techniques.

*Results:* Diabetes caused typical signals of the experimental model, such as high blood glucose levels, body weight loss, increased gastrointestinal transit speed and neurodegeneration of the total myenteric population and nitrergic subpopulation. Resveratrol presented partial protective effect for part of the damage to the myenteric neurons in diabetic rats. Although resveratrol treatment did not reduce the blood glucose of diabetic rats, some physiological parameters were improved, such as weight loss and water consumption.

*Conclusions:* Resveratrol showed an important protective role in the enteric nervous system of diabetic rats.

## **Resumo**

*Introdução:* Sintomas gastrointestinais associados ao diabetes, como diarreia e dor abdominal, são relacionados à danos ao sistema nervoso entérico. O estresse oxidativo é apontado com uma das principais causas da neurodegeneração e compostos antioxidantes podem atuar reduzindo os efeitos danosos do diabetes no organismo.

*Objetivos:* Investigamos neste trabalho se o tratamento com resveratrol em ratos com diabetes experimental é capaz de atuar minimizando os danos na inervação mioentérica do intestino grosso.

*Métodos:* Ratos com diabetes induzida por estreptozotocina foram tratados com resveratrol (10 mg/kg) por 17 semanas. Foram realizadas a avaliação de parâmetros fisiológicos e análises de densidade neuronal e morfometria do corpo celular através de imunofluorescência no plexo mioentérico.

*Resultados:* O diabetes causou sintomas típicos do modelo experimental, como alta glicemia sanguínea, perda de massa corporal e aumento na velocidade do trânsito gastrointestinal, além de neurodegeneração na população total e subpopulação nitrérgica. O resveratrol não foi capaz de impedir totalmente a perda neuronal, mas amenizou em parte os danos aos neurônios mioentéricos no grupo diabético tratado. Embora o tratamento também não tenha reduzido a glicemia dos animais diabéticos, alguns parâmetros fisiológicos tiveram melhoras, como a perda de peso e consumo de água.

*Conclusões:* O resveratrol demonstrou ter um importante papel na neuroproteção do sistema nervoso entérico contra os danos causados no diabetes experimental.

**Palavras-chave:** diabetes, resveratrol, plexo mioentérico, antioxidantes, neuroproteção, motilidade colônica.

## Introdução

O diabetes mellitus é uma doença metabólica de origem múltipla caracterizada pela hiperglicemia, resultante da deficiência na ação do hormônio insulina [1]. A hiperglicemia pode causar disfunções como a neuropatia diabética, afetando as funções gastrintestinais, nervos motores e nervos sensoriais periféricos, bem como o sistema nervoso autônomo [2]. No organismo, estes sinais comumente se manifestam como náuseas, vômitos, diarreia, dor abdominal e constipação [3], normalmente associados a danos ao sistema nervoso entérico [4]. Estudos experimentais em ratos com diabetes induzido por estreptozotocina (STZ) mostram que, a curto ou longo prazo, os neurônios mioentéricos sofrem redução na densidade neuronal no estômago [5], duodeno [6], íleo [7, 8], ceco [9] e colo [10-12].

Embora os mecanismos que atuem na neuropatia ainda não sejam totalmente conhecidos, a hiperglicemia, dislipidemia, estresse oxidativo e produtos de glicação avançada são fatores comumente apontados [4]. O estresse oxidativo, resultado do desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a capacidade antioxidante normal do sistema biológico [13], danifica proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, podendo resultar em morte celular por necrose ou apoptose [14]. O tratamento com antioxidantes que possam prevenir a formação ou neutralizar o estresse oxidativo, minimizando ou evitando as complicações neurológicas do diabetes, tem sido explorado em vários estudos [15-18]. Uma substância com comprovada atividade antioxidante é o resveratrol (*3,5,4'-trihydroxystilbene*) [19-22], um polifenol encontrado em altas concentrações na casca e sementes de uvas, no vinho tinto, no amendoim, chocolate e amora [23-25]. As propriedades antioxidantes do resveratrol (RSV) devem-se à capacidade de neutralizar espécies reativas de oxigênio [24, 26], aumentando também os níveis de enzimas antioxidantes [27]. Além disso, outros achados sugerem que o

RSV ativa genes SIRT1 e a produção de vitagenes [26] envolvidos em funções chaves da neurodegeneração [28].

Assim, devido ao importante papel que o estresse oxidativo apresenta ter nos processos de neurodegeneração, nós investigamos se o tratamento com resveratrol é capaz minimizar os danos causados pelo diabetes induzido por STZ na inervação mioentérica do intestino grosso de ratos.

