

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

FRANCIELLE VEIGA RAMALHO

**A UTILIZAÇÃO DE FARINHA DE CHIA REDUZ A ADIPOSIDADE  
VISCERAL E INTERFERE EM PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS DO  
INTESTINO DELGADO DE RATOS OBESOS**

Maringá

2018

FRANCIELLE VEIGA RAMALHO

**A UTILIZAÇÃO DE FARINHA DE CHIA REDUZ A ADIPOSIDADE  
VISCERAL E INTERFERE EM PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS DO  
INTESTINO DELGADO DE RATOS OBESOS**

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

Orientador: Maria Raquel Marçal Natali  
Co-orientadora: Juliana Vanessa Colombo  
Martins Perles

Maringá

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

R165u Ramalho, Francielle Veiga  
A utilização de farinha de chia reduz a adiposidade visceral e interfere em parâmetros morfológicos do intestino delgado de ratos obesos / Francielle Veiga Ramalho. -- Maringá, 2018.  
61 f. : il., color., figs., tabs.

Orientador(a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Raquel Marçal Natali  
Co-orientador(a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana Vanessa Colombo Martins Perles.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação Ciências Biológicas - Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular, 2018.

1. Obesidade. 2. Farinha de chia. 3. Caliciformes. 4. Mastócitos. 5. Serotonina. I. Natali, Maria Raquel Marçal, orient. II. Perles, Juliana Vanessa Colombo Martins, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação Ciências Biológicas - Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular. IV. Título.

CDD 21.ed. 571.57

AHS-CRB-9/1065

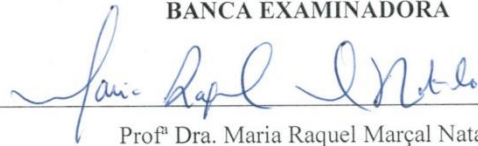
FRANCIELLE VEIGA RAMALHO

**A UTILIZAÇÃO DE FARINHA DE CHIA REDUZ A ADIPOSIDADE  
VISCERAL E INTERFERE EM PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS DO  
INTESTINO DELGADO DE RATOS OBESOS**

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

Aprovado em: 26/10/2018

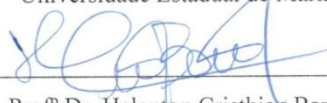
**BANCA EXAMINADORA**



Profª Dra. Maria Raquel Marçal Natali  
Universidade Estadual de Maringá



Profª Dra. Márcia do Nascimento Brito  
Universidade Estadual de Maringá



Profº Dr. Helenton Cristhian Barrena  
UNINGÁ - Centro Universitário Ingá

Dedico este trabalho a vocês que estiveram comigo, do início ao fim.

Meu pai Givaldo, minha mãe Iracema e meu irmão Fernando!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado a vida, por me dar força, sabedoria e não me desamparar no momento que mais precisei de Ti.

Agradeço a minha família. Ao meu pai, que com toda sua calma, me abraçou e não me deixou desistir. As orações que só minha mãe sabe fazer, nos momentos que mais precisei. A minha madrasta, que me acolheu em seus braços, sendo minha segunda mãe. Ao meu irmão, cunhada e sobrinha, Maicon e Fernanda, Odair e Dora, que torcem pelo meu sucesso. Sem vocês nada disso seria possível.

Agradeço aos meus amigos, Juliana, Camila, Mariana T., Mariana M., Bruna, Janaina, Marcelo, Stefanie, Mayra, Vinicius, Rodrigo, Marcele, Jéssica, Thaís, Carol, pelo incentivo e por entender minha ausência quando dizia “Não posso, estou estudando”. A minha vitória também é de vocês.

A minha orientadora prof<sup>a</sup> Dra Maria Raquel Marçal Natali, que me aceitou e confiou cegamente no meu trabalho. Sempre disposta e mesmo em meio a tantos compromissos, não negou esforços para me ajudar. Obrigada pela oportunidade. Minha gratidão e todo meu respeito a você professora.

A minha co-orientadora prof<sup>a</sup> Dra. Juliana Vanessa Colombo Martins Perles, que esteve presente em todos os momentos, sendo amiga, conselheira e professora me auxiliando com toda calma e dedicação possível. Minha eterna gratidão Ju.

A minha terceira “orientadora” prof<sup>a</sup> Dra. Jacqueline Nelisis Zanoni, que por mais que não esteve no papel de fato, faz parte da minha formação profissional, sempre muito atenciosa e receptiva quando procurei por sua ajuda. Muito obrigada pelo incentivo e compreensão.

Aos meus amigos do Laboratório de Plasticidade Neural Entérica e do Laboratório de Histologia, pela troca de conhecimento e ensinamentos. Vocês sem dúvida fizeram meus dias mais leves e meu trabalho mais prazeroso.

Obrigada aos professores, secretárias, zeladoras, técnicos de laboratório, que acompanharam meu trabalho e tiveram cada um sua contribuição para a concretização deste trabalho.

Agradeço também ao CNPq e CAPES pelo apoio financeiro, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas pela oportunidade e a Universidade Estadual de Maringá por tornar possível a conclusão deste trabalho.

Obrigada a todos que fizeram deste momento real e concreto.

## APRESENTAÇÃO

Esta dissertação é composta de um artigo científico. Avalia o efeito da utilização da farinha de chia (*Salvia hispanica* L.) nas células produtoras de serotonina e mucinas da mucosa jejunal de ratos obesos. Em consonância com as regras do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, o artigo foi redigido de acordo com a revista Plos One ISSN: 1932-6203 e Fator de Impacto 3,54.

**Francielle Veiga Ramalho, Juliana Vanessa Colombo Martins Perles e Maria Raquel Marçal Natali.** “A utilização de farinha de chia reduz a adiposidade visceral e interfere em parâmetros morfométricos do intestino delgado de ratos obesos”.

## RESUMO GERAL

**INTRODUÇÃO E OBJETIVOS:** A obesidade é um problema de saúde mundial. Ocorre quando o valor calórico ingerido é superior ao gasto energético diário, promovendo o armazenamento de energia. Por afetar o equilíbrio energético, a obesidade atua na absorção calórica da dieta e o comportamento da mucosa intestinal é um importante elemento associado a doença. Medidas para prevenção da obesidade incluem atividade física e ingestão de alimentos funcionais. A chia (*Salvia hispanica* L.) é um alimento funcional que apresenta qualidade nutricional relevante, com elevado teor de minerais, proteínas, fibras e lipídios, destacando-se o alto teor de ácidos graxos poli-insaturados, ômega-3 e ômega-6. As fibras encontradas na chia são predominantemente insolúveis, as quais aumentam a velocidade do trânsito intestinal, diminuem a exposição dos alimentos a mucosa, e como consequência, reduz a absorção de gorduras alimentares atuando no controle do peso corporal. Por conter diversos compostos bioativos, promover homeostase lipídica e acelerar a motilidade, aumentando o trânsito intestinal, as sementes de chia são atualmente consideradas promissoras no tratamento para redução da obesidade. O intestino delgado adapta-se estruturalmente às condições no lúmen, especialmente a túnica mucosa. Esta é revestida por camada única e distinta de células epiteliais, entre estas os enterócitos envolvidos na fragmentação e absorção dos nutrientes, as células caliciformes que produzem e secretam mucinas ácidas e neutras, células produtoras de serotonina (5-hidroxitriptamina - 5-HT), as células enteroendócrinas (EC) entre outras, além de células presentes na lâmina própria, destacando-se os mastócitos. Todas estas células e suas secreções formam a primeira linha de defesa da mucosa, a barreira intestinal. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da farinha de chia (*Salvia hispanica* L.) sobre as células produtoras de mucinas e serotonina da mucosa intestinal do jejuno de ratos obesos.

**MATERIAIS E MÉTODOS:** Foram utilizados 20 ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus*). Aos 21 dias de idade, iniciou-se a indução da obesidade, dez animais receberam dieta rica em carboidratos simples (RCS) composta por ração triturada, leite condensado Moça®, açúcar cristal e água e os outros dez animais receberam ração padrão para roedores. Aos 90 dias de idade, os animais foram subdivididos em: grupo controle (C), grupo controle tratado com farinha de chia (C15), grupo obeso (Ob) e grupo obeso tratado com farinha de chia (Ob15). A farinha de chia foi administrada diariamente por 60 dias, na concentração de 0,15g/kg. Foram avaliados o peso corporal aos 21, 90 e 150 dias de idade. Aos 150 dias de idade, após 12 horas de jejum, os animais foram anestesiados com dose letal de pentobarbital sódico (120mg/kg de peso corporal, com lidocaína) por via intraperitoneal. Foi coletado sangue por um cateter implantado na veia jugular direita para as análises bioquímicas sanguíneas. Foram removidos e pesados os tecidos adiposos viscerais: periepídídimo, retroperitônio e mesentérico, e tecido adiposo subcutâneo: inguinal, para a determinação da adiposidade. O intestino delgado foi removido para mensuração de comprimento total, e o jejuno utilizado para análises: histológicas, coloração de H&E para análise morfológica; histoquímicas, com Alcian Blue e PAS para evidência das células produtoras de mucinas ácidas e neutras; histoquímica com Azul de Toluidina para evidência de mastócitos e imunohistoquímicas para evidência de células produtoras de serotonina, células enteroendócrinas (EC) e mastócitos imuno-reativos a serotonina (5-HT-IR). Constatada a normalidade, os dados obtidos a partir de imagens capturadas com câmera de alta resolução Moticam ® 2500 5.0 Mega Pixel (Motic China Group Co, Shanghai, China), foram submetidos à Análise de Variância One-Way (ANOVA) seguida de pós-teste de



51 Tukey, por meio do programa GraphPad Prism 6.01. Valores de  $p < 0,05$  foram  
52 considerados estatisticamente significativos.

53

54 **RESULTADOS E DISCUSSÃO:** A oferta da dieta RCS produziu ratos obesos, com  
55 aumento significativo do peso corporal e peso dos tecidos adiposos viscerais  
56 (periepídídimo, retroperitoneal e mesentérico) e subcutâneo (inguinal). O tratamento  
57 diário com farinha de chia por 60 dias para ratos do grupo obeso (Ob15) reduziu  
58 significativamente o peso corporal e o peso dos tecidos adiposos, quando comparados ao  
59 grupo obeso. Os parâmetros bioquímicos sanguíneos, revelaram que ratos obesos (Ob)  
60 apresentaram elevação ( $p < 0,05$ ) nos níveis de triglicérides, VLDL e redução de HDL,  
61 sem interferir nos níveis glicêmicos, colesterol total e LDL. A ingestão diária de farinha  
62 de chia no grupo Ob teve efeito positivo, ao reduzir níveis de triglicérides e VLDL, além  
63 de reestabelecer os níveis de HDL. Também não promoveu alterações nos níveis das  
64 transaminases, AST e ALT indicando ausência de hepatotoxicidade. Não houve  
65 influência da dieta e/ou tratamento com farinha de chia sobre o comprimento do intestino  
66 delgado e largura do jejuno entre os grupos. A morfologia do jejuno manteve organização  
67 histológica padrão, entretanto foram constatadas alterações morfométricas nesse  
68 segmento. Houve aumento significativo na espessura da parede total, túnica mucosa e  
69 altura de vilosidades, e redução na profundidade das criptas nos ratos obesos. Resultado  
70 considerado como uma resposta adaptativa do órgão aumentando a superfície intestinal  
71 absorviva, comum em casos de sobrecarga alimentar. Nos grupos C15 e Ob15, constata-  
72 se efeito redutor ( $p < 0,05$ ) da farinha de chia nos parâmetros morfométricos, justificado  
73 pelo alto teor de fibras insolúveis presentes na farinha de chia, que auxiliam na  
74 motilidade, acelerando o trânsito intestinal e reduzindo a sobrecarga alimentar. As células  
75 caliciformes produtoras de mucinas neutras não apresentaram diferença significativa  
76 entre os grupos. As células caliciformes produtoras de mucinas ácidas (sulfomucinas-  
77 AB<sup>+</sup>) também não apresentaram diferença significativa. Este resultado pode ser  
78 considerado um mecanismo de proteção para a barreira intestinal, já que as sulfomucinas  
79 são resistentes às glicosidases bacterianas. As células caliciformes produtoras de mucinas  
80 ácidas (sialomucinas/sulfomucinas-AB<sup>+</sup>) apresentaram redução quantitativa no epitélio  
81 jejunal nos grupos obeso e obeso tratado com farinha de chia, devido a interação do  
82 produto com o componente mucoso da barreira em ratos obesos, sugerindo um  
83 mecanismo de compensação fisiológica. Foi detectada redução no número de células  
84 enteroendócrinas produtoras de serotonina (EC) no epitélio jejunal de ratos obesos  
85 quando comparado ao grupo controle. Esta redução pode estar relacionada com sinais de  
86 saciedade, uma vez que a supressão da ingestão alimentar é mediada pela ativação de  
87 receptores de serotonina. O tratamento dos animais obesos com farinha de chia (Ob15),  
88 reverteu esse quadro com aumento significativo dessas células quando comparado com  
89 os animais Ob. A farinha de chia foi efetiva ao atuar no equilíbrio do processo de  
90 saciedade. Houve aumento significativo do número de mastócitos e mastócitos 5-HT-IR  
91 presentes na lâmina própria dos ratos obesos (Ob). Este aumento pode estar relacionado  
92 com o acúmulo de eventos inflamatórios desencadeados pela obesidade. A ingestão da  
93 farinha de chia ofertada aos animais obesos (Ob15) teve efeito positivo com redução no  
94 número médio destas células.

95

96 **CONCLUSÃO:** A ingestão de farinha de chia (0,15g/kg/peso corporal) reduz o peso  
97 corporal e dos tecidos adiposos viscerais, além de reduzir os níveis de triglicérides sendo  
98 uma alternativa válida no controle da obesidade, uma vez que não possui efeito  
99 hepatotóxico. Tem influência sobre a produção de mucinas e serotonina e reestabelece  
100 variáveis morfométricas da mucosa jejunal de ratos obesos.

101 **PALAVRAS CHAVE:** obesidade, farinha de chia, caliciformes, mastócitos, serotonina.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION AND AIMS:** Obesity is a worldwide health problem. It occurs whether the ingested caloric value is higher than the daily energy expenditure, thereby promoting energy storage. Obesity acts on the caloric absorption of the diet by affecting the energy balance and the functioning of the intestinal mucosa is an important element associated with disease. Prevention ways to avoid obesity include physical activity and functional food intake. Chia (*Salvia hispanica* L.) is a functional food that has a relevant nutritional quality, with a high content of minerals, proteins, fibers and lipids, and a high content of polyunsaturated fatty acids, omega-3 and omega-6. The fibers present in Chia are predominantly insoluble, which increase the speed of intestinal transit, decreased the exposure of food to the mucosa, and as a result, reduces the absorption of dietary fats and control the body weight. Since this plant contains several bioactive compounds, Chia promotes lipid homeostasis and accelerates intestinal motility and transit, in addition to chia seeds are currently considered promising in the treatment and to reduction of obesity. The small intestine structurally adapts to the conditions in the lumen, especially the tunica mucosa. It is coated by a unique and distinct layer of epithelial cells, including enterocytes, involved in the fragmentation and absorption of nutrients, goblet cells that produce and secrete acid and neutral mucins, serotonin secretory cells (5-hydroxytryptamine - 5-HT), the enteroendocrine cells (EC), etc, as well as cells present in the lamina propria, mainly mast cells. These cells and their secretions form the first line of defense of the mucosa, termed intestinal barrier. The objective of this work was to evaluate the flour effect of chia (*Salvia hispanica* L.) on the mucin and serotonin secretory cells of the intestinal mucosa of the jejunum of obese rats.