## **Métodos**

### *Grupo de estudo e delineamento experimental*

Os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Maringá (parecer nº 088/2012) e tratados dentro das normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Foram utilizados 24 ratos Wistar adultos, machos, espécie *Rattus norvegicus*, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá. Com idade inicial de 88 dias, os animais foram transferidos para o Biotério Setorial do Departamento de Ciências Morfológicas, onde permaneceram alojados em gaiolas providas de bebedouro, comedouro, e mantidos em condições ambientais controladas de temperatura ( $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e iluminação (ciclo de 12 horas claro/escuro).

Após o período de adaptação ao novo ambiente, os ratos (90 dias de idade) foram pesados e submetidos ao período experimental, que teve duração de 120 dias. Os ratos foram distribuídos aleatoriamente em quatro (4) grupos de seis (6) animais cada, segundo os tratamentos a que foram submetidos: grupo C, ratos normoglicêmicos (controle); grupo CR,

ratos normoglicêmicos tratados com resveratrol; grupo D, ratos diabéticos; e grupo DR, ratos diabéticos tratados com resveratrol.

#### *Indução do diabetes e tratamento com resveratrol*

A indução do diabetes mellitus foi realizada nos grupos D e DR, submetidos a jejum prévio de 14 horas antes de serem injetados com estreptozotocina por via endovenosa (veia peniana), na dose de 35 mg/kg de peso corporal (Sigma, ST. Louis, MO, USA), dissolvida em tampão citrato 10 mmol/l (pH 4,5). No quarto dia após a aplicação, antes de iniciar o tratamento, foi realizado o teste de glicemia por fita reativa e glicosímetro para confirmação do estado diabético nos animais dos grupos D e DR, sendo considerados diabéticos todos os animais que apresentaram glicemia acima de 250 mg/dl. A partir do quarto dia do experimento, os animais dos grupos CR e DR passaram a receber tratamento diário com resveratrol na dosagem de 10 mg/kg de peso corporal, via gavagem, até o final do experimento. Além disso, o acompanhamento mensal da glicemia nos animais diabéticos foi realizado durante o experimento para a verificação da manutenção do estado hiperglicêmico (dados não mostrados). O consumo de ração, água e volume de excreção de urina dos grupos foi avaliado na última semana de experimento através do uso de gaiolas metabólicas individuais.

#### *Tempo de trânsito gastrointestinal*

Os camundongos receberam uma solução contendo 0,1 ml de um corante não absorvível (3 % Carmine Red, 0,5 % metilcelulose) [29] via gavagem, e o tempo até a eliminação da primeira pelota fecal colorida foi determinado e expresso em minutos. O teste foi realizado na última semana de experimento e os camundongos foram mantidos em gaiolas individuais durante a observação.

### *Coleta do material de estudo*

Após 120 dias de experimento, os ratos (210 dias de idade) foram deixados em jejum de 12 h antes da coleta das amostras. Os animais foram previamente pesados e anestesiados intraperitonealmente com tiopental (Laboratórios Abbott, Chicago, IL, EUA) na dosagem de 40 mg/kg de peso corporal, sendo posteriormente aplicada uma dose letal de tiopental. O sangue foi coletado por punção cardíaca e o plasma obtido por centrifugação foi usado para avaliação da glicemia sanguínea através de kit comercial para dosagem de glicose (Gold Analisa, Belo Horizonte, MG, Brasil) com uso de espectrofotômetro (Bioplus2000, São Paulo, SP, Brasil).

### *Imunofluorescência do plexo mioentérico*

O intestino grosso de cada rato foi coletado e a porção distal à ocorrência das pregas mucosas foi considerada como colo distal. Os segmentos foram lavados com tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,4 (PBS), e fixados por 3 horas em solução de paraformaldeído 4 % pH 7,4. Ao final deste período, as amostras foram abertas ao longo da borda mesocólica e lavadas em PBS para a remoção do excesso de fixador. O material foi então armazenado em solução de PBS e azida sódica 0,08 % até a dissecação. Para a obtenção dos preparados totais de túnica muscular intestinal, o intestino foi cortado em segmentos de aproximadamente 1 cm de comprimento e dissecado com o auxílio de pinças sob estereomicroscópio, removendo-se a túnica mucosa e tela submucosa

Preparados totais foram incubados com anticorpos primários contra as proteínas HuC/D (população neuronal geral, HuC/D-IR) (Invitrogen) e óxido nítrico sintase neuronal (subpopulação nitrérgica, nNOS-IR) (Zymed), em dupla marcação. Foi utilizado um

preparado total de cada rato, e a omissão do anticorpo primário não mostrou nenhuma marcação após testes de controle negativo.