**MATERIALS AND METHODS:** Twenty 21-day-old male adult Wistar rats (*Rattus norvegicus*) were used. At 21 days of age, obesity induction was performed, ten animals received a simple carbohydrate-rich diet (SCRD) composed of crushed feed, Moça® condensed milk, crystal sugar and water. The other ten rats received standard rodent feed. At 90 days of age, all rats were divided into: control group (C), control group treated with chia flour (C15), obese group (Ob) and obese group treated with chia flour (Ob15). Chia flour was administered for 60 days at a concentration of 0.15 g/kg. Body weight at 21, 90 and 150 day of age was evaluated. At 150 day of age, after 12 hours of fasting) the animals were anesthetized with a lethal dose of pentobarbital sodium (120 mg/kg body weight of lidocaine) intraperitoneally. Blood was collected by a catheter implanted in the right jugular vein for blood biochemical analyzes. The visceral adipose tissue: peri-epididimal, retroperitoneal and mesenteric, and subcutaneous adipose tissues: inguinal, were removed and weighed for the determination of adiposity. The small intestine was removed for full length measurement, and the jejunum was used for histological analysis, from H&E staining for morphometric analysis; histochemical studies with Alcian Blue and Periodic Acid Schiff (PAS) for the detection of acid and neutral mucin secretory cells; histochemistry with Toluidine Blue for labeling mast cells and the detection of serotonin-secretory cells, enteroendocrine (EC) and serotonin-immunoreactive (5-HT-IR) mast cells. All data obtained from images captured through high-resolution Moticam® 2500 5.0 Mega Pixel camera (Motic China Group Co., Shanghai, China) were analyzed by one-way Analysis of Variance (ANOVA), followed by post-hoc Tukey through the program GraphPad Prism 6.01. Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant.

**RESULTS AND DISCUSSION:** The diet supplement of the SCR D resulted in obese rats with a significant increase of body weight and visceral adipose tissue weight (peri-

152 epididimal, retroperitoneal and mesenteric) and subcutaneous (inguinal). The treatment  
153 during 60 days of chia flour for obese rats (Ob15) significantly reduced body weight and  
154 adipose tissue weight compared to obese group. The blood biochemical parameters  
155 revealed that obese rats (Ob) demonstrated increase ( $p < 0.05$ ) in triglyceride levels,  
156 VLDL and HDL reduction, without affecting in glycemic, total cholesterol and LDL  
157 levels. The intake of chia flour in the Ob group had a positive effect by reducing levels  
158 of triglycerides and VLDL, in addition to reestablishing HDL levels. Furthermore, chia  
159 flour also did not promote any changes in the levels of transaminases, AST and ALT,  
160 thereby indicating absence of hepatotoxicity. There was no influence of diet and/or  
161 treatment with chia flour on the length of the small intestine and width of the jejunum  
162 between the groups. The morphology of the jejunum maintained a histological pattern,  
163 however, morphometric alterations were observed in this segment. There was a  
164 significant increase in total wall thickness, mucosal tunica and villus height, and reduction  
165 in crypt depth in obese rats. These results may be considered as an adaptive response of  
166 the organ by increasing the absorptive intestinal surface, commonly found in cases of  
167 alimentary overload. In the C15 and Ob15 groups, the chia flour demonstrated reduction  
168 effect ( $p < 0.05$ ) in the morphometric parameters due to high content of insoluble fibers  
169 present in this plant, which act in intestinal motility by accelerating intestinal transit and  
170 reducing the food overload. Neutral mucin-producing goblet cells showed no significant  
171 difference between groups. The acidic mucin-producing goblet cells (sulfomucines-AB<sup>+</sup>)  
172 also showed no significant difference and this result may be considered a protective  
173 mechanism for the intestinal barrier, since sulfomucines are resistant to bacterial  
174 glycosidases. Goblet cells producing acidic mucins (sialomucines/sulfomucines-AB<sup>+</sup>)  
175 showed quantitative reduction in the jejunal epithelium in the obese and obese groups  
176 treated with chia flour due to the interaction of the product with mucosal component of  
177 the barrier in obese rats, suggesting a mechanism of physiological compensation.  
178 Reduction in the number of serotonin-producing enteroendocrine cells in the jejunal  
179 epithelium of obese rats was observed compared to control group. This reduction may be  
180 related to signs of satiety, since suppression of food intake is mediated by the activation  
181 of serotonin receptors. The treatment of obese animals with chia flour (Ob15) reversed  
182 this situation with a significant increase of these cells compared to Ob animals. Chia flour  
183 was effective by acting in the satiety process equilibrium. There was a significant increase  
184 in the number of mast cells and 5-HT-IR mast cells present in the lamina propria of obese  
185 rats (Ob), this increase may be related to the accumulation of inflammatory effects  
186 triggered by obesity and intake of chia flour had a beneficial effect to obese animals  
187 (Ob15) with a reduction in the mean number of these cells.

188  
189 **CONCLUSION:** Intake of chia flour (0.15 g/kg/body weight) reduces body weight and  
190 adipose tissue, as well as reducing triglycerides levels being an alternative for the control  
191 of obesity, since it has no hepatotoxic effect. Chia flour also has influence on the  
192 production of mucins and serotonin and re-establishes morphometric parameters of the  
193 jejunal mucosa of obese rats.

194  
195 **KEY WORDS:** obesity, chia flour, goblet cells, mast cells, serotonin.

## RESUMO

### A utilização de farinha de chia reduz a adiposidade visceral e interfere em parâmetros morfométricos do intestino delgado de ratos obesos

Francielle Veiga Ramalho, Juliana Vanessa Colombo Martins Perles, Maria Raquel Marçal Natali.

O efeito da farinha de chia (*Salvia hispanica* L.) sobre as células produtoras de mucinas e serotonina da mucosa intestinal do jejuno de ratos obesos foram avaliados. Utilizou-se 20 ratos machos Wistar. A obesidade foi induzida aos 21 dias de idade com dieta rica em carboidratos simples. Aos 90 dias de idade, os animais foram subdivididos nos seguintes grupos: controle (C), controle tratado com farinha de chia (C15), obeso (Ob) e obeso tratado com farinha de chia (Ob15). A farinha de chia foi ofertada durante 60 dias (0,15g/kg). Posteriormente, os animais foram anestesiados, coletados o sangue para análises bioquímicas, tecidos adiposos para determinação da adiposidade, e jejuno para as análises: histológicas (HE), histoquímicas (Alcian Blue, PAS, Azul de Toluidina) e imunohistoquímicas (5-HT-IR). A dieta aumentou o peso corporal e peso dos tecidos adiposos e a farinha de chia reduziu o peso corporal e tecidos adiposos no grupo Ob15. Ratos obesos apresentaram níveis de triglicerídeos e VLDL elevados, redução no HDL e manutenção nos níveis glicêmicos, colesterol total e LDL. O grupo Ob15 apresentou redução nos níveis de triglicerídeos e VLDL, e reestabeleceu HDL. Houve aumento na espessura da parede total, túnica mucosa e altura de vilosidades, e redução na profundidade das criptas nos ratos Ob, sendo que nos grupos C15 e Ob15 esses parâmetros foram reduzidos. As células caliciformes produtoras de mucinas ácidas (sialomucinas/sulfomucinas-AB<sup>+</sup>) encontravam-se quantitativamente reduzidas nos grupos Ob e Ob15. Houve redução no número de células enteroendócrinas serotoninérgicas nos ratos Ob e reversão deste quadro no tratado com chia. Houve aumento no número de mastócitos e mastócitos 5-HT-IR no grupo Ob e redução no grupo Ob15. A ingestão de farinha de chia (0,15g/kg/peso corporal) reduz o peso corporal e dos tecidos adiposos viscerais, além de reduzir os níveis de triglicerídeos sendo uma alternativa válida no controle da obesidade, uma vez que não possui efeito hepatotóxico. Tem influência sobre o número de células produtoras de mucinas e serotonina e reestabelece variáveis morfométricas da mucosa jejunal de ratos obesos.

**PALAVRAS CHAVE:** obesidade, farinha de chia, células caliciformes, mastócitos, serotonina.

233 **ABSTRACT**

234  
235 **The use of chia flour reduces visceral adiposity and interferes in morphometric**  
236 **parameters of the small intestine of obese rat**

237  
238 Francielle Veiga Ramalho, Juliana Vanessa Colombo Martins Perles, Maria Raquel  
239 Marçal Natali.

240  
241 The effect of chia flour (*Salvia hispanica* L.) on mucin and serotonin producing cells of  
242 the intestinal mucosa of the jejunum of obese rats. Male Wistar rats were used. Obesity  
243 was induced at 21 days of age with a simple carbohydrate-rich diet. At 90 days, the  
244 animals were subdivided into the following group: control (C), control treated with chia  
245 flour (C15), obese (Ob) and obese treated with chia flour (Ob15). Chia flour was  
246 administered for 60 days (0.15 g/kg). The animals were anesthetized, blood collected for  
247 biochemical analysis, adipose tissue for the determination of adiposity, and jejunum for  
248 the histological (HE), histochemical (Alcian Blue, PAS, Toluidine Blue) and  
249 immunohistochemical analyzes (5-HT-IR). The diet increased body weight and adipose  
250 tissue weight and a chia flour reduced body weight and adipose tissues in the Ob15 group.  
251 Obese rats presented high levels of triglycerides and VLDL, reduction in HDL and  
252 maintenance in glycemic, total cholesterol and LDL levels. The Ob15 group reduced  
253 triglyceride and VLDL levels, and reestablished HDL. There was an increase in total wall  
254 thickness, mucosal tunica and villus height, and reduction in crypt depth in Ob rats,  
255 groups C15 and Ob15 reduced these parameters. As acidic mucin-producing goblet cells  
256 (sialomucins/sulfomucines-AB<sup>+</sup>) were quantitatively reduced in the Ob and Ob15 groups.  
257 There was a reduction in the numbers of enteroendocrine serotonergic cells in Ob group  
258 and the Ob15 group reversed this behavior. There was an increase in the number of mast  
259 cells and 5-HT-IR mast cells in the Ob group and reduction in the Ob15 group. Intake of  
260 chia flour (0.15 g/kg/body weight) reduces body weight and adipose tissue, as well as  
261 reducing triglycerides levels being an alternative for the control of obesity, since it has no  
262 hepatotoxic effect. Chia flour also has influence on the production of mucins and  
263 serotonin and re-establishes morphometric parameters of the jejunal mucosa of obese rats.

264  
265 **KEY WORDS:** obesity, chia flour, goblet cells, mast cells, serotonin.

266 **ABREVIACOES**

267 5-HT: 5-hidroxitriptamina, serotonina

268 ALA: cido alfa linolnico

269 ALT: alanina aminotransferases

270 AST: aspartato aminotransferases

271 EC: célula enteroendcrina

272 HDL: lipoproteína de alta densidade

273 LDL: lipoproteína de baixa densidade

274 VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade

275 RCS: dieta rica em carboidratos simples

## 276 1. INTRODUÇÃO

277 A obesidade é um problema de saúde mundial que atinge cerca de 650 milhões de  
278 pessoas, sendo 13% da população adulta [1]. No Brasil, uma em cada cinco pessoas está  
279 acima do peso. A prevalência da doença passou de 11,8%, em 2006, para 18,9%, em 2016  
280 [2]. Economicamente, são gastos cerca de 3,6 bilhões de reais por ano do setor público  
281 brasileiro com doenças relacionadas à obesidade, tornando de extrema importância a  
282 busca por soluções que minimizem este quadro [3].

283 Fatores genéticos, fisiológicos, ambientais, psicológicos, sociais e econômicos  
284 estão associados à incidência da obesidade [4].

285 O balanço energético desequilibrado é o que leva a obesidade, isso ocorre quando  
286 o valor calórico ingerido é superior ao gasto energético diário, promovendo o  
287 armazenamento de energia [5]. A obesidade também é caracterizada como um estado  
288 inflamatório de baixa intensidade, uma vez que o tecido adiposo branco produz citocinas  
289 ou adipocitocinas que estão envolvidas nesse processo inflamatório [6]. Por afetar o  
290 equilíbrio energético, atuando na absorção calórica da dieta, o comportamento da  
291 microbiota intestinal destaca-se também como elemento importante associado à  
292 obesidade [7].

293 Medidas para prevenção e consequentemente das doenças relacionadas à  
294 obesidade incluem atividade física e ingestão de alimentos funcionais. Segundo Muñoz  
295 et al [8], a chia (*Salvia hispanica* L.), conhecida popularmente como “salvia espanhola”,  
296 “artemisa espanhola”, “chia mexicana” e “chia negra” é um alimento funcional, pertence  
297 à família das lamiáceas, oriunda de áreas montanhosas do oeste e centro do México. Seu  
298 consumo é registrado desde o período pré-colombiano pelos astecas e maias, porém nos  
299 últimos anos, essa semente ganhou elevada notabilidade devido às características



300 nutricionais com resultados positivos relacionados a determinadas doenças, tais como  
301 diabetes, obesidade e inflamações de modo geral [9].

302 A chia apresenta qualidade nutricional relevante, com elevado teor de minerais,  
303 proteínas, fibras e lipídios, destacando-se o alto teor de ácidos graxos poli-insaturados,  
304 ômega-3 e ômega-6 [10]. Entre os ácidos graxos, o ácido alfa linolênico (ALA)  
305 pertencente ao grupo ômega-3, é o mais abundante, seguido do ácido linoleico (LA), do  
306 grupo ômega-6. A absorção de ALA e seus metabólitos pela membrana dos enterócitos  
307 do intestino delgado de ratos tratados com óleo de chia por 21 dias apresentou-se elevada,  
308 indicando modificações na composição dos ácidos graxos do tecido, tornando possível a  
309 utilização de ALA para reposição nutricional de ácidos graxos poli-insaturados [11].

310 As fibras encontradas na chia são predominantemente insolúveis [12], as quais  
311 aumentam a velocidade do trânsito intestinal, diminuem a exposição dos alimentos à  
312 mucosa e, como consequência, reduz a absorção de gorduras alimentares [13] atuando no  
313 controle do peso corporal [14]. Por conter diversos compostos bioativos, as sementes de  
314 chia são atualmente consideradas promissoras no tratamento e redução da obesidade  
315 [15,8,12].

316 Redução do peso corporal, circunferência abdominal e melhora do perfil lipídico  
317 após ingestão diária por 12 semanas de 35g de farinha de chia por indivíduos obesos e  
318 com sobrepeso foram obtidos por Toscano et al [16].

319 A utilização de chia por roedores em modelos experimentais de obesidade são  
320 atualmente discutidos. Ratos induzidos a obesidade por dieta rica em carboidratos e  
321 gordura e tratados com semente de chia durante 8 semanas, apresentaram redução da  
322 adiposidade visceral, conteúdo de lipídios totais e melhora na tolerância à glicose e  
323 insulina [17]. Ratos alimentados com dieta rica em gordura e frutose e posteriormente

324 tratados com chia (semente e óleo), no período de 6 e 12 semanas, promoveram melhora  
325 no estado oxidativo do fígado e plasma [18] e na intolerância à glicose e insulina [19].

326 Em condições nutricionais normais, após suplementação por 14 dias de farinha de  
327 chia em ratos, ocorreu redução significativa no ganho de peso corporal e na  
328 digestibilidade, justificada pela alta concentração de fibras, compostos fenólicos e ácidos  
329 fílicos presentes na farinha de chia, que formam um complexo viscoso com o conteúdo  
330 intestinal, constituindo uma barreira e reduzindo a absorção. Já a suplementação por 28  
331 dias reduziu os níveis de glicose, o perfil lipídico e alteraram a morfometria intestinal,  
332 com aumento na profundidade das criptas e espessura da túnica muscular no intestino  
333 grosso. Os autores concluem que a farinha de chia promove homeostase lipídica e acelera  
334 a motilidade, aumentando o trânsito intestinal [20].

335 O intestino delgado adapta-se estruturalmente às condições no lúmen,  
336 especialmente a túnica mucosa, atrofiando quando há menor aporte de nutrientes e  
337 hipertrofiando quando há sobrecarga alimentar [21]. Esta mucosa é revestida por camada  
338 única e distinta de células epiteliais, os enterócitos envolvidos na fragmentação e absorção  
339 dos nutrientes. Além dos enterócitos, compõem o epitélio intestinal, as células-tronco  
340 para renovação celular, células caliciformes secretoras de muco e células  
341 enteroendócrinas produtoras de vários hormônios, dentre eles a serotonina (5-  
342 hidroxitriptamina - 5-HT), entre outras células [22].

343 Compondo a barreira intestinal e formando assim a primeira linha de defesa da  
344 mucosa intestinal, as células caliciformes, sintetizam e secretam mucinas neutras e ácidas.  
345 Sua secreção pode ser constitutiva, de baixo nível, em condições fisiológicas normais, ou  
346 acelerada, em respostas a estímulos, como hormônios e mediadores inflamatórios [23,24].