Para a imunofluorescência, os preparados totais foram lavados (2 x 10 min) em PBS e posteriormente colocados em uma solução de bloqueio contendo PBS, 0,5 % de Triton (PBS-T), 2 % de albumina de soro bovino (BSA) e 10 % de soro de cabra. Depois de 1 h, os preparados foram incubados com o anticorpo primário por 48 h em temperatura ambiente sob agitação, em um meio de incubação contendo PBS-T, 2 % de BSA e 2 % de soro de burro. Após lavagem em PBS-T (5 x 10 min), os preparados foram incubados com os anticorpos secundários anti-camundongo Alexa Fluor 488 (Marca, código, 1:500) e anti-coelho Alexa Fluor 546 (Invitrogen, código, 1:500), utilizando o mesmo meio de incubação acima descrito por 2 h em temperatura ambiente, sob agitação e ao abrigo da luz. Por fim, os preparados totais foram lavados em PBS e montados em lâminas histológicas com meio de montagem Prolong® Gold Antifade Reagent (Molecular Probes, Life Technologies, Eugene, OR, USA).

#### *Análise quantitativa do plexo mioentérico*

As análises quantitativas foram realizadas em imagens capturadas com um microscópio de fluorescência FSX100 (Olympus Corporation), transferidas para o computador através do programa associado ao microscópio e posteriormente analisadas com o auxílio do programa Image-Pro Plus, (Media Cybernetics, Inc). As imagens foram capturadas em aumento total de 170x por amostragem aleatória em todo o preparado de membrana na lâmina histológica, sem a escolha de campos visuais específicos e sem o mesmo campo ser capturado mais de uma vez. Todos os neurônios presentes em 30 imagens capturadas por animal foram contados para cada técnica. A área de cada imagem foi de aproximadamente 0,19 mm<sup>2</sup> e a área total quantificada foi de 5,99 mm<sup>2</sup>, sendo os resultados expressos como neurônios por cm<sup>2</sup>.

### *Análises morfométricas no plexo mioentérico*

Para a morfometria das populações neuronais no plexo mioentérico, as imagens capturadas em aumento total de 170x foram analisadas com o auxílio do programa Image Pro-Plus. Foram analisadas a população geral HuC/D imunoreativa, a subpopulação nNOS<sup>+</sup> (neurônios reativos para nNOS), e a subpopulação nNOS<sup>-</sup> (neurônios não reativos para nNOS, mas reativos para HuC/D). As áreas de 100 corpos celulares neuronais por animal foram mensuradas para cada subpopulação, para um total de 500 por grupo. As medidas foram realizadas em neurônios onde era possível ver claramente os limites do corpo celular e os resultados morfométricos foram expressos em  $\mu\text{m}^2$ .

### *Análise estatística*

Os dados obtidos foram submetidos às análises estatísticas através dos programas Statistica (StatSoft, Inc) e GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc), sendo expressos como média  $\pm$  erro padrão. Para a comparação entre os grupos foram realizadas análises de variância one-way (ANOVA), seguida de pós-teste de Tukey, onde o valor de  $p$  menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

## **Resultados**

Os parâmetros fisiológicos observados (Tabela 1) mostram que a dose de STZ utilizada nos animais dos grupos diabéticos foram suficientes para a indução dos sintomas característicos da doença. Os ratos do grupo D tiveram aumento nos níveis de glicemia sanguínea de jejum (241 %), perda de massa corporal (41 %) e aumento no consumo de água e ração ( $p < 0,05$ ), quando comparados ao grupo controle. O tratamento dos ratos diabéticos

com resveratrol (grupo DR) amenizou a perda de massa corporal e consumo de água, comparados ao grupo D ( $p < 0,05$ ), mas sem alteração na glicemia de jejum. A análise do tempo de trânsito gastrointestinal mostrou aumento na velocidade no grupo D em relação ao C ( $p < 0,05$ ). O tratamento com RSV restaurou parcialmente a velocidade do trânsito, uma vez que o tempo médio nos animais do grupo DR e C não apresentaram diferenças significativas (Tabela 1).

### *Análises neuronais*

As análises de densidade neuronal (Figura 1) mostraram que o diabetes causou perda neuronal de 39 % na população geral mioentérica do colo distal no grupo D, comparado ao grupo C ( $p < 0,05$ ). Resultados similares foram observados nos neurônios nitrérgicos, para os quais se observou perda de 35 % no grupo D ( $p < 0,05$ ). O tratamento com resveratrol não alterou a densidade neuronal entre os grupos DR e D, tanto para a população geral quanto para a subpopulação nitrérgica. Entretanto, os grupos DR e C também não apresentaram diferença significativa para as duas populações estudadas (Figura 1). Não houve alteração significativa na proporção de neurônios nitrérgicos entre os grupos, com uma média de 27 % da população total mioentérica marcada como neurônios nitrérgicos (Tabela 1).

A morfometria neuronal mostrou que o diabetes alterou a área do corpo celular neuronal somente nos neurônios motores considerados excitatórios (nNOS<sup>-</sup>), com redução na área quando comparados os grupos D e C ( $p < 0,05$ ) (Figura 2). A população geral e a subpopulação nitrérgica (nNOS<sup>+</sup>) não tiveram alterações entre os grupos D e C. Após o tratamento com resveratrol, a área do corpo celular das três subpopulações (HuC/D<sup>+</sup>, nNOS<sup>+</sup> e nNOS<sup>-</sup>) foi reduzida nos grupos CR e DR, quando comparados aos seus respectivos controles ( $p < 0,05$ ).

## Discussão

Investigamos neste trabalho os efeitos da suplementação diária com resveratrol no plexo mioentérico do colo distal de ratos com diabetes induzida por estreptozotocina. Nossos resultados mostram que o resveratrol foi capaz de prevenir parcialmente a neurodegeneração causada pelo diabetes, além de promover a melhora de alguns parâmetros fisiológicos alterados nos animais diabéticos.

O comprometimento da secreção de insulina pelas células beta pancreáticas é consequência do efeito tóxico da STZ, reproduzindo nos animais desse modelo experimental um quadro de alterações metabólicas semelhantes aos que ocorrem na doença naturalmente desenvolvida [30]. Observamos que os animais diabéticos apresentaram elevação na glicemia de jejum, perda de massa corporal, aumento no consumo de água e ração, e aumento na velocidade do trânsito gastrointestinal (Tabela 1). O tratamento dos ratos diabéticos com resveratrol amenizou a perda de massa corporal e consumo de água, resultados semelhantes aos encontrados na literatura [31]. Apesar da melhora desses sintomas no grupo DR, a glicemia de jejum não diminuiu em relação ao grupo D. Esse resultado também já foi descrito na literatura, onde ratos com diabetes tratados com 10 e 20 mg/kg de resveratrol não apresentaram melhora na glicemia após 30 dias [19, 32] ou após 60 dias de tratamento com início na sexta semana após a indução do diabetes [19]. Deve-se mencionar que também existem trabalhos descrevendo a ação anti hiperglicêmica do resveratrol em modelos animais de diabetes induzida por STZ. Entretanto, esses trabalhos iniciaram o tratamento antes da indução do diabetes [31, 33], e é provável que a variação nos resultados encontrados podem ser devido à diferentes doses de resveratrol e tempos de tratamento.

Os ratos diabéticos deste estudo apresentaram uma significativa perda neuronal no plexo mioentérico do colo distal, tanto na população total quanto nos neurônios nitrérgicos.

Outros estudos recentes também demonstraram a redução no número de neurônios entéricos no intestino grosso, tanto em modelos animais de diabetes induzida por STZ [10, 11] quanto em humanos [34]. Ainda não está claro como ocorre a degeneração dos neurônios entéricos, mas sabe-se que estes neurônios são capazes de responder diretamente a carboidratos, aminoácidos e ácidos graxos. Modelos de diabetes induzido por STZ e cultura de células mostram que os neurônios são sensíveis à glicose e é possível que a hiperglicemia ative vias de apoptose através do aumento de cálcio intracelular pela ativação de canais sensíveis ao ATP [4]. Outro potencial mecanismo que atua na perda neuronal é o aumento no estresse oxidativo e a redução nos níveis de antioxidantes endógenos [24], causados pelo acúmulo de produtos finais de glicação avançada no diabetes [35].