347 Ausência de variação no número de células caliciformes produtoras de mucinas  
348 neutras foi constatado por Soares et al [25] no íleo de camundongos obesos; outros autores

349 encontraram redução significativa nas células caliciformes produtoras de mucinas ácidas  
350 e neutras no íleo de ratos obesos [26] e redução de células caliciformes produtoras de  
351 mucinas neutras nas criptas do cólon de ratos alimentados com dieta hipercalórica [27].

352 Além das células caliciformes, a mucosa intestinal apresenta células produtoras  
353 de 5-HT, as células enteroendócrinas (EC), que compõem o epitélio intestinal e os  
354 mastócitos, localizados na lâmina própria. Ambas as células disponibilizam 5-HT  
355 circulante para as plaquetas e ativam enterócitos adjacentes e células imunes da parede  
356 intestinal [28,29]. Estímulos químicos, mecânicos e nutricionais podem induzir a  
357 secreção de 5-HT na parede intestinal [30]. O ciclo da 5-HT começa com a estimulação  
358 alimentar na mucosa do intestino, o que aumenta a atividade enzimática da triptofano  
359 hidroxilase (Tph1), levando à síntese de serotonina. Respostas diferenciadas com relação  
360 à dinâmica dessas células quanto ao aspecto quantitativo são reportadas na literatura, com  
361 manutenção do número no jejuno e aumento no íleo de camundongos alimentados com  
362 dieta hiperlipídica [25], aumento no intestino grosso de ratos submetidos a restrição  
363 alimentar [31] e aumento no número e nos níveis de 5-HT em modelos experimentais de  
364 colite em ratos [32].

365 Os mastócitos desempenham papel importante na regulação da sensibilidade  
366 visceral digestória e na permeabilidade vascular no intestino delgado [33]. De acordo com  
367 Groschwitz et al [34], camundongos deficientes geneticamente em mastócitos apresentam  
368 redução na permeabilidade basal das células epiteliais do jejuno com alterações na  
369 arquitetura e barreira intestinal.

370 O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da farinha de chia (*Salvia hispanica*  
371 L.) sobre o número de células produtoras de mucinas e serotonina da mucosa intestinal  
372 do jejuno de ratos obesos.

373 **2 RESULTADOS**

374 **2.1 Parâmetros Fisiológicos**

375 A oferta de dieta rica em carboidratos simples (RCS) a ratos Wistar do desmame  
376 (21 dias) até 150 dias resultou em animais obesos, com aumento significativo do peso  
377 corporal (Tabela 1) e aumento do peso dos tecidos adiposos viscerais: periepididimal,  
378 retroperitoneal e mesentérico, e tecido adiposo subcutâneo: inguinal (Tabela 2). A análise  
379 da adiposidade indica aumento significativo acima de 75% em todos os subtipos,  
380 alcançando 102% no tecido adiposo mesentérico.

381 **Tabela 1.** Peso corporal (em gramas) de ratos com 21 dias, 90 dias e 150 dias. Grupos:  
382 controle (C); controle tratado com farinha de chia (C15); obesos induzidos por dieta RCS\*  
383 (Ob) e obesos induzidos por dieta RCS e tratados com farinha de chia (Ob15). Resultados  
384 expressos em média ± erro padrão. n=5.

| Grupo       | Peso corporal (g)         |                             |                             |
|-------------|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|             | 21 dias                   | 90 dias                     | 150 dias                    |
| <b>C</b>    | 45,60 ± 0,73 <sup>a</sup> | 415,00 ± 6,90 <sup>a</sup>  | 441,00 ± 10,53 <sup>a</sup> |
| <b>C15</b>  | 44,80 ± 1,32 <sup>a</sup> | 412,60 ± 7,86 <sup>a</sup>  | 439,10 ± 14,31 <sup>a</sup> |
| <b>Ob</b>   | 45,00 ± 0,54 <sup>a</sup> | 479,00 ± 21,62 <sup>a</sup> | 543,20 ± 31,05 <sup>b</sup> |
| <b>Ob15</b> | 45,00 ± 1,33 <sup>a</sup> | 415,90 ± 31,89 <sup>a</sup> | 482,60 ± 15,34 <sup>a</sup> |

385 Médias seguidas de letras distintas na mesma coluna diferem estatisticamente (p<0,05). Análise de variância  
386 One-Way ANOVA, pós-teste de Tukey. \*RCS- Dieta rica em carboidratos simples.

387

388 **Tabela 2:** Média (em gramas) do tecido adiposo visceral: periepididimal (PE),  
389 retroperitoneal (RET), mesentérico (MES) e somatória total (TO) e tecido adiposo  
390 subcutâneo: inguinal (ING), de ratos dos grupos: controle (C); controle tratado com  
391 farinha de chia (C15), obesos induzidos por dieta RCS\* (Ob), e obesos induzidos por  
392 dieta RCS\* e tratados com farinha de chia (Ob15). Resultados expressos em média ± erro  
393 padrão. n=5.

|                | <b>C</b>                 | <b>C15</b>                 | <b>Ob</b>                 | <b>Ob15</b>              |
|----------------|--------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------------|
| <b>PE (g)</b>  | 1,57 ± 0,09 <sup>a</sup> | 1,63 ± 0,09 <sup>a</sup>   | 2,77 ± 0,16 <sup>b</sup>  | 1,85 ± 0,09 <sup>a</sup> |
| <b>RET (g)</b> | 1,62 ± 0,13 <sup>a</sup> | 1,74 ± 0,10 <sup>a,c</sup> | 3,08 ± 0,14 <sup>b</sup>  | 2,21 ± 0,12 <sup>c</sup> |
| <b>MES (g)</b> | 0,74 ± 0,09 <sup>a</sup> | 0,88 ± 0,12 <sup>a</sup>   | 1,52 ± 0,05 <sup>b</sup>  | 1,07 ± 0,12 <sup>a</sup> |
| <b>ING (g)</b> | 2,04 ± 0,22 <sup>a</sup> | 1,93 ± 0,25 <sup>a</sup>   | 3,90 ± 0,03 <sup>b</sup>  | 2,01 ± 0,07 <sup>a</sup> |
| <b>TO (g)</b>  | 5,97 ± 0,38 <sup>a</sup> | 6,17 ± 0,47 <sup>a</sup>   | 11,27 ± 0,29 <sup>b</sup> | 7,13 ± 0,33 <sup>a</sup> |

394 Médias seguidas de letras distintas na mesma linha diferem estatisticamente (p<0,05). Análise de  
395 variância One-Way ANOVA, pós-teste de Tukey. \*RCS- Dieta rica em carboidratos simples

396 O tratamento diário com farinha de chia no grupo obeso (Ob15) reduziu  
 397 significativamente o peso corporal (Tabela 1) e peso dos tecidos adiposos avaliados,  
 398 quando comparados ao grupo obeso (Tabela 2).

399 Os parâmetros bioquímicos sanguíneos estão expressos na tabela 3. Os ratos  
 400 obesos (Ob) apresentaram elevação ( $p < 0,05$ ) nos níveis de triglicerídeos, VLDL e  
 401 redução de HDL, sem interferir nos níveis glicêmicos, colesterol total e LDL, quando  
 402 comparados com grupo controle.

403

404 **Tabela 3.** Glicemia (Gli), triglicerídeos (TGL), colesterol total (Col. Total), lipoproteína de  
 405 alta densidade (HDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de muito baixa  
 406 densidade (VLDL), Aspartato Aminotransferase (AST) e Alanina Aminotransferase (ALT)  
 407 de ratos. Grupos: controle (C); controle tratado com farinha de chia (C15), obesos induzidos  
 408 por dieta RCS\* (Ob) e obesos induzidos por dieta RCS\* e tratados com farinha de chia  
 409 (Ob15). Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão.  $n=5$ .

|  | <b>C</b>                      | <b>C15</b>                      | <b>Ob</b>                      | <b>Ob15</b>                   |
|--|-------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| <b>Gli (mg/dl)</b>                     | 83,70 $\pm$ 1,49 <sup>a</sup> | 81,79 $\pm$ 2,72 <sup>a</sup>   | 80,01 $\pm$ 6,69 <sup>a</sup>  | 83,40 $\pm$ 2,65 <sup>a</sup> |
| <b>TGL (mg.dL<sup>-1</sup>)</b>        | 67,80 $\pm$ 9,18 <sup>a</sup> | 96,80 $\pm$ 6,42 <sup>a</sup>   | 144,20 $\pm$ 9,26 <sup>b</sup> | 99,00 $\pm$ 5,36 <sup>a</sup> |
| <b>Col. Total (mg.dL<sup>-1</sup>)</b> | 85,80 $\pm$ 6,15 <sup>a</sup> | 82,00 $\pm$ 8,72 <sup>a</sup>   | 101,00 $\pm$ 4,76 <sup>a</sup> | 91,80 $\pm$ 5,78 <sup>a</sup> |
| <b>HDL (mg.dL<sup>-1</sup>)</b>        | 44,40 $\pm$ 2,47 <sup>a</sup> | 37,80 $\pm$ 2,80 <sup>a,b</sup> | 30,72 $\pm$ 0,87 <sup>b</sup>  | 43,60 $\pm$ 1,10 <sup>a</sup> |
| <b>LDL (mg.dL<sup>-1</sup>)</b>        | 27,84 $\pm$ 6,41 <sup>a</sup> | 24,14 $\pm$ 9,78 <sup>a</sup>   | 41,44 $\pm$ 4,27 <sup>a</sup>  | 28,40 $\pm$ 6,83 <sup>a</sup> |
| <b>VLDL (mg.dL<sup>-1</sup>)</b>       | 13,56 $\pm$ 1,84 <sup>a</sup> | 20,00 $\pm$ 1,14 <sup>a</sup>   | 28,84 $\pm$ 1,85 <sup>b</sup>  | 19,80 $\pm$ 1,07 <sup>a</sup> |
| <b>AST (U.L<sup>-1</sup>)</b>          | 65,80 $\pm$ 5,83 <sup>a</sup> | 62,60 $\pm$ 1,75 <sup>a</sup>   | 64,00 $\pm$ 4,21 <sup>a</sup>  | 60,40 $\pm$ 4,23 <sup>a</sup> |
| <b>ALT (U.L<sup>-1</sup>)</b>          | 33,20 $\pm$ 1,39 <sup>a</sup> | 31,20 $\pm$ 1,24 <sup>a</sup>   | 32,80 $\pm$ 2,35 <sup>a</sup>  | 29,40 $\pm$ 1,03 <sup>a</sup> |

410 Médias seguidas de letras distintas na mesma linha diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ). Análise de variância  
 411 One-Way ANOVA, pós-teste de Tukey. \*RCS- Dieta rica em carboidratos simples.

412

413 A ingestão diária de farinha de chia no grupo Ob foi efetiva na redução de  
 414 triglicerídeos e VLDL, além de reestabelecer os níveis de HDL. Não foram detectadas  
 415 alterações nos níveis das transaminases AST e ALT, indicando ausência de  
 416 hepatotoxicidade.

417

418

## 2.2 Parâmetros Morfométricos Intestinais

Não houve influência da dieta e/ou tratamento com farinha de chia sobre o comprimento do intestino delgado (ID) e largura do jejuno entre os grupos. As mensurações obtidas para comprimento do ID e largura do jejuno, respectivamente, foram: C ( $91,60 \pm 5,55\text{cm}$ ) e ( $1,09 \pm 0,05\text{cm}$ ); C15 ( $75,80 \pm 4,98\text{cm}$ ) e ( $1,16 \pm 0,06\text{cm}$ ); Ob ( $88,20 \pm 3,04\text{cm}$ ) e ( $1,14 \pm 0,05\text{cm}$ ); Ob15 ( $79,20 \pm 2,29\text{cm}$ ) e ( $1,00 \pm 0,05\text{cm}$ ).

A morfologia do jejuno, independente do grupo analisado manteve organização histológica padrão característica das túnicas mucosa, submucosa, muscular e serosa, no entanto com variações do comportamento morfométrico entre os grupos (Tabela 4).

Houve aumento significativo na espessura da parede total, túnica mucosa e altura das vilosidades no jejuno de ratos obesos comparados com ratos controle. Nos grupos C15 e Ob15, a farinha de chia preveniu o aumento da espessura e da altura das vilosidades do jejuno ( $p < 0,05$ ) da farinha de chia para os parâmetros citados, comparados com os respectivos grupos C e Ob. Menor profundidade das criptas foi obtida entre os grupos C15 comparado ao C e grupos Ob15 comparando ao Ob.

**Tabela 4.** Morfometria jejunal de ratos: parede total (PT), mucosa (Mu), altura de vilos (Vi), profundidade de criptas (Cr). Grupos: controle (C); controle tratado com farinha de chia (C15); obesos induzidos por dieta RCS\* (Ob) e obesos induzidos por dieta RCS e tratados com farinha de chia (Ob15). Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão.  $n=5$ .

|                                      | C                   | C15                 | Ob                  | Ob15                |
|--------------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| <b>PT (<math>\mu\text{m}</math>)</b> | $646,05 \pm 6,65^a$ | $596,97 \pm 5,34^b$ | $678,38 \pm 3,48^c$ | $617,22 \pm 4,98^d$ |
| <b>Mu (<math>\mu\text{m}</math>)</b> | $549,79 \pm 5,52^a$ | $490,71 \pm 4,16^b$ | $575,53 \pm 2,97^c$ | $538,04 \pm 4,15^a$ |
| <b>Vi (<math>\mu\text{m}</math>)</b> | $382,99 \pm 3,58^a$ | $340,56 \pm 2,61^b$ | $419,90 \pm 2,12^c$ | $406,28 \pm 3,39^d$ |
| <b>Cr (<math>\mu\text{m}</math>)</b> | $148,19 \pm 1,93^a$ | $136,01 \pm 1,46^b$ | $139,25 \pm 1,29^b$ | $123,68 \pm 1,08^c$ |

Médias seguidas de letras distintas na mesma linha diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ). Análise de variância One-Way ANOVA, pós-teste de Tukey. \*RCS- Dieta rica em carboidratos simples

## 2.3 Células produtoras de mucinas

443 O índice de células caliciformes produtoras de mucinas neutras (histoquímica  
444 PAS<sup>+</sup>) e mucinas ácidas (histoquímica AB<sup>+</sup>) do epitélio jejunal estão apresentados na  
445 Figura 1. As mucinas ácidas coradas com Alcian Blue foram classificadas conforme o  
446 pH, sendo pH 1.0 marcador de sulfomucinas e pH 2.5 marcador de sialomucinas e  
447 sulfomucinas.

448 Os animais alimentados com a dieta RCS apresentaram menor número de células  
449 produtoras de mucinas ácidas (sialomucinas e sulfomucinas), mas não as células  
450 produtoras de mucinas ácidas (sulfomucinas) e mucinas neutras. O tratamento com  
451 farinha de chia no grupo obeso (Ob15) revelou efeito nas células produtoras de  
452 sialomucinas e sulfomucinas, com redução significativa do seu número quando  
453 comparado com o grupo C, mas sem diferença significativa quando comparado com o  
454 grupo Ob.

455

456 **Figura 1:** Mucosa jejunal de ratos. Histoquímica de células produtoras de mucinas ácidas  
457 AB<sup>+</sup> pH 1,0 em (A) e pH 2,5 em (C) e mucinas neutras PAS<sup>+</sup> em (E). Aumento de 400x.  
458 Em B, D e F, número médio de células caliciformes nos diferentes grupos: controle (C);  
459 controle tratado com farinha de chia (C15); obesos induzidos por dieta RCS\* (Ob); obesos  
460 induzidos por dieta RCS\* e tratados com farinha de chia (Ob15). One-Way ANOVA  
461 seguido de pós-teste de Tukey, letras distintas indicam diferença significativa p<0,05.  
462 n=5. \*RCS: dieta rica em carboidratos simples.

463

#### 464 **2.4 Células produtoras de serotonina**

465 Foi detectada redução no número de células enteroendócrinas produtoras de  
466 serotonina no epitélio jejunal de ratos obesos na ordem de 52% (p < 0,05) quando  
467 comparado ao grupo controle. O tratamento dos animais obesos com farinha de chia

468 (Ob15), reverteu esse quadro com aumento significativo dessas células quando  
469 comparado com os animais Ob (Figura 2).