O tratamento com resveratrol no grupo DR não preveniu totalmente a perda neuronal causada pelo diabetes, mas foi capaz de amenizar os danos causados aos neurônios das duas populações estudadas, uma vez que o grupo DR e C não apresentaram diferença estatística significativa (Figura 1). No Sistema Nervoso Central, sabe-se que o resveratrol tem efeitos positivos no tratamento de várias doenças neurodegenerativas, como na isquemia cerebral, doenças de Parkinson e Alzheimer [26]. Os mecanismos exatos pelos quais ele desempenha seu papel neuroprotetor ainda não são totalmente conhecidos, mas parecem estar relacionados ao aumento das defesas antioxidantes [20] e ativação de genes envolvidos na neuroproteção [36]. Embora as subpopulações neuronais entéricas possam responder aos danos causados pelo diabetes com alterações em seu código químico, [37], modificando a produção de neurotransmissores específicos, não observamos alteração na proporção de neurônios nitrérgicos entre os grupos no colo distal. A perda neuronal encontrada tanto na população geral quanto nitrérgica nos animais diabéticos pode estar diretamente relacionada ao desequilíbrio entre o funcionamento de neurônios inibitórios e excitatórios, causando

alterações no padrão de motilidade intestinal [34]. O trânsito intestinal acelerado que observamos também é comumente observado em modelos de diabetes experimental [11, 38].

A morfometria do corpo celular neuronal mostrou que o diabetes alterou o perfil celular somente nos neurônios excitatórios, nNOS<sup>-</sup>, reduzindo sua área quando comparados os grupos D e C (Figura 2). A hipertrofia dos corpos celulares neuronais é comumente encontrada no intestino delgado em modelos experimentais com animais diabéticos, geralmente acompanhada de perda celular [39, 40]. Entretanto, a redução na área dos neurônios no intestino grosso também já foi descrita nesse modelo experimental [12]. Curiosamente, o tratamento com resveratrol reduziu a área das três subpopulações (HuC/D<sup>+</sup>, nNOS<sup>+</sup> e nNOS<sup>-</sup>) tanto no grupo CR quanto DR, comparados aos seus respectivos controles.

## **Conclusão**

O tratamento com resveratrol em ratos com diabetes induzido por estreptozotocina foi capaz de amenizar os danos causados aos neurônios do colo distal, embora não tenha prevenido totalmente a perda neuronal no plexo mioentérico. Além disso, o tratamento melhorou alguns parâmetros fisiológicos característicos da doença.

## **Agradecimentos**

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular da Universidade Estadual de Maringá e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

## Referências

- [1] A.D. Association, Diagnosis and classification of diabetes mellitus, *Diabetes Care*, 34 Suppl 1 (2011) S62-69.
- [2] I.N. Scobie, Atlas of Diabetes mellitus, 3rd edition ed., Agra Europe: Informa, London, 2007.
- [3] P. Bytzer, N.J. Talley, M. Leemon, L.J. Young, M.P. Jones, M. Horowitz, Prevalence of gastrointestinal symptoms associated with diabetes mellitus: a population-based survey of 15,000 adults, *Arch Intern Med*, 161 (2001) 1989-1996.
- [4] S.S. Yarandi, S. Srinivasan, Diabetic gastrointestinal motility disorders and the role of enteric nervous system: current status and future directions, *Neurogastroenterol Motil*, 26 (2014) 611-624.
- [5] C.E. Fregonesi, M.H. Miranda-Neto, S.L. Molinari, J.N. Zanoni, Quantitative study of the myenteric plexus of the stomach of rats with streptozotocin-induced diabetes, *Arq Neuropsiquiatr*, 59 (2001) 50-53.
- [6] N.C. Büttow, M.H. Miranda Neto, R.B. Bazotte, Morphological and quantitative study of the myenteric plexus of the duodenum of streptozotocin-induced diabetic rats, *Arq Gastroenterol*, 34 (1997) 34-42.
- [7] L. Hernandez, R.B. Bazotte, P. Gama, M.H. Miranda-Neto, Streptozotocin-induced diabetes duration is important to determine changes in the number and basophily of myenteric neurons, *Arq Neuropsiquiatr*, 58 (2000) 1035-1039.
- [8] J.N. Zanoni, N.C. Buttow, R.B. Bazotte, M.H. Miranda Neto, Evaluation of the population of NADPH-diaphorase-stained and myosin-V myenteric neurons in the ileum of chronically streptozotocin-diabetic rats treated with ascorbic acid, *Auton Neurosci*, 104 (2003) 32-38.

- [9] P.E. Ferreira, C.R. Lopes, A.M. Alves, É. Alves, D.R. Linden, J.N. Zanoni, N.C. Buttow, Diabetic neuropathy: an evaluation of the use of quercetin in the cecum of rats, *World J Gastroenterol*, 19 (2013) 6416-6426.
- [10] F. Du, L. Wang, W. Qian, S. Liu, Loss of enteric neurons accompanied by decreased expression of GDNF and PI3K/Akt pathway in diabetic rats, *Neurogastroenterol Motil*, 21 (2009) 1229-e1114.
- [11] F. Izbéki, T. Wittman, A. Rosztóczy, N. Linke, N. Bódi, E. Fekete, M. Bagyánszki, Immediate insulin treatment prevents gut motility alterations and loss of nitrenergic neurons in the ileum and colon of rats with streptozotocin-induced diabetes, *Diabetes Res Clin Pract*, 80 (2008) 192-198.
- [12] M.M. Furlan, S.L. Molinari, M.H. Miranda Neto, Morphoquantitative effects of acute diabetes on the myenteric neurons of the proximal colon of adult rats, *Arq Neuropsiquiatr*, 60 (2002) 576-581.
- [13] I.G. Obrosova, C. Van Huysen, L. Fathallah, X.C. Cao, D.A. Greene, M.J. Stevens, An aldose reductase inhibitor reverses early diabetes-induced changes in peripheral nerve function, metabolism, and antioxidative defense, *FASEB J*, 16 (2002) 123-125.
- [14] A.M. Vincent, J.W. Russell, P. Low, E.L. Feldman, Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy, *Endocr Rev*, 25 (2004) 612-628.
- [15] N.E. Cameron, M.A. Cotter, Effects of antioxidants on nerve and vascular dysfunction in experimental diabetes, *Diabetes Res Clin Pract*, 45 (1999) 137-146.
- [16] H.R. Shotton, A. Adams, J. Lincoln, Effect of aminoguanidine treatment on diabetes-induced changes in the myenteric plexus of rat ileum, *Auton Neurosci*, 132 (2007) 16-26.
- [17] T. Kristián, B.K. Siesjö, Calcium in ischemic cell death, *Stroke*, 29 (1998) 705-718.

- [18] A. Shirpoor, B. Ilkhanizadeh, R. Saadatian, B.S. Darvari, F. Behtaj, M. Karimipour, F. Ghaderi-Pakdel, E. Saboori, Effect of vitamin E on diabetes-induced changes in small intestine and plasma antioxidant capacity in rat, *J Physiol Biochem*, 62 (2006) 171-177.
- [19] A. Kumar, R.K. Kaundal, S. Iyer, S.S. Sharma, Effects of resveratrol on nerve functions, oxidative stress and DNA fragmentation in experimental diabetic neuropathy, *Life Sci*, 80 (2007) 1236-1244.
- [20] O. Ates, S.R. Cayli, N. Yucel, E. Altinoz, A. Kocak, M.A. Durak, Y. Turkoz, S. Yologlu, Central nervous system protection by resveratrol in streptozotocin-induced diabetic rats, *J Clin Neurosci*, 14 (2007) 256-260.
- [21] N. Gagliano, G. Aldini, G. Colombo, R. Rossi, R. Colombo, M. Gioia, A. Milzani, I. Dalle-Donne, The potential of resveratrol against human gliomas, *Anticancer Drugs*, 21 (2010) 140-150.
- [22] S.S. Leonard, C. Xia, B.H. Jiang, B. Stinefelt, H. Klandorf, G.K. Harris, X. Shi, Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses, *Biochem Biophys Res Commun*, 309 (2003) 1017-1026.
- [23] K.V. Kiselev, Perspectives for production and application of resveratrol, *Appl Microbiol Biotechnol*, 90 (2011) 417-425.
- [24] G.O. Kavas, P. Aribal-Kocatürk, D.I. Büyükkıcağnıcı, Resveratrol: is there any effect on healthy subject?, *Biol Trace Elem Res*, 118 (2007) 250-254.
- [25] M. Ndiaye, C. Philippe, H. Mukhtar, N. Ahmad, The grape antioxidant resveratrol for skin disorders: promise, prospects, and challenges, *Arch Biochem Biophys*, 508 (2011) 164-170.
- [26] A.Y. Sun, Q. Wang, A. Simonyi, G.Y. Sun, Resveratrol as a therapeutic agent for neurodegenerative diseases, *Mol Neurobiol*, 41 (2010) 375-383.