470 **Figura 2:** Mucosa jejunal de ratos. Imunoperoxidase para células enteroendócrinas  
471 serotoninérgicas. Aumento de 100x em (A) e 40x em (B). Em (C) número médio de  
472 células enteroendócrinas serotoninérgicas. Grupos: controle (C), controle tratado com  
473 farinha de chia (C15), obesos induzidos por dieta RCS\* (Ob) e obesos induzidos por dieta  
474 RCS\* e tratados com farinha de chia (Ob15). One-Way ANOVA e pós-teste de Tukey.  
475 Letras distintas indicam diferença significativa  $p < 0,05$  (n=5). \*RCS: dieta rica em  
476 carboidratos simples.

477

478 Na lâmina própria, mastócitos evidenciados por meio de histoquímica com Azul  
479 de Toluidina estão apresentados na Figura 3 (A). Houve aumento significativo do número  
480 de mastócitos presentes na lâmina própria do jejuno dos ratos obesos (Ob) na ordem de  
481 22%, comparado ao grupo C. A ingestão da farinha de chia ofertada a animais obesos  
482 (Ob15) reestabeleceu o número médio destas células. Ao considerar mastócitos  
483 imuno-reativos à serotonina (mastócitos 5HT-IR), constatou-se mesmo comportamento,  
484 com aumento significativo no grupo Ob na ordem de 188%, comparado ao grupo C. A  
485 ingestão de farinha de chia mostrou-se eficiente ao reduzir significativamente o número de  
486 mastócitos 5-HT-IR cerca de 50% grupo Ob15 quando comparado ao grupo Ob (Figura  
487 3, C e D).

488

489 **Figura 3:** Lâmina própria da mucosa jejunal de ratos. Em (A) Histoquímica com Azul  
490 de Toluidina para mastócitos (seta), em (C) Imunoperoxidase para mastócitos 5-HT-IR  
491 (seta). Aumento de 100x. Em (B) número médio de mastócitos e em (D) número médio  
492 de mastócitos 5-HT-IR. Grupos: controle (C), controle tratado com farinha de chia (C15),



493 obesos induzido por dieta RCS\* (Ob) e obesos induzido por dieta RCS\* e tratados com  
494 farinha de chia (Ob15). One-Way ANOVA e pós-teste de Tukey. Letras distintas indicam  
495 diferença significativa  $p < 0,05$  (n=5). \*RCS: dieta rica em carboidratos simples.

### 496           **3 DISCUSSÃO**

497           Este estudo demonstra que a ingestão de quantidade elevada de carboidratos  
498 simples na alimentação, resulta em aumento de peso corporal e da adiposidade visceral,  
499 comprovando que este modelo experimental é ideal para o estudo da obesidade. Este  
500 modelo é caracterizado segundo Lima et al [35], que utilizaram dieta hipercalórica por 19  
501 semanas, pelo aumento do peso corporal, da ingestão alimentar, de níveis plasmáticos de  
502 ácidos graxos e de triglicerídeos em ratos.

503           Nossos resultados também estão de acordo com os obtidos por Abu-Elsaad et al  
504 [36], que obtiveram aumento significativo no peso corporal de ratos tratados com dieta  
505 rica em carboidratos e gorduras durante 8 semanas. Camundongos alimentados com dieta  
506 rica em gordura durante 60 dias [25] e durante 56 dias [37] também apresentaram  
507 aumento significativo da adiposidade visceral, corroborando nossos resultados.

508           A ingestão de farinha de chia, alimento funcional com comprovada qualidade  
509 nutricional, devido ao alto teor de minerais, proteínas, fibras e lipídios [10], por 8  
510 semanas, reduziu significativamente o peso corporal de ratos obesos. Resultados distintos  
511 foram obtidos para ratos obesos tratados com semente e óleo de chia por 6 e 12 semanas,  
512 que não apresentaram efeito sobre o peso corporal e a circunferência abdominal [19] e  
513 elevação do peso corporal [17] em ratos obesos tratados por 8 semanas com semente de  
514 chia.

515           Segundo Silva et al [20], o tratamento com farinha de chia por 14 dias em ratos  
516 controle promove redução no peso corporal, justificada pela alta digestibilidade de  
517 proteína promovida pela chia, contrapondo com nossos resultados para animais controle  
518 tratados com farinha de chia, que não apresentaram diferença significativa neste  
519 parâmetro.

520 Os valores obtidos para o perfil lipídico em nosso estudo, demonstram aumento  
521 significativo de triglicerídeos e VLDL e redução significativa de HDL nos ratos obesos,  
522 similares a outros trabalhos encontrados na literatura, tanto para triglicerídeos [35,38]  
523 quanto para HDL [38], decorrentes da obesidade.

524 A ingestão de farinha de chia pelos ratos obesos (grupo Ob15), apresentou efeito  
525 positivo considerando a redução obtida para os níveis de triglicerídeos e VLDL,  
526 reestabelecendo a níveis normais.

527 Para animais controle (C15), a ingestão de farinha de chia não interferiu no perfil  
528 lipídico avaliado, discordando de Silva et al [20] que demonstra redução significativa de  
529 LDL e VLDL em ratos controle tratados com farinha de chia.

530 Independente da obesidade e/ou ingestão de farinha de chia, o valor glicêmico foi  
531 mantido entre os grupos, o que está de acordo com os resultados de Lima et al [35]  
532 utilizando a mesma dieta e Almeida et al [39] utilizando ratos obesos por dieta cafeteria.  
533 Resultados divergentes são encontrados na literatura com relação a possível efeito da  
534 obesidade, com elevação da glicemia em ratos [38] e camundongos [37]. A redução da  
535 glicemia após utilização de farinha de chia por 28 dias em ratos não obesos foram obtidos  
536 por Silva et al [20].

537 Os níveis das transaminases AST e ALT não diferiram significativamente entre  
538 os grupos, indicando ausência de hepatotoxicidade em todos os grupos. Aumento  
539 significativo de transaminases em ratos controle tratados com farinha e semente de chia  
540 durante 28 dias, foi obtido por Silva et al [20], entretanto são valores situados na faixa de  
541 normalidade para ratos [17]. Em contrapartida, Marineli et al [19], demonstraram que o  
542 tratamento de ratos obesos com óleo de chia, por 6 e 12 semanas, e com semente de chia  
543 por 12 semanas, reverte os níveis elevados de AST e ALT que foram desencadeados pela  
544 obesidade.

545

#### 546 **Parâmetros morfométricos intestinais**

547 Não houve efeito da obesidade e/ou ingestão de farinha de chia sobre o  
548 comprimento do intestino delgado e largura do jejuno, assim como a indução de  
549 obesidade por dieta de cafeteria em ratos, do desmame (21 dias) até os 120 dias de idade  
550 também não diferiram quanto ao comprimento do intestino delgado [40]. Já,  
551 camundongos alimentados com a dieta rica em gordura por 8 semanas apresentaram  
552 redução do comprimento intestinal, e manutenção na largura do jejuno [25].

553 A morfologia do jejuno apresentou organização histológica padrão, independente  
554 do grupo analisado. As características das túnicas mucosa com relação aos tipos celulares  
555 presentes no epitélio e lâmina própria, ao arranjo de vilos e criptas; túnica submucosa,  
556 muscular externa e serosa, são compatíveis à descrições clássicas da parede jejunal  
557 [41,42] e especificamente, de roedores [25,39].

558 A análise morfométrica da espessura da mucosa, altura de vilos e profundidade de  
559 criptas, além da espessura da parede total jejunal, apresentou variações significativas.  
560 Constatou-se que a dieta RCS promoveu aumento da espessura da parede total, túnica  
561 mucosa e altura de vilos e reduziu a profundidade das criptas. Esse comportamento  
562 encontra similaridade em outros modelos de obesidade no jejuno de camundongos, em  
563 que se observou aumento significativo da altura de vilos e parede total, além da redução de  
564 profundidade de cripta [25] e com ratos alimentados com dieta cafeteria dos 21 aos 120 dias  
565 de idade, que apresentaram aumento significativo na altura de vilos do jejuno [39].

566 Ratos alimentados com dieta de cafeteria dos 21 aos 120 dias de idade,  
567 apresentaram aumento significativo na altura dos vilos do jejuno, assim como nossos  
568 achados, entretanto neste estudo houve manutenção da profundidade de cripta [39].

569 Efeitos da farinha de chia sobre parâmetros morfométricos intestinais são escassos  
570 na literatura. Nossos resultados demonstram que ratos controle e obesos tratados com  
571 farinha de chia, apresentaram redução significativa da espessura da parede total, túnica  
572 mucosa e altura de vilo. Contrariamente, um aumento na profundidade das criptas do  
573 intestino grosso, de ratos normais tratados com chia relatado por Silva et al [20].

574 Assim, ao se considerar que a obesidade interferiu na morfometria intestinal,  
575 principalmente com elevação dos parâmetros, espessura de túnica mucosa, altura de vilos  
576 e espessura de parede total, considera-se que ocorreu uma resposta adaptativa deste órgão  
577 [43] aumentando a superfície intestinal absorptiva e a parede total, comum em casos de  
578 sobrecarga alimentar [21]. Ao utilizar a farinha de chia nos ratos obesos, houve efeito  
579 redutor nestes parâmetros. Isto pode ser explicado pelo alto teor de fibras insolúveis  
580 presentes na farinha de chia, que auxiliam na motilidade, acelerando o trânsito intestinal  
581 e reduzindo a sobrecarga alimentar [13].

582

### 583 **Células produtoras de mucina e serotonina**

584 A barreira intestinal é o componente funcional do intestino que separa o meio  
585 externo do meio interno [44], evitando a entrada de macromoléculas e materiais  
586 antigênicos do lúmen intestinal para a circulação sistêmica [45]. Sua integridade é  
587 fundamental para garantir a homeostase intestinal.

588 Ratos alimentados com dieta rica em gordura por 6 semanas apresentam  
589 alterações em componentes importantes da barreira intestinal, com redução da expressão  
590 da proteína claudina-4 presente nas junções oclusivas do epitélio, e aumento das células  
591 M, envolvidas com funções imunes do intestino, como resposta causada pela inflamação  
592 decorrente da obesidade [46].

593           Nosso trabalho deu ênfase ao comportamento das células produtoras de mucinas  
594 e de serotonina da mucosa do jejuno de ratos. A célula caliciforme é responsável por  
595 sintetizar e secretar mucinas ácidas e neutras [23]. As mucinas ácidas apresentam ácido  
596 siálico (sialomucinas) ou grupos sulfato (sulfomucinas) na sua estrutura. As sialomucinas  
597 possuem propriedade de eliminação de radicais hidroxila, devido ao ácido siálico presente  
598 na sua composição [27]. Já as sulfomucinas protegem o intestino contra a translocação  
599 bacteriana, pois são menos degradadas pelas glicosidases das bactérias [47]. As mucinas  
600 neutras estão aumentadas quando há maior viscosidade do muco, com o intuito de  
601 espessar a camada mucosa [48].

602           O tipo de dieta, a microbiota e produtos de fermentação podem determinar a forma  
603 e secreção do muco no epitélio intestinal através da regulação das células caliciformes  
604 [49], com implicações sobre o número dessas células. Com relação às mucinas neutras  
605 (PAS<sup>+</sup>), nossos resultados indicam manutenção no número de células caliciformes no  
606 jejuno dos quatro grupos experimentais, podendo-se inferir que a dieta RCS e/ou o  
607 tratamento com chia, não teve efeito sobre estas células. Resultado semelhante foi obtido  
608 no jejuno com manutenção do número de células caliciformes em camundongos obesos  
609 por dieta hiperlipídica [25]. Divergindo de nossos resultados, Scoaris et al [50] obtiveram  
610 redução no número de células caliciformes no jejuno de ratos obesos por dieta de  
611 cafeteria, e Truter et al [27] também obtiveram redução de células caliciformes produtoras  
612 de mucinas neutras nas criptas do intestino grosso (colo) de ratos alimentados com dieta  
613 hipercalórica. Redução de células caliciformes também é relatada em modelo de restrição  
614 calórica no colo proximal de ratos [31].

615           Quando analisamos as células produtoras de mucinas ácidas, encontramos  
616 resultados divergentes conforme o pH utilizado. Houve efeito apenas nas células  
617 produtoras de sialomucinas e sulfomucinas (AB<sup>+</sup> pH 2,5), com redução no número de

618 células caliciformes nos ratos obesos e obesos tratados com chia. Segundo Silva et al [20],  
619 ratos tratados com farinha de chia por 14 dias apresentam redução da digestibilidade,  
620 decorrente da alta concentração de fibras, compostos fenólicos e ácidos fílicos, que  
621 formam um complexo viscoso com o conteúdo intestinal, constituindo uma barreira e  
622 reduzindo a absorção. Consideramos que a interação da farinha de chia com o  
623 componente mucoso da barreira dos animais obesos (Ob15), justifica a redução obtida,  
624 possivelmente relacionada a um mecanismo de compensação fisiológica.

625 Um fator importante a ser considerado é a associação do tipo de dieta com a  
626 microbiota [51], refletindo no funcionamento das células do epitélio intestinal. O número  
627 de células caliciformes produtoras de sulfomucinas (AB<sup>+</sup> pH 1,0) foi mantido em todos  
628 os grupos. As sulfomucinas exercem papel protetor da mucosa intestinal contra a  
629 translocação bacteriana, por possuírem resistência às glicosidases [46] e a manutenção do  
630 seu número poderia minimizar alterações da barreira intestinal.

631 Na mucosa intestinal, as células enteroendócrinas (EC) produtoras de serotonina  
632 (5-HT), estão localizadas no epitélio, e na lâmina própria, os mastócitos.

633 A serotonina produzida por EC atua como mediador pró-inflamatório e modula a  
634 permeabilidade intestinal, alterando as características funcionais da barreira [52,53].

635 Nossos resultados indicam efeito da dieta RCS sobre as células enteroendócrinas  
636 serotoninérgicas levando a redução significativa do seu número. Uma vez que a obesidade  
637 é caracterizada como um quadro inflamatório [6] era de se esperar um aumento no número  
638 de células enteroendócrinas imunorreativas a 5-HT, o que não aconteceu.

639 Em pacientes com Doença Inflamatória Intestinal, Magro et al [54] detectaram  
640 redução significativa dos níveis de 5-HT nas células enteroendócrinas da mucosa quando  
641 comparada a indivíduos controle. A redução dos níveis de 5-HT nos tecidos inflamados  
642 foi acompanhada por redução significativa nos níveis de receptores de serotonina (5-

643 HIAA), sugerindo uma diminuição na taxa de utilização de 5-HT, desaminação reduzida  
644 da amina, capacidade reduzida das ECs em sintetizar 5-HT ou ainda redução no número  
645 dessas células.

646 Manutenção do número de células enteroendócrinas no duodeno, jejuno e íleo de  
647 pacientes com Síndrome do Intestino Irritável foi constatado por Wang et al [55],  
648 entretanto com redução do conteúdo de 5-HT no jejuno. Por outro lado, experimentos  
649 com camundongos knockout com ausência de receptores da recaptação de serotonina  
650 (SERT) indicam que níveis aumentados de 5-HT, intensificam processos inflamatórios  
651 [56].

652 A resposta obtida com relação às células serotoninérgicas indicam que  
653 possivelmente um quadro inflamatório inicial decorrente da obesidade, pode ter sido  
654 revertido por um processo de adaptação do animal devido ao longo período experimental.

655 Apesar de não avaliarmos o comportamento dos animais relacionados à saciedade,  
656 é um fator que deve ser considerado ao se associar a produção de serotonina, uma vez que  
657 os sinais de saciedade decorrentes do intestino também envolvem a liberação de 5-HT,  
658 sendo que a supressão da ingestão alimentar é mediada inteiramente pela ativação  
659 simultânea de receptores 5-HT<sub>3</sub> e CCK<sub>1</sub> [57,58].

660 Os animais obesos tratados com a farinha de chia apresentaram aumento  
661 significativo no número destas células, aproximando-os dos níveis dos animais controle.  
662 Como o controle de saciedade é mediado pela liberação de 5-HT, a chia atua  
663 positivamente no equilíbrio desse processo. Devido ao percentual de fibras encontrados  
664 na semente de chia, seu consumo aumenta a saciedade e diminui a ingestão calórica  
665 [59,60,61] sendo benéfica para a saúde, melhorando quadros de obesidade, doenças  
666 cardiovasculares e diabetes tipo 2 [60].



667 A migração celular do epitélio intestinal e função de barreira são  
668 homeostaticamente reguladas pelos mastócitos, de acordo com Groschwitz et al [34], ao  
669 relatarem que camundongos deficientes em mastócitos tem alterado a estrutura e função  
670 da barreira intestinal, com redução da migração do epitélio e da permeabilidade, e  
671 presença de alterações na arquitetura intestinal. Quando estimulados, os mastócitos  
672 liberam mediadores inflamatórios, como serotonina e proteases, bem como citocinas pró-  
673 inflamatórias [62]. Os fatores quimiotáticos produzidos pelos mastócitos aumentam o  
674 recrutamento de células inflamatórias, resultando em amplificação da reação inflamatória  
675 [63].

676 Em nosso estudo, o número de mastócitos e mastócitos imunoreativos à serotonina  
677 (5-HT-IR) presentes na lâmina própria do jejuno de ratos obesos (grupo Ob) apresentaram  
678 aumento significativo. Esse aumento pode ser consequência do acúmulo de eventos  
679 inflamatórios, causados pela obesidade [64]. Segundo Lee [65], dietas ricas em gordura  
680 aumentam a liberação de fator de necrose tumoral alfa do intestino, alteram a imunidade  
681 da mucosa, ativam os mastócitos, aumentam a permeabilidade vascular e alteram  
682 membranas intestinais.

683 Assim, o aumento no número de mastócitos corresponde a uma resposta imune  
684 elevada, podendo promover alterações de barreira intestinal [33]. Aumento no número de  
685 mastócitos ocorreu no jejuno e íleo de camundongos com diarreia alérgica [66], na lâmina  
686 própria do intestino delgado e grosso em indivíduos com doença inflamatória intestinal  
687 [67] e em casos de colite ulcerativa, houve aumento de mastócitos imunorreativos à  
688 serotonina na mucosa do intestino grosso [68].

689 A ingestão da farinha de chia conseguiu impedir o aumento do número dos  
690 mastócitos e mastócitos 5-HT-IR, mantendo os valores semelhantes ao controle. Dessa

691 maneira a farinha de chia apresenta resultado positivo sobre a manutenção de  
692 componentes da barreira intestinal em ratos obesos.

693 **4. CONCLUSÃO**

694 A ingestão de farinha de chia (0,15g/kg/peso corporal) reduz o peso corporal e peso  
695 do tecido adiposo visceral, além de reduzir o nível de triglicerídeos e melhorar os níveis  
696 de HDL, sendo uma alternativa válida no controle da obesidade, uma vez que não possui  
697 efeito hepatotóxico. Tem influência o número de células produtoras de mucinas e  
698 serotonina e reestabelece variáveis morfométricas da mucosa jejunal de ratos obesos.

699 **5. METODOLOGIA**

700 Todos os procedimentos que envolvem o uso de animais foram realizados de  
701 acordo com os princípios éticos da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de  
702 Laboratório (SBCAL) e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da  
703 Universidade Estadual de Maringá (Parecer n. 7153110316).

704

705 **5.1 Animais**

706 Foram utilizados 20 ratos machos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar,  
707 obtidos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, aos 21 dias de idade e  
708 transferidos para o Biotério Setorial do Departamento de Ciências Fisiológicas e  
709 submetidos a fotoperíodo com iluminação de claro e escuro de 12 horas e temperatura de  
710 23°C.

711 **5.2 Regime alimentar**

712 Os ratos foram mantidos em caixas de polipropileno (46x24x20cm, quatro  
713 animais por caixa) e distribuídos inicialmente em dois grupos experimentais. Dez animais  
714 receberam ração padrão para roedores (Nuvilab – Curitiba PR, Brasil) e para indução da  
715 obesidade, dez animais receberam dieta rica em carboidratos simples (RCS) composta  
716 por ração triturada, leite condensado Moça®, açúcar cristal e água [35]. A tabela 5  
717 apresenta a composição e valores nutricionais das dietas utilizadas. Todos os animais  
718 tiveram livre acesso à água e alimento.

719 **Tabela 5.** Valores nutricionais da dieta padrão e da dieta rica em carboidratos simples (RCS)

| Valores Nutricionais          | Dieta padrão | Dieta RCS |
|-------------------------------|--------------|-----------|
| Calorias (kcal/100g de dieta) | 292          | 318       |
| Carboidratos (%)              | 57,2         | 68        |
| Proteínas (%)                 | 30           | 16        |
| Gorduras (%)                  | 12,5         | 16        |
| Água (%)                      | 12,5         | 27        |

720

### 721 *5.3 Administração da farinha de Chia*

722 Quando atingiram a idade de 90 dias, os animais do grupo controle e obeso foram  
723 subdivididos em quatro grupos adicionais (n=5):

724 ➤ **Grupo controle (C):** animais alimentados com dieta padrão

725 ➤ **Grupo controle com farinha de chia (C15):** animais alimentados com  
726 dieta padrão e 0,15g de farinha de chia por kg de peso corporal por 60 dias;

727 ➤ **Grupo obeso (Ob):** animais alimentados com dieta RCS;

728 ➤ **Grupo obeso com farinha de chia (Ob15):** animais alimentados com  
729 dieta RCS e 0,15g de farinha de chia por kg de peso corporal, por 60 dias.

730 A semente de chia foi adquirida em loja de produtos naturais, em quantidade  
731 suficiente para o desenvolvimento completo do estudo. Este procedimento visou evitar o  
732 uso de sementes de diferentes lotes com variação da composição. As sementes foram  
733 trituradas em laboratório, utilizando liquidificador. A farinha de chia foi administrada aos  
734 animais sob a forma de suspensão em água filtrada, na concentração de 15mg por 0,5mL,  
735 empregando-se a técnica de gavagem, cinco vezes na semana, sempre no mesmo horário  
736 (16 horas). O volume administrado foi de 0,5mL para cada 100g de peso corporal. Os  
737 animais controle e obesos que não foram tratados com a farinha de chia, foram submetidos  
738 à gavagem recebendo água filtrada (0,5mL para cada 100g de peso corporal), para que os  
739 animais passassem pelo mesmo estresse de contenção que os animais tratados com a  
740 farinha de chia.

741

### 742 *5.4 Peso corporal e coleta de órgãos*

743 O peso corporal dos animais foi avaliado aos 21, 90 e 150 dias de idade. Aos 150  
744 dias de idade, após jejum de 12 horas, o sangue foi coletado por um cateter de silicone  
745 implantado na veia jugular direita para as análises bioquímicas sanguíneas. Os animais

746 foram anestesiados com dose letal de pentobarbital sódico (120mg/kg de peso corporal,  
747 com lidocaína) por via intraperitoneal.

748 Foram removidos e pesados os tecidos adiposos periepididimal, retroperitoneal,  
749 inguinal e mesentérico, para a determinação da adiposidade. O intestino delgado foi  
750 removido para mensuração do seu comprimento, sendo mensurada a largura do jejuno.  
751 As amostras desse segmento foram utilizados para análises histológicas, histoquímicas e  
752 imunohistoquímicas.

753

### 754 ***5.5 Análises bioquímicas***

755 Parte do sangue coletado de cada animal foi adicionado em tubo com heparina  
756 para dosagem de glicose e o restante foi deixado em um tubo sem anticoagulante para  
757 obtenção do soro que foi utilizado para dosagem de AST (Aspartato Aminotransferase),  
758 ALT (Alanina Aminotransferase), colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL),  
759 baixa densidade (LDL), e muito baixa densidade (VLDL) e triglicerídeos. As amostras  
760 foram centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos. As análises foram realizadas por meio  
761 de kits comerciais (Gold Analisa Diagnostica Ltda, Minas Gerais, Brasil) de acordo com  
762 as especificações do fabricante em espectrofotômetro Bioplus 2000.

763

### 764 ***5.6 Processamento histológico***

765 O jejuno foi fixado em solução de paraformaldeído 4% durante seis horas e  
766 armazenado em álcool 70%. Posteriormente as amostras foram desidratadas em série de  
767 concentrações crescentes de álcool (80%, 90% e 100%), diafanizadas em xilol e incluídas  
768 em parafina.

769 Foram obtidos cortes semisseriados de 5 µm de espessura em micrótomo Leica  
770 RM 2145, dispostos em lâminas com solução de poli-L-lisina (Sigma- Aldrich, St. Louis,

771 MO, EUA), sendo mantidos cinco cortes por lâmina/animal, para realização dos seguintes  
772 procedimentos:

### 773 ***5.6.1 Avaliação Morfológica e Morfométrica do Jejuno***

774 A coloração com Hematoxilina-Eosina foi utilizada para avaliação morfológica e  
775 morfométrica da mucosa intestinal, altura de vilos, profundidade das criptas e parede  
776 total.

777 Inicialmente foi realizada a desparafinização com xilol, seguido da hidratação em  
778 bateria de álcool com concentrações decrescentes. Posteriormente, utilizou-se os corantes  
779 Hematoxilina de Harris por 20 segundos, e Eosina por 30 segundos. Após coloração, os  
780 cortes foram desidratados com bateria de álcool crescente seguido de diafanização com  
781 xilol e montados sob lamínula com resina sintética Permount®.

782

### 783 ***5.7 Evidenciação de Células Produtoras de Mucinas Ácidas e Neutras***

#### 784 ***5.7.1 Alcian Blue pH 1.0 e pH 2.5***

785 A histoquímica com Alcian Blue evidencia as mucinas ácidas produzidas pelas  
786 células caliciformes, com pH 1.0 para identificar sulfomucinas e pH 2.5 para identificar  
787 sialomucinas e sulfomucinas. Após a desparafinização com xilol, as amostras foram  
788 hidratadas em bateria de álcool com concentrações decrescentes. Posteriormente,  
789 utilizou-se a solução de Alcian Blue (pH 1.0 e 2.5) por 40 minutos e contracoloração com  
790 Hematoxilina de Meyer por 30 segundos. Após coloração, os cortes foram desidratados  
791 com bateria de álcool crescente seguido de diafanização com xilol e montados sob  
792 lamínula com resina sintética Permount®.

793

#### 794 ***5.7.2 Ácido Periódico de Schiff (PAS)***

795 A histoquímica com PAS evidencia as mucinas neutras produzidas pelas células  
796 caliciformes. Inicialmente foi realizada a desparafinização com xilol, seguido da  
797 hidratação em bateria de álcool com concentrações decrescentes. Posteriormente, foi  
798 realizada a oxidação com Ácido Periódico 1% por 5 minutos. A seguir, foi tratado com  
799 Reativo de Schiff por 15 minutos, seguido de três banhos em água sulfurosa.  
800 Posteriormente foi feita a contra coloração com Hematoxilina por um minuto. Após  
801 coloração, os cortes foram desidratados com bateria de álcool crescente seguido de  
802 diafanização com xilol e montados sob lamínula com resina sintética Permount®.

803

## 804 ***5.8 Evidenciação de Células Produtoras de Serotonina***

### 805 ***5.8.1 Histoquímica para evidenciação de mastócitos (Azul de toluidina)***

806 Inicialmente foi realizada a desparafinização com xilol, seguido da hidratação em  
807 bateria de álcool com concentrações decrescentes. Posteriormente, utilizou-se o corante  
808 Fucsina-Laranja G por um minuto, e corante Azul de Toluidina a 60°C por 5 minutos.  
809 Após coloração, os cortes foram desidratados com bateria de álcool crescente seguido de  
810 diafanização com xilol e montados sob lamínula com resina sintética Permount®.

### 811 ***5.8.2 Imunohistoquímica para evidenciação de células serotoninérgicas (5-HT-*** 812 ***IR)***

813 Inicialmente foi feito a desparafinização com xilol, seguido de hidratação em  
814 bateria de álcool com concentrações decrescente. Após hidratado, o material foi mantido  
815 por 5 minutos em solução tampão PBS 0,1M pH7,4. Foi realizado o bloqueio da  
816 peroxidase endógena, seguida de lavagem em PBS acrescida de Triton X-100 0,5%, por  
817 cinco minutos. Posteriormente foi feito bloqueio das reações inespecíficas com PBS,  
818 Triton x-100 0,5%, soro de burro e Albumina do Soro Bovino (BSA), por uma hora em



819 temperatura ambiente. A incubação foi feita com anticorpo primário anti-5HT (anti-  
820 coelho, 1:500) por 24 horas a 4°C.

821 Após este período, a incubação do anticorpo secundário foi realizada com anti-  
822 coelho conjugado com HRP (Horseradish peroxidase) (1:500) por duas horas em  
823 temperatura ambiente. Sequencialmente realizadas lavagens PBS+Triton, revelação com  
824 Di-amino-benzina (DAB) por 10 minutos e lavagem com água destilada e  
825 contracoloração com Hematoxilina de Meyer por 30 segundos. Após, os cortes foram  
826 desidratados com a bateria de álcool crescente seguido de diafanização com xilol e  
827 montados sob lamínula com resina sintética Permount®.

828

## 829 ***5.9 Análises***

830 As imagens obtidas nas diferentes técnicas foram capturadas com câmera de alta  
831 resolução Moticam ® 2500 5.0 Mega Pixel (Motic China Group Co, Shanghai, China),  
832 acoplado a um microscópio Motic BA 400 (Motic China Group Co, Shanghai), conforme  
833 segue:

### 834 ***5.9.1 Avaliação morfológica do jejuno***

835 A partir de imagens de cortes corados com hematoxilina e eosina, foi avaliado a  
836 espessura da túnica mucosa e parede intestinal total, mensuração da altura de vilos e  
837 profundidade das criptas com resultado expresso em µm. Foram realizadas 90  
838 mensurações aleatórias por animal na objetiva de 10X [69].

### 839 ***5.9.2 Quantificação de células caliciformes***

840 Para avaliar o número de células caliciformes evidenciadas pelo método  
841 histoquímico P.A.S e Alcian Blue, foram quantificadas 2500 células em vilosidades  
842 íntegras e orientadas longitudinalmente, com o auxílio do microscópio óptico Olympus  
843 BX41, utilizando objetiva de 40X. A razão entre o número de células caliciformes e o

844 número de enterócitos na vilosidade foi definida como o índice de células caliciformes  
845 (IC), sendo:  $IC = (N^{\circ} \text{ de células caliciformes} / N^{\circ} \text{ total de células na vilosidade}) \times 100$   
846 [25].

### 847 ***5.9.3 Quantificação das células enteroendócrinas serotoninérgicas***

848 O número de células imunorreativas a serotonina do epitélio foi quantificada a  
849 partir de imagens capturadas na objetiva de 10x, imunomarcadas com peroxidase. Foi  
850 quantificado o número médio de células em 90 vilos/criptas/animal.

### 851 ***5.9.4 Quantificação de mastócitos***

852 O número de mastócitos presentes na lâmina própria da túnica mucosa foi  
853 quantificada a partir de imagens coradas com Azul de Toluidina e a partir de imagens de  
854 mastócitos imunorreativos para serotonina (5-HT-IR). As imagens foram capturadas na  
855 objetiva de 40x e quantificado o número médio de células em 80 campos/animal (11,8  
856 mm<sup>2</sup>). Resultado expresso em  $\mu\text{m}^2$ .

857

### 858 ***5.10 Análise estatística***

859 Constatada a normalidade dos dados obtidas por meio do teste de Kolmogorov-  
860 Smirnov ou Shapiro Wilk, os dados foram submetidos a análise de variância One-Way  
861 (ANOVA) seguida de pós-teste de Tukey. Os resultados foram expressos como média  $\pm$   
862 erro padrão e os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.  
863 Para análise dos dados utilizou-se os programas GraphPad Prism 6.01.