- [27] A. Kumar, S.S. Sharma, NF-kappaB inhibitory action of resveratrol: a probable mechanism of neuroprotection in experimental diabetic neuropathy, *Biochem Biophys Res Commun*, 394 (2010) 360-365.
- [28] D. Albani, L. Polito, A. Signorini, G. Forloni, Neuroprotective properties of resveratrol in different neurodegenerative disorders, *Biofactors*, 36 (2010) 370-376.
- [29] F. Calcina, E. Barocelli, S. Bertoni, O. Furukawa, J. Kaunitz, M. Impicciatore, C. Sternini, Effect of N-methyl-d-aspartate receptor blockade on neuronal plasticity and gastrointestinal transit delay induced by ischemia/reperfusion in rats, *Neuroscience*, 134 (2005) 39-49.
- [30] K.K. Wu, Y. Huan, Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats, *Curr Protoc Pharmacol*, Chapter 5 (2008) Unit 5.47.
- [31] H.C. Su, L.M. Hung, J.K. Chen, Resveratrol, a red wine antioxidant, possesses an insulin-like effect in streptozotocin-induced diabetic rats, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 290 (2006) E1339-1346.
- [32] R. Schmatz, M.R. Schetinger, R.M. Spanevello, C.M. Mazzanti, N. Stefanello, P.A. Maldonado, J. Gutierrez, M.e.C. Corrêa, E. Giroto, M.B. Moretto, V.M. Morsch, Effects of resveratrol on nucleotide degrading enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats, *Life Sci*, 84 (2009) 345-350.
- [33] P. Palsamy, S. Subramanian, Ameliorative potential of resveratrol on proinflammatory cytokines, hyperglycemia mediated oxidative stress, and pancreatic beta-cell dysfunction in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats, *J Cell Physiol*, 224 (2010) 423-432.
- [34] B. Chandrasekharan, M. Anitha, R. Blatt, N. Shahnava, D. Kooby, C. Staley, S. Mwangi, D.P. Jones, S.V. Sitaraman, S. Srinivasan, Colonic motor dysfunction in human diabetes is associated with enteric neuronal loss and increased oxidative stress, *Neurogastroenterol Motil*, 23 (2011) 131-138, e126.

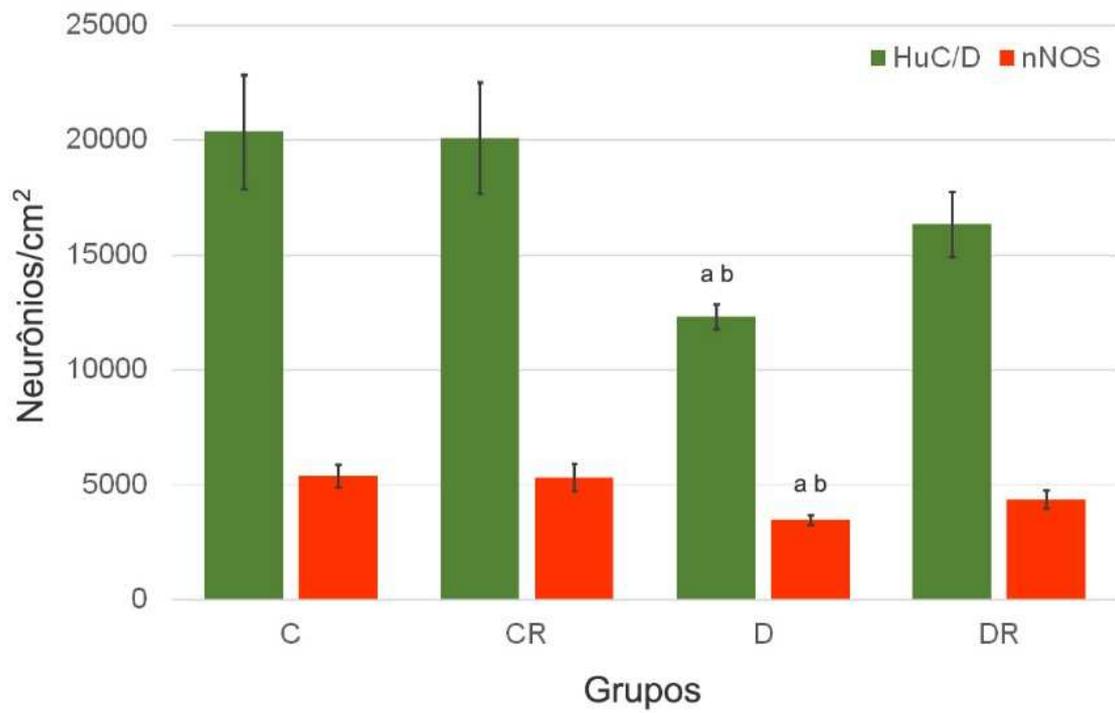
- [35] S. Cellek, N.A. Foxwell, S. Moncada, Two phases of nitrenergic neuropathy in streptozotocin-induced diabetic rats, *Diabetes*, 52 (2003) 2353-2362.
- [36] E. Tellone, A. Galtieri, A. Russo, B. Giardina, S. Ficarra, Resveratrol: A Focus on Several Neurodegenerative Diseases, *Oxid Med Cell Longev*, 2015 (2015) 392169.
- [37] B. Chandrasekharan, S. Srinivasan, Diabetes and the enteric nervous system, *Neurogastroenterol Motil*, 19 (2007) 951-960.
- [38] K. Yamada, M. Hosokawa, S. Fujimoto, K. Nagashima, K. Fukuda, H. Fujiwara, E. Ogawa, Y. Fujita, N. Ueda, F. Matsuyama, Y. Yamada, Y. Seino, N. Inagaki, The spontaneously diabetic Torii rat with gastroenteropathy, *Diabetes Res Clin Pract*, 75 (2007) 127-134.
- [39] C. Hermes-Uliana, C.P. Panizzon, A.R. Trevizan, C.C. Sehaber, F.V. Ramalho, H.A. Martins, J.N. Zanoni, Is L-glutathione more effective than L-glutamine in preventing enteric diabetic neuropathy?, *Dig Dis Sci*, 59 (2014) 937-948.
- [40] C.R. Lopes, P.E. Ferreira, J.N. Zanoni, A.M. Alves, E.P. Alves, N.C. Buttow, Neuroprotective effect of quercetin on the duodenum enteric nervous system of streptozotocin-induced diabetic rats, *Dig Dis Sci*, 57 (2012) 3106-3115.