## 6. REFERÊNCIAS

- 865 1. Organização Mundial de Saúde. Monitoring health for the SDG. Geneva: WHO;  
866 2016. Acessível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>  
867
- 868 2. Vigitel B. Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por  
869 inquérito telefônico. SVS/Ministério da Saúde e NUPENS/Universidade de São  
870 Paulo. 2011.  
871
- 872 3. Bahia L, Araújo DV. Impacto econômico da obesidade no Brasil. Revista HUPE  
873 2014;13(1): 13-17. DOI: 10.12957/rhupe.2014.9793  
874
- 875 4. Wright, SM, Louis JA. Causes of obesity. *Abdom Radiology* 2012;37(5): 730-732.  
876 DOI: 10.1007/s00261-012-9862-x  
877
- 878 5. Pereira, LO, Francischi RP, Lancha AH. Obesidade: hábitos nutricionais,  
879 sedentarismo e resistência à insulina. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2003;47(2): 111-  
880 127. DOI: 10.1590/S0004-27302003000200003  
881
- 882 6. Lopes, HF. Hipertensão e inflamação: papel da obesidade. *Rev Bras Hipertens*  
883 2007;14(4): 239-244.  
884
- 885 7. Arslan, N. Obesity, fatty liver disease and intestinal microbiota. *World J*  
886 *Gastroenterol* 2014;20(44): 16452-16463. DOI: 10.3748/wjg.v20.i44.16452  
887
- 888 8. Muñoz, LA, Cobos A, Diaz O, Aguilera JM. Chia seed (*Salvia hispanica*): an ancient  
889 grain and a new functional food. *Food reviews international* 2013;29(4): 394-408.  
890 DOI: 10.1080/87559129.2013.818014  
891
- 892 9. Ferreira, TRB. Caracterização nutricional e funcional da farinha de chia (*Salvia*  
893 *hispanica*) e sua aplicação no desenvolvimento de pães. Piracicaba. Tese de  
894 Doutorado. Universidade de São Paulo. 2013. Acessível em:  
895 <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11141/tde-12112013-112435/en.php>  
896
- 897 10. Coelho, MS, Salas-Mellado MM. Review: Chemical composition, functional  
898 properties and technological applications of chia (*Salvia hispanica* L) seeds in foods.  
899 *Brazilian Journal of Food Technology* 2014;17(4): 259-268. DOI: 10.1590/1981-  
900 6723.1814  
901
- 902 11. Valenzuela R, Barrera C, González-Astorga M, Sanhueza J, Valenzuela A. Alpha  
903 linolenic acid (ALA) from *Rosa canina*, sacha inchi and chia oils may increase ALA  
904 accretion and its conversion into n-3 LCPUFA in diverse tissues of the rat. *Food &*  
905 *function* 2014;5(7): 1564-1572. DOI: 10.1039/c3fo60688k  
906
- 907 12. Silva BP, Anunciação PC, Matyelka JCS, Lucia CMD, Martino HSD, Pinheiro-  
908 Sant'Ana HM. Chemical composition of Brazilian chia seeds grown in different  
909 places. *Food Chemistry* 2017;221: 1709-1716. DOI:  
910 10.1016/j.foodchem.2016.10.115  
911
- 912 13. Hurtado DC, Calliari CM. Fibras alimentares no controle da obesidade. *Revista*  
913 *UNESUL* 2010: 10-24.

- 914  
915 14. Tucker LA, Thomas KS. Increasing total fiber intake reduces risk of weight and fat  
916 gains in women. *J Nutr* 2009;139(3): 576-581. DOI: 10.3945/jn.108.096685  
917
- 918 15. Marcinek K, Krejpcio Z. Chia seeds (*Salvia hispanica*): health promoting properties  
919 and therapeutic applications—a review. *Rocz Panstw Zakl Hig* 2017;68(2): 123-129.  
920
- 921 16. Toscano LT, Toscano LT, Tavares RL, Silva CSO, Silva AS. Chia induces clinically  
922 discrete weight loss and improves lipid profile only in altered previous values. *Nutr*  
923 *Hosp* 2015; 31(3): 1176-1182. DOI: 10.3305/nh.2015.31.3.8242  
924
- 925 17. Poudyal H, Panchal SK, Waanders J, Ward L, Brown L. Lipid redistribution by  $\alpha$ -  
926 linolenic acid-rich chia seed inhibits stearoyl-CoA desaturase-1 and induces cardiac  
927 and hepatic protection in diet-induced obese rats. *J Nutr Biochem* 2012;23(2): 153-  
928 162. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2010.11.011  
929
- 930 18. Marineli RS, Lenquiste SA, Moraes ÉA, Maróstica MR. Antioxidant potential of  
931 dietary chia seed and oil (*Salvia hispanica* L.) in diet-induced obese rats. *Food Res In*  
932 *2015*;76: 666-674. DOI: 10.1016/j.foodres.2015.07.039  
933
- 934 19. Marineli RS, Moura CS, Moraes EA, Lenquiste SA, Lollo PCB, Morato PN et al.  
935 Chia (*Salvia hispanica* L.) enhances HSP, PGC-1 $\alpha$  expressions and improves glucose  
936 tolerance in diet-induced obese rats. *Nut* 2015;31(5): 740-748. DOI:  
937 10.1016/j.nut.2014.11.009  
938
- 939 20. Silva BP, Dias DM, Moreira MEC, Toledo RCL, Matta SLP, Lucia CMD, et al. Chia  
940 seed shows good protein quality, hypoglycemic effect and improves the lipid profile  
941 and liver and intestinal morphology of *wistar* rats. *Plant Foods Hum Nutr*, 2016;71(3):  
942 225-230. DOI: 10.1007/s11130-016-0543-8  
943
- 944 21. Stenkamp-Strahm C, Patterson S, Boren J, Gericke M, Balemba O. High-fat diet and  
945 age-dependent effects on enteric glial cell populations of mouse small intestine.  
946 *Autonomic Neuroscience*, 2013;177(2): 199-210. DOI:  
947 10.1016/j.autneu.2013.04.014  
948
- 949 22. Hautrive TP, Moura GBD, Callegaro MDGK, Hecktheuer LHR. Effect of flaxseed  
950 (*Linum usitatissimum* L.) prepared by different methods on the biological response of  
951 rats. *Revista de Nutrição*, 2011;24(1): 131-141. DOI: 10.1590/S1415-  
952 52732011000100013  
953
- 954 23. Dharmani P, Srivastava V, Kisson-Singh V, Chadee K. Role of intestinal mucins in  
955 innate host defense mechanisms against pathogens. *J Innate Immun* 2009;1(2): 123-  
956 135. DOI: 10.1159/000163037  
957
- 958 24. Cornick S, Tawiah A, Chadee K. Roles and regulation of the mucus barrier in the gut.  
959 *Tissue Barriers* 2015;3(1-2), e982426-1 – e982426-15. DOI:  
960 10.4161/21688370.2014.982426  
961

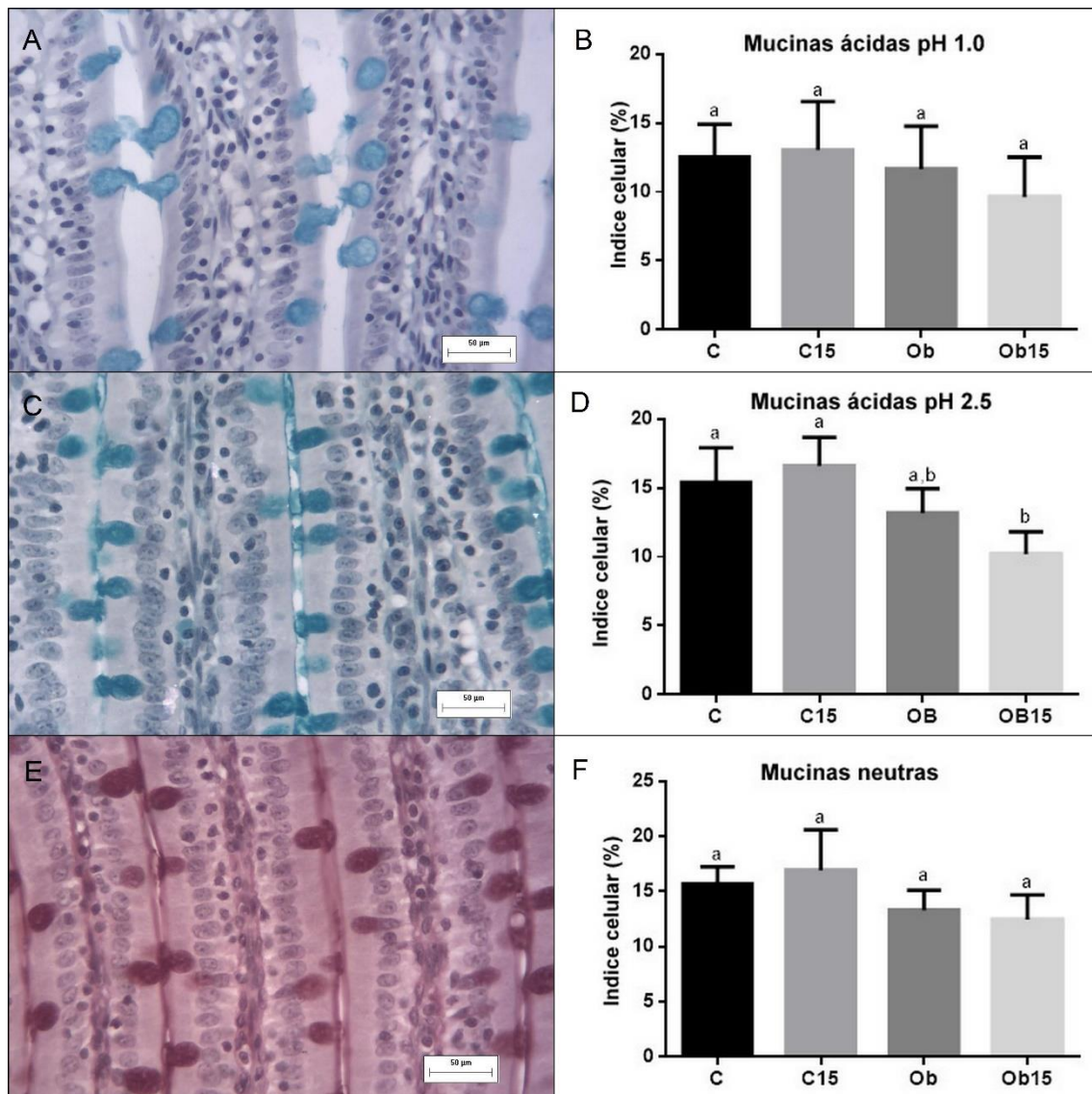
- 962 25. Soares A, Beraldi EJ, Ferreira PEB, Bazotte RB, Buttow NC. Intestinal and neuronal  
963 myenteric adaptations in the small intestine induced by a high-fat diet in mice. *BMC*  
964 *Gastroenterol* 2015;15(1): 3. DOI: 10.1186/s12876-015-0228-z  
965
- 966 26. Lee JC, Lee HY, Kim TK, Kim MS, Park YM, Kim J et al. Obesogenic diet-induced  
967 gut barrier dysfunction and pathobiont expansion aggravate experimental colitis. *PloS*  
968 *One* 2017;12(11): e0187515. DOI: 10.1371/journal.pone.0187515  
969
- 970 27. Truter D, Strijdom H, Everson F, Kotzé SH. Mucin secreting cells in the stomach and  
971 colon are altered by combination antiretroviral treatment in an obese rat model. *Acta*  
972 *Histochem*, 2017;119(2): 122-128. DOI 10.1016/j.acthis.2016.11.014  
973
- 974 28. Gershon MD, Tack J. The serotonin signaling system: from basic understanding to  
975 drug development for functional GI disorders. *Gastroenterology* 2007;132(1): 397-  
976 414. DOI: 10.1097/MED  
977
- 978 29. Linden DR, Foley KF, McQuoid C, Simpson J, Sharkey KA, Mawe GM. Serotonin  
979 transporter function and expression are reduced in mice with TNBS-induced colitis.  
980 *Neurogastroenterol Motil* 2005;17(4): 565-574. DOI: 10.1111/j.1365-  
981 2982.2005.00673.x  
982
- 983 30. Fukumoto S, Tatewaki M, Yamada T, Fujimiya M, Mantyh C, Voss M, et al. Short-  
984 chain fatty acids stimulate colonic transit via intraluminal 5-HT release in rats. *Am J*  
985 *Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003;284(5): R1269-R1276. DOI:  
986 0.1152/ajpregu.00442.2002  
987
- 988 31. Schoffen JPF, Rampazzo APS, Cirilo CP, Zapater MCU, Vicentini FA, Comar JF, et  
989 al. Food restriction enhances oxidative status in aging rats with neuroprotective  
990 effects on myenteric neuron populations in the proximal colon. *Exp Gerontol*  
991 2014;51: 54-64. DOI: 10.1590/0001-3765201420140163  
992
- 993 32. Oshima SI, Fujimura M, Fukimiya M. Changes in number of serotonin-containing  
994 cells and serotonin levels in the intestinal mucosa of rats with colitis induced by  
995 dextran sodium sulfate. *Histochem Cell Biol* 1999;112(4): 257-263.  
996
- 997 33. Ramsay DB, Stephen S, Borum M, Voltaggio L, Doman DB. Mast cells in  
998 gastrointestinal disease. *Gastroenterol Hepatol* 2010;6(12): 772-777.  
999
- 1000 34. Groschwitz KR, Hogan SP. Intestinal barrier function: molecular regulation and  
1001 disease pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124(1): 3-20. DOI:  
1002 10.1016/j.jaci.2009.05.038  
1003
- 1004 35. Lima DC, Silveira SA, Haibara AS, Coimbra CC. The enhanced hyperglycemic  
1005 response to hemorrhage hypotension in obese rats is related to an impaired baroreflex.  
1006 *Metab Brain Dis* 2008;23(4): 361-373. DOI: 10.1007/s11011-008-9101-x  
1007
- 1008 36. Abu-Elsaad N, El-Karef A. The falconoid luteolin mitigates the myocardial  
1009 inflammatory response induced by high-carbohydrate/high-fat diet in wistar rats.  
1010 *Inflammation* 2018;41(1): 221-231. DOI: 10.1007/s10753-017-0680-8  
1011

- 1012 37. Obici S, Tavoni TM, Barrena HC, Curi R, Bazotte RB. Time sequence of the  
1013 intensification of the liver glucose production induced by high-fat diet in mice. *Cell*  
1014 *Biochem Funct* 2012;30(4): 335-339. DOI: 10.1002/cbf.2809  
1015
- 1016 38. Zhi C, Huang Y, Qi W, Shen J, Tan J, Hu H, Zhang D. Expression of microRNAs  
1017 differed in the omental adipose tissue of obese rats. *Int J Clin Exp Med* 2015;8(4):  
1018 6601.  
1019
- 1020 39. Almeida FN, Salgueiro-Paradigoria CL, Franzói-de-Moraes SM, Nachbar RT,  
1021 Chimin P, Natali MRM. Aerobic physical training after weaning improves liver  
1022 histological and metabolic characteristics of diet-induced obese rats. *Sci Sports*  
1023 2013;28(2): e19-e27. DOI: 10.1016/j.scispo.2012.06.003  
1024
- 1025 40. Almeida FN, Andrade ML, Moraes SMF, Chimin P, Almeida KN, Peralta RM, et al.  
1026 Obese adult phenotype: Adaptations of small intestine to cafeteria diet and aerobic  
1027 physical training after weaning. *Science Sports* 2014;29(1): 20-26. DOI:  
1028 10.1016/j.scispo.2013.04.004  
1029
- 1030 41. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica*. 12ed. Rio de Janeiro: Guanabara  
1031 Koogan; 2013.  
1032
- 1033 42. Gartner LP, Hiatt JL. *Tratado de Histologia em Cores*. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara  
1034 Koogan; 2003.  
1035
- 1036 43. Pluske JR, Hampson DJ, Williams IH. Factors influencing the structure and function  
1037 of the small intestine in the weaned pig: a review. *Livestock production science*  
1038 1997;51(1): 215-236. DOI: 10.1016/S0301-6226(97)00057-2  
1039
- 1040 44. Bischoff SC, Barbara G, Buurman W, Ockhuizen T, Schulzke JD, Serino M.  
1041 Intestinal permeability—a new target for disease prevention and therapy. *BMC*  
1042 *Gastroenterol* 2014;14(1): 189. DOI: 10.1186/s12876-014-0189-7  
1043
- 1044 45. Khan J. Diet, Obesity and Intestinal Barrier. *J Obes* 2017;1:1.  
1045
- 1046 46. Abidin AAZ, Omar E, Islam MN, Khan J. High fat diet alters the expression. Of M  
1047 cell and caludin 4 in the pleyes's paches of rats. *Am J Clin Exp Med* 2015;3(5): 283-  
1048 287. DOI: 10.11648/j.ajcem.20150305.25.  
1049
- 1050 47. Deplancke B, Gaskins HR. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and  
1051 the intestinal mucus layer. *Am J Clin Nutr* 2001;73(6): 1131S-1141S. DOI:  
1052 10.1093/ajcn/73.6.1131S  
1053
- 1054 48. Shiraishi CS, Azevedo JFD, Silva AVD, Sant'Ana DDMG, Araújo EJDA.  
1055 Morphometric analysis of the intestinal wall and the dynamic of mucins secreted in  
1056 the chicken ileum infected with *Toxoplasma gondii*. *Ciência Rural* 2009;39(7): 2146-  
1057 2153. DOI: 10.1590/S0103-84782009000700030  
1058
- 1059 49. Sharma R, Schumacher U. Morphometric analysis of intestinal mucins under different  
1060 dietary conditions and gut flora in rats. *Dig Dis Sci* 1995;40(12): 2532-2539.  
1061