**Tabela 1.** Parâmetros fisiológicos e neuronais analisados. Glicemia final (mg/dl); peso final (g); consumo de água (ml/dia); consumo de ração (g/dia); tempo de trânsito gastrointestinal (min.); proporção de neurônios nitrérgicos (%). Grupos: controle (C), controle tratado com resveratrol (CR), diabético (D) e diabético tratado com resveratrol (DR)

| <b>Parâmetros</b>         | <b>C</b> | <b>CR</b>  | <b>D</b>                 | <b>DR</b>                |
|---------------------------|----------|------------|--------------------------|--------------------------|
| Glicemia final            | 146 ± 5  | 160 ± 6    | 498 ± 22 <sup>a</sup>    | 412 ± 36 <sup>a</sup>    |
| Peso final                | 510 ± 19 | 486 ± 12   | 298 ± 13 <sup>ab</sup>   | 409 ± 15 <sup>ac</sup>   |
| Consumo de água           | 30 ± 2,9 | 45 ± 0,2   | 164 ± 10,6 <sup>ab</sup> | 113 ± 11,4 <sup>ac</sup> |
| Consumo de ração          | 26 ± 0,8 | 27 ± 0,2   | 41 ± 17 <sup>ab</sup>    | 36 ± 2,5 <sup>a</sup>    |
| Trânsito gastrointestinal | 565 ± 20 | 477 ± 33,2 | 449 ± 9,3 <sup>a</sup>   | 499 ± 36                 |
| Proporção de nitrérgica   | 27 ± 1.6 | 27 ± 0.9   | 28 ± 1.1                 | 27 ± 2.0                 |

<sup>a</sup> $p < 0,05$  versus C; <sup>b</sup> $p < 0,05$  versus CR; <sup>c</sup> $p < 0,05$  versus D. Resultados expressos como média ± erro padrão; n = 6 por grupo.

**Figura 1.** Densidade neuronal geral (HuC/D) e nitrérgica (nNOS) no plexo mioentérico do colo distal (neurônios/cm<sup>2</sup>). Grupos controle (C), controle tratado com resveratrol (CR), diabético (D) e diabético tratado com resveratrol (DR). <sup>a</sup>*p* < 0,05 versus C; <sup>b</sup>*p* < 0,05 versus CR. Resultados expressos como média ± erro padrão; n = 6 por grupo.



**Figura 2.** Área do perfil do corpo celular de neurônios HuC/D<sup>+</sup>, nNOS<sup>+</sup> e nNOS<sup>-</sup> ( $\mu\text{m}^2$ ) no plexo mioentérico do colo distal. Grupos controle (C), controle tratado com resveratrol (CR), diabético (D) e diabético tratado com resveratrol (DR). <sup>a</sup> $p < 0,05$  versus C; <sup>b</sup> $p < 0,05$  versus CR; <sup>c</sup> $p < 0,05$  versus D. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão; n = 6 por grupo.