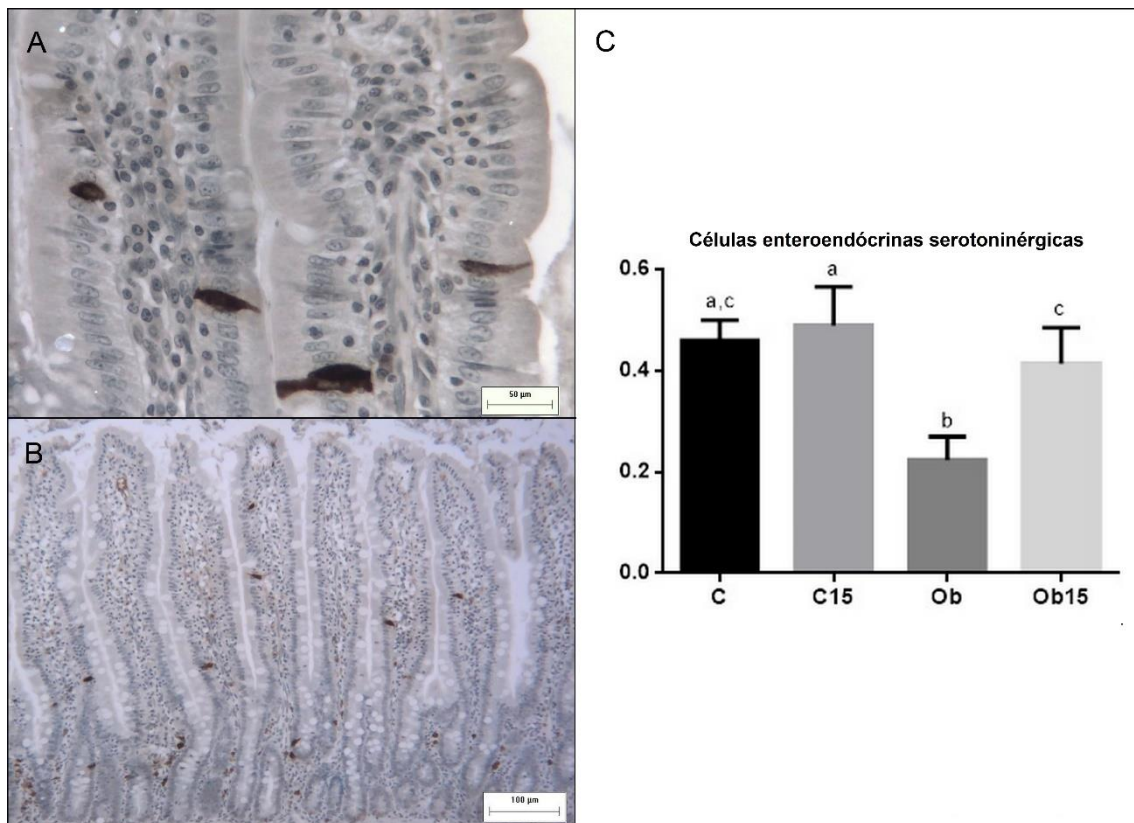
- 1062 50. Scoaris CR, Rizo GV, Roldi LP, et al. Effects of cafeteria diet on the jejunum in  
1063 sedentary and physically trained rats. *Nutrition*. 2010;26: 312-320. DOI:  
1064 doi.org/10.1016/j.nut.2009.04.012  
1065
- 1066 51. Hildebrandt MA, Hoffman C, Sherrill-Mix SA, et al. High fat diet determines the  
1067 composition of the murine gut microbiome independently of obesity. *Gastroenterology*.  
1068 2009;137:1716–1724. DOI: 10.1053/j.gastro.2009.08.042  
1069
- 1070 52. Bischoff SC, Mailer R, Pabst O, Weier G, Sedlik W, Li Z, Chen JJ, Murphy DL  
1071 Gershon MD: Role of serotonin in intestinal inflammation: knockout of serotonin  
1072 reuptake transporter exacerbates 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid colitis in mice.  
1073 *Am J Physiol* 2009;296(3): G685–G695. DOI: 10.1152/ajpgi.90685.2008  
1074
- 1075 53. Bischoff SC: Physiological and pathophysiological functions of intestinal mast cells.  
1076 *Semin Immunopathol* 2009;31: 185–205. DOI: 10.1007/s00281-009-0165-4  
1077
- 1078 54. Magro F, Vieira-Coelho MA, Fraga S, Serrao MP, Veloso FT, Ribeiro T, et al.  
1079 Impaired synthesis or cellular storage of norepinephrine, dopamine, and 5-  
1080 hydroxytryptamine in human inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 2002;47(1):  
1081 216-224.  
1082
- 1083 55. Wang SH, Dong L, Luo JY, Gong J, Li L, Lu XL, et al. Decreased expression of  
1084 serotonin in the jejunum and increased numbers of mast cells in the terminal ileum in  
1085 patients with irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol* 2007;13(45): 6041-  
1086 6047. DOI 10.3748/wjg.v13.45.6041  
1087
- 1088 56. Haub S, Ritze Y, Ladel I, Saum K, Hubert A, Spruss A, et al. Serotonin receptor type  
1089 3 antagonists improve obesity-associated fatty liver disease in mice. *J Pharmacol Exp*  
1090 *Ther* 2011;339(3): 790-798. DOI: 10.1124/jpet.111.181834  
1091
- 1092 57. Savastano DM, Covasa M. Intestinal nutrients elicit satiation through concomitant  
1093 activation of CCK 1 and 5-HT 3 receptors. *Physiol Behav* 2007;92(3): 434-442. DOI:  
1094 10.1016/j.physbeh.2007.04.017  
1095
- 1096 58. Savastano DM, Carelle M, Covasa M. Serotonin-type 3 receptors mediate intestinal  
1097 Polycose-and glucose-induced suppression of intake. *Am J Physiol Regul Integr*  
1098 *Comp Physiol* 2005;288(6): R1499-R1508. DOI: 10.1152/ajpregu.00745.2004  
1099
- 1100 59. Ayaz A, Akyol A, Inan-Eroglu E, Cetin AK, Samur G, Akbiyik F. Chia seed (*Salvia*  
1101 *hispanica* L.) added yogurt reduces short-term food intake and increases satiety:  
1102 randomised controlled trial. *Nutr Res Pract* 2017;11(5): 412-418. DOI:  
1103 10.4162/nrp.2017.11.5.412  
1104
- 1105 60. Olivos-Lugo BL; Valdivia-López MÁ; Tecante A. Thermal and physicochemical  
1106 properties and nutritional value of the protein fraction of mexican chia seed (*salvia*  
1107 *hispanica* l.). *food sci technol int. oxford* 2010;16(1): 89-96. DOI:  
1108 10.1177/1082013209353087  
1109

- 1110 61. Ayerza R, Coates W. Dietary levels of chia: influence on hen weight, egg production  
1111 and sensory quality, for two strains of hens. *Br Poult Sci* 2002;43(2): 283-290. DOI:  
1112 10.1080/00071660120121517  
1113
- 1114 62. Ramsay DB, Stephen S, Borum M, Voltaggio L, Doman DB. Mast cells in  
1115 gastrointestinal disease. *Gastroenterology and hepatology* 2010;6(12): 772-777.  
1116
- 1117 63. Nogueira LT, Costa DV, Gomes AS, Martins CS, Silva AM, Coelho-Aguiar JM, et  
1118 al. The involvement of mast cells in the irinotecan-induced enteric neurons loss and  
1119 reactive gliosis. *J Neuroinflammation* 2017;14(1): 79. DOI 10.1186/s12974-017-  
1120 0854-1  
1121
- 1122 64. Yu Y, Daly DM, Adam IJ, Kitsanta P, Hill CJ, Wild J, et al. Interplay between mast  
1123 cells, enterochromaffin cells, and sensory signaling in the aging human bowel.  
1124 *Neurogastroenterol Motil* 2016;28(10): 1465-1479. DOI: 10.1111/nmo.12842  
1125
- 1126 65. Lee CY. The effect of high-fat diet-induced pathophysiological changes in the gut on  
1127 obesity: what should be the ideal treatment?. *Clin Transl Gastroenterol* 2013;4(7):  
1128 e39. DOI:10.1038/ctg.2013.11  
1129
- 1130 66. Brandt EB, Strait RT, Hershko D, Wang Q, Muntel EE, Scribner TA, et al. Mast cells  
1131 are required for experimental oral allergen-induced diarrhea. *J Clin Invest*  
1132 2003;112(11): 1666-1677. DOI 10.1172/JCI19785  
1133
- 1134 67. Bischoff SC, Wedemeyer J, Herrmann A, Meier PN, Trautwein C, Cetin Y, et al.  
1135 Quantitative assessment of intestinal eosinophils and mast cells in inflammatory  
1136 bowel disease. *Histopathology* 1996;28(1): 1-13. DOI: 10.1046/j.1365-  
1137 2559.1996.262309.x  
1138
- 1139 68. Stoyanova II, Gulubova MV. Mast cells and inflammatory mediators in chronic  
1140 ulcerative colitis. *Acta Histochem* 2002;104(2): 185-192. DOI: 10.1078/0065-1281-  
1141 00641  
1142
- 1143 69. Santi-Rampazzo APD, Schoffen JPF, Cirilo CP, Zapater MCVU, Vicentini FA,  
1144 Soares AA, et al. Aqueous extract of *Agaricus blazei* Murrill prevents age-related  
1145 changes in the myenteric plexus of the jejunum in rats. *Evid Based Complement*  
1146 *Alternat Med*, 2015;2015: 1-13. DOI: 10.1155/2015/287153

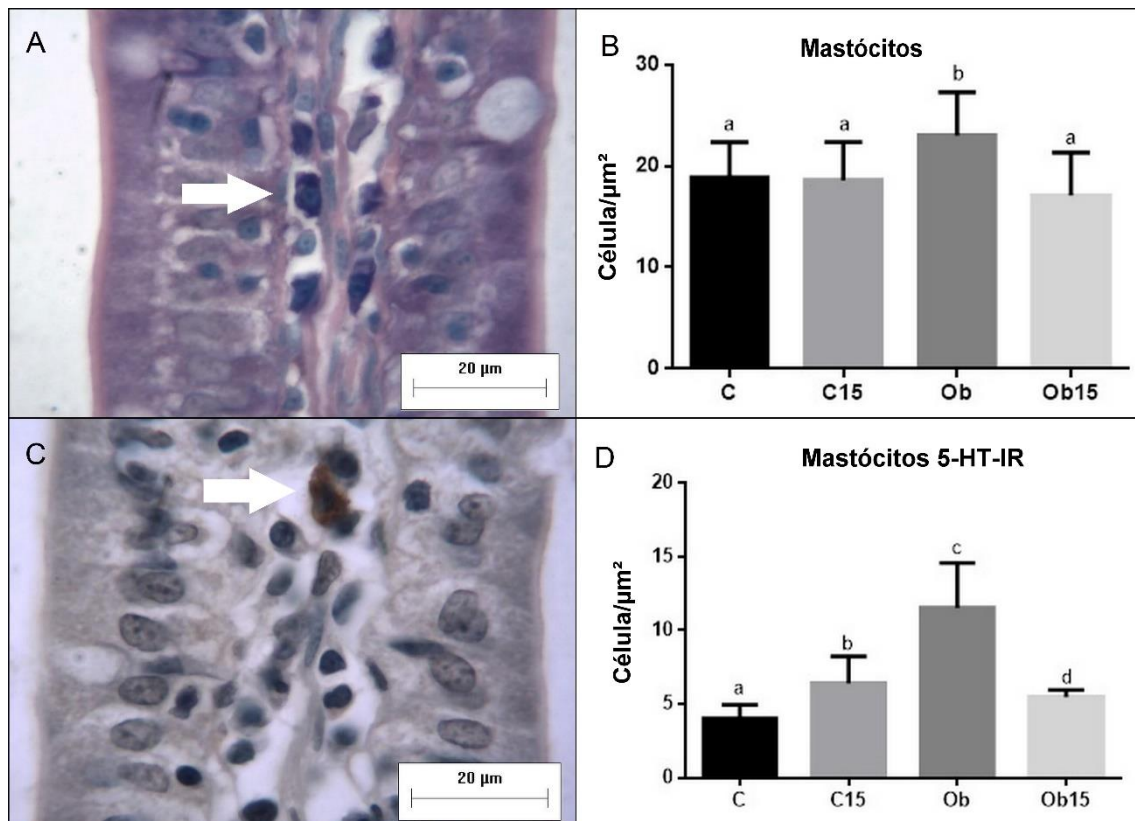




**Figura 1:** Mucosa jejunal de ratos. Histoquímica de células produtoras de mucinas ácidas AB<sup>+</sup> pH 1,0 em (A) e pH 2,5 em (C) e mucinas neutras PAS<sup>+</sup> em (E). Aumento de 40x. Em B, D e F, número médio de células caliciformes nos diferentes grupos: controle (C); controle tratado com farinha de chia (C15); obesos induzidos por dieta RCS\* (Ob); obesos induzidos por dieta RCS\* e tratados com farinha de chia (Ob15). One-Way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey, letras distintas indicam diferença significativa  $p < 0,05$ .  $n=5$ . \*RCS: dieta rica em carboidratos simples.



**Figura 2:** Mucosa jejunal de ratos. Imunoperoxidase para células enteroendócrinas serotoninérgicas. Aumento de 10x em (A) e 40x em (B). Em (C) número médio de células enteroendócrinas serotoninérgicas. Grupos: controle (C), controle tratado com farinha de chia (C15), obesos induzido por dieta RCS\* (Ob) e obesos induzido por dieta RCS\* e tratados com farinha de chia (Ob15). One-Way ANOVA e pós-teste de Tukey. Letras distintas indicam diferença significativa  $p < 0,05$  ( $n=5$ ). \*RCS: dieta rica em carboidratos simples.



**Figura 3:** Lâmina própria da mucosa jejunal de ratos. Em (A) Histoquímica com Azul de Toluidina para mastócitos (seta), em (C) Imunoperoxidase para mastócitos 5-HT-IR (seta). Aumento de 100x. Em (B) número médio de mastócitos e em (D) número médio de mastócitos 5-HT-IR. Grupos: controle (C), controle tratado com farinha de chia (C15), obesos induzido por dieta RCS\* (Ob) e obesos induzido por dieta RCS\* e tratados com farinha de chia (Ob15). One-Way ANOVA e pós-teste de Tukey. Letras distintas indicam diferença significativa  $p < 0,05$  ( $n=5$ ). \*RCS: dieta rica em carboidratos simples.

## Submission Guidelines

### About the Journal

PLOS Biology publishes original research articles of outstanding scientific significance. We will consider manuscripts of any length; we encourage the submission of both substantial full-length bodies of work and “Short Reports” that document novel biological findings that might be based on a more limited range of experiments. The key criteria are that the work clearly demonstrates its novelty, its importance to a particular field as well as its interest to those outside that discipline, and conclusions that are justified by the study.

PLOS Biology also considers outstanding methods and resource papers. We will consider manuscripts that report novel methods or improvements to current methodologies that significantly out-perform the state-of-the-art or that show the potential to address, for the first time, a pressing biological question. The reported method should be thoroughly validated, and while presenting new biological insights is encouraged, this is not a requirement for consideration. Resource papers should provide an exceptionally valuable tool for the community that could spur future research.

The journal also considers primary research that would be of interest to the clinical and pre-clinical research communities. To be appropriate for PLOS Biology, translational biological research should demonstrate the potential to advance our insights into the understanding, detection, diagnosis, prevention, and/or treatment of human disease.

In addition to studies offering biological insight, the journal also features data-driven meta-research articles of broad relevance to the biological sciences. The meta-research section addresses issues related to the design, methods, reporting, verification, and evaluation of research. It also encompasses research into the systems that evaluate and reward individual scientists and institutions. We welcome both exploratory and confirmatory research that has the potential to drive change in research and evaluation practices in the life sciences and beyond. This includes experimental, observational, modeling, and meta-analytic research. Themes include, but are not limited to, transparency, established and novel methodological standards, sources of bias (conflicts of interest, selection, inflation, funding, etc.), data sharing, evaluation metrics, assessment, reward, and funding structures.

The writing style should be concise and accessible. Editors will make suggestions for how to achieve this, as well as suggestions for cuts or additions that could be made to the article to strengthen the argument. Our aim is to make the editorial process rigorous and consistent, but not intrusive or overbearing. Authors are encouraged to use their own voice and to decide how best to present their ideas, results, and conclusions.

### Style and Format

**File format:** Submit the manuscript file in DOC, DOCX, or PDF format. Your file should not be locked or protected. If you have written your manuscript in LaTeX, please submit as a PDF. Read the LaTeX guidelines.

**Length:** Manuscripts can be any length. There are no restrictions on word count, number of figures, or amount of supporting information.

We encourage you to present and discuss your findings concisely.

**Font:** Use a standard font size and any standard font, except for the font named “Symbol”. To add symbols to the manuscript, use the Insert → Symbol function in your word processor or paste in the appropriate Unicode character.

**Headings:** Limit manuscript sections and sub-sections to 3 heading levels. Make sure heading levels are clearly indicated in the manuscript text.

**Layout and spacing:** Manuscript text should be double-spaced. Do not format text in multiple columns.

**Page and line numbers:** Include page numbers and line numbers in the manuscript file. Use continuous line numbers (do not restart the numbering on each page).

**Footnotes:** Footnotes are not permitted. If your manuscript contains footnotes, move the information into the main text or the reference list, depending on the content.

**Language:** Manuscripts must be submitted in English. You may submit translations of the manuscript or abstract as supporting information. Read the supporting information guidelines.

**Abbreviations:** Define abbreviations upon first appearance in the text.

Do not use non-standard abbreviations unless they appear at least three times in the text. List all non-standard abbreviations (with definitions) in alphabetical order in a separate section at the beginning of the manuscript. Keep abbreviations to a minimum.

**Reference style:** PLOS uses “Vancouver” style, as outlined in the ICMJE sample references.

**Equations:**

We recommend using MathType for display and inline equations, as it will provide the most reliable outcome. If this is not possible, Equation Editor or Microsoft's Insert→Equation function is acceptable. Please do not embed equations as images.

Avoid using MathType, Equation Editor, or the Insert→Equation function to insert single variables (e.g., “ $a^2 + b^2 = c^2$ ”), Greek or other symbols (e.g.,  $\beta$ ,  $\Delta$ , or ' [prime]), or mathematical operators (e.g.,  $x$ ,  $\geq$ , or  $\pm$ ) in running text. Wherever possible, insert single symbols as normal text with the correct Unicode (hex) values.

Do not use MathType, Equation Editor, or the Insert→Equation function for only a portion of an equation. Rather, ensure that the entire equation is included. Equations should not contain a mix of different equation tools. Avoid “hybrid” inline or display equations, in which part is text and part is MathType, or part is MathType and part is Equation Editor.

**Nomenclature:** Use correct and established nomenclature wherever possible.

**Units of measurement:** Use SI units. If you do not use these exclusively, provide the SI value in parentheses after each value. Read more about SI units.

**Drugs:** Provide the Recommended International Non-Proprietary Name (rINN).

**Species names:** Write in italics (e.g., *Homo sapiens*). Write out in full the genus and species, both in the title of the manuscript and at the first mention of an organism in a paper. After first mention, the first letter of the genus name followed by the full species name may be used (e.g., *H. sapiens*).

**Genes, mutations, genotypes, and alleles:** Write in italics. Use the recommended name by consulting the appropriate genetic nomenclature database (e.g., HUGO for human genes). It is sometimes advisable to indicate the synonyms for the gene the first time it appears

in the text. Gene prefixes such as those used for oncogenes or cellular localization should be shown in roman typeface (e.g., v-fes, c-MYC).

Allergens: The systematic allergen nomenclature of the World Health Organization/International Union of Immunological Societies (WHO/IUIS) Allergen Nomenclature Sub-committee should be used for manuscripts that include the description or use of allergenic proteins. For manuscripts describing new allergens, the systematic name of the allergen should be approved by the WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-committee prior to manuscript publication. Examples of the systematic allergen nomenclature can be found at the WHO/IUIS Allergen Nomenclature site.

### Manuscript Organization

Most manuscripts should be organized as follows. Instructions for each element appear below.

- Title page with author list and author affiliations
- Abstract
- Introduction
- Results
- Discussion
- Materials and Methods
- Acknowledgments
- References

### Other elements

- Figure files: Upload separately. Do not put figure files in the manuscript body.
- Figure captions: Insert immediately in the manuscript text after the first paragraph in which the figure is cited.
- Tables and boxes: Insert immediately in the manuscript text after the first paragraph in which the table or box is cited.
- Supporting Information files: Upload separately.
- Supporting Information captions: List captions at the end of the manuscript file.

### Parts of a Submission

Title page: Include a title page as the first page of the manuscript file with the title, authors, and affiliations.

Include a full title and a short title for the manuscript using the following format:

- Titles should be written in sentence case (only the first word of the text, proper nouns, and genus names are capitalized).
- Avoid specialist abbreviations if possible.
- For clinical trials, systematic reviews, or meta-analyses, the subtitle should include the study design.

| Title              | Length         | Guidelines  | Examples   |
|--------------------|----------------|---|--|
| <b>Full title</b>  | 250 characters | Specific, descriptive, concise, and comprehensible to readers outside the field | Impact of cigarette smoke exposure on innate immunity: A <i>Caenorhabditis elegans</i> model<br>Solar drinking water disinfection (SODIS) to reduce childhood diarrhoea in rural Bolivia: A cluster-randomized, controlled trial |
| <b>Short title</b> | 70 characters  | State the topic of the study  | Cigarette smoke exposure and innate immunity<br>SODIS and childhood diarrhoea  |

## Authorship requirements

All authors must meet the criteria for authorship as outlined in the authorship policy. Those who contributed to the work but do not meet the criteria for authorship can be mentioned in the Acknowledgments.

The corresponding author must provide an ORCID iD at the time of submission by entering it in the user profile in the submission system.

### Author names and affiliations

During initial submission, enter author names on the title page of the manuscript. If your manuscript is selected for peer review, you will also add author details to the submission system.

On the title page, write author names in the following order:

- ✓ First name (or initials, if used)
- ✓ Middle name (or initials, if used)
- ✓ Last name (surname, family name)

Each author on the list must have an affiliation. The affiliation includes department, university, or organizational affiliation and its location, including city, state/province (if applicable), and country. Authors have the option to include a current address in addition to the address of their affiliation at the time of the study. The current address should be listed in the byline and clearly labeled “current address.” At a minimum, the address must include the author’s current institution, city, and country.

If an author has multiple affiliations, enter their full list of affiliations on the title page. In the submission system, enter only the preferred or primary affiliation. Author affiliations will be listed in the typeset PDF article in the same order that the authors are listed in the submission.

Author names will be published exactly as they appear on the manuscript title page. Please double-check the information carefully to make sure it is correct.

### Corresponding authorship

Designate at least one corresponding author on the title page. Include an email address for each corresponding author listed on the title page of the manuscript.

We do not restrict the number of corresponding authors that may be listed on the article in the event of publication. Whoever is designated as a corresponding author on the title page of the manuscript file will be listed as such upon publication.

You can only designate one corresponding author that will communicate with the journal about the manuscript during editorial consideration. The submitting author is automatically designated the corresponding author in the system upon submission. If you need to change the corresponding author during editorial consideration, email the journal.

### Abstract

The Abstract comes after the title page in the manuscript file.

The Abstract succinctly introduces the manuscript. It should mention the techniques used without going into methodological detail and mention the most important results.

The Abstract is conceptually divided into the following three sections: Background, Methodology/Principal Findings, and Conclusions/Significance. However, the Abstract should be written as a single paragraph without these headers.

Do not include any citations in the Abstract. Avoid specialist abbreviations.

### Introduction



The Introduction should put the focus of the manuscript into a broader context. As you compose the Introduction, think of readers who are not experts in this field. Include a brief review of the key literature. If there are relevant controversies or disagreements in the field, they should be mentioned so that a non-expert reader can delve into these issues further. The Introduction should conclude with a brief statement of the overall aim of the reported research and a comment about whether that aim was achieved.

#### Priority claims

Manuscripts should not include priority claims. For example, “the first demonstration of this” should be changed to “the first demonstration, to our knowledge, of this.”

#### Results

The Results section should provide details of all of the experiments that are required to support the conclusions of the paper, including information on the number of replicates (if relevant to ensure replicability). There is no specific word limit for this section, but details of experiments that are peripheral to the main thrust of the article and that detract from the focus of the article should not be included. The section may be divided into subsections, each with a concise subheading. The Results section should be written in past tense.

PLOS journals require authors to make all data underlying the findings described in their manuscript fully available without restriction, with rare exception.

Large data sets, including raw data, may be deposited in an appropriate public repository. See our list of recommended repositories.

For smaller data sets and certain data types, authors may provide their data within supporting information files accompanying the manuscript. Authors should take care to maximize the accessibility and reusability of the data by selecting a file format from which data can be efficiently extracted (for example, spreadsheets or flat files should be provided rather than PDFs when providing tabulated data).

For more information on how best to provide data, read our policy on data availability. PLOS does not accept references to “data not shown.”

#### Discussion

The Discussion should spell out the major conclusions and interpretations of the work including some explanation on the significance of these conclusions. How do the conclusions affect the existing assumptions and models in the field? How can future research build on these observations? What are the key experiments that must be done? The Discussion should be concise and tightly argued. If warranted, the Results and Discussion may be combined into one section.

#### Materials and Methods

The Materials and Methods should provide enough detail for reproduction of the findings. Submit detailed protocols for newer or less established methods. Well-established protocols may simply be referenced.

Details of algorithms and protocol documents for clinical trials, observational studies, and other non-laboratory investigations may be uploaded as supporting information. These are not included in the typeset manuscript, but are downloadable and fully searchable from the HTML version of the article. Read the supporting information guidelines for formatting instructions.

We recommend and encourage you to deposit laboratory protocols in protocols.io, where protocols can be assigned their own persistent digital object identifiers (DOIs).



## Acknowledgments

Those who contributed to the work but do not meet our authorship criteria should be listed in the Acknowledgments with a description of the contribution.

Authors are responsible for ensuring that anyone named in the Acknowledgments agrees to be named.

Do not include funding sources in the Acknowledgments or anywhere else in the manuscript file. Funding information should only be entered in the financial disclosure section of the submission system.

## References

Any and all available works can be cited in the reference list. Acceptable sources include:

- Published or accepted manuscripts
- Manuscripts on preprint servers, providing the manuscript has a citable DOI or arXiv URL. Read the Preprint Policy.

Do not cite the following sources in the reference list:

- Unavailable and unpublished work, including manuscripts that have been submitted but not yet accepted (e.g., “unpublished work,” “data not shown”). Instead, include those data as supplementary material or deposit the data in a publicly available database.
- Personal communications (these should be supported by a letter from the relevant authors but not included in the reference list)

References are listed at the end of the manuscript and numbered in the order that they appear in the text. In the text, cite the reference number in square brackets (e.g., “We used the techniques developed by our colleagues [19] to analyze the data”). PLOS uses the numbered citation (citation-sequence) method and first six authors, et al.

Do not include citations in abstracts or author summaries.

Make sure the parts of the manuscript are in the correct order before ordering the citations.

## Formatting references

Because all references will be linked electronically as much as possible to the papers they cite, proper formatting of the references is crucial.

PLOS uses the reference style outlined by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), also referred to as the “Vancouver” style. Example formats are listed below. Additional examples are in the ICMJE sample references.

A reference management tool, EndNote, offers a current style file that can assist you with the formatting of your references. If you have problems with any reference management program, please contact the source company's technical support.

Journal name abbreviations should be those found in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) databases.

| Source             | Format  |
|--------------------|---|
| Published articles | Hou WR, Hou YL, Wu GF, Song Y, Su XL, Sun B, et al. cDNA, genomic sequence cloning and overexpression of ribosomal protein gene L9 (rpL9) of the giant panda ( <i>Ailuropoda melanoleuca</i> ). Genet Mol Res. 2011;10: 1576-1588.<br>Devaraju P, Gulati R, Antony PT, Mithun CB, Negi VS. Susceptibility to SLE in South Indian Tamils may be influenced by genetic selection pressure on TLR2 and TLR9 genes. |

|   |   |
|---|---|
|   | Mol Immunol. 2014 Nov 22. pii: S0161-5890(14)00313-7. doi: 10.1016/j.molimm.2014.11.005.<br><br><i>Note: A DOI number for the full-text article is acceptable as an alternative to or in addition to traditional volume and page numbers. When providing a DOI, adhere to the format in the example above with both the label and full DOI included at the end of the reference (doi: 10.1016/j.molimm.2014.11.005). Do not provide a shortened DOI or the URL.</i> |
| <b>Accepted, unpublished articles</b>                                     | Same as published articles, but substitute “Forthcoming” for page numbers or DOI.   |
| <b>Online articles</b>  | Huynen MMTE, Martens P, Hilderlink HBM. The health impacts of globalisation: a conceptual framework. Global Health. 2005;1: 14. Available from: <a href="http://www.globalizationandhealth.com/content/1/1/14">http://www.globalizationandhealth.com/content/1/1/14</a>   |
| <b>Books</b>  | Bates B. Bargaining for life: A social history of tuberculosis. 1st ed. Philadelphia: University of Pennsylvania Press; 1992.   |
| <b>Book chapters</b>  | Hansen B. New York City epidemics and history for the public. In: Harden VA, Risse GB, editors. AIDS and the historian. Bethesda: National Institutes of Health; 1991. pp. 21-28.   |
| <b>Deposited articles (preprints, e-prints, or arXiv)</b>                 | Krick T, Shub DA, Verstraete N, Ferreira DU, Alonso LG, Shub M, et al. Amino acid metabolism conflicts with protein diversity; 1991. Preprint. Available from: arXiv:1403.3301v1. Cited 17 March 2014.  |
| <b>Published media (print or online newspapers and magazine articles)</b> | Fountain H. For Already Vulnerable Penguins, Study Finds Climate Change Is Another Danger. The New York Times. 29 Jan 2014. Available from: <a href="http://www.nytimes.com/2014/01/30/science/earth/climate-change-taking-toll-on-penguins-study-finds.html">http://www.nytimes.com/2014/01/30/science/earth/climate-change-taking-toll-on-penguins-study-finds.html</a> Cited 17 March 2014.  |
| <b>New media (blogs, web sites, or other written works)</b>               | Allen L. Announcing PLOS Blogs. 2010 Sep 1 [cited 17 March 2014]. In: PLOS Blogs [Internet]. San Francisco: PLOS 2006 - . [about 2 screens]. Available from: <a href="http://blogs.plos.org/plos/2010/09/announcing-plos-blogs/">http://blogs.plos.org/plos/2010/09/announcing-plos-blogs/</a> .  |
| <b>Masters' theses or doctoral dissertations</b>                          | Wells A. Exploring the development of the independent, electronic, scholarly journal. M.Sc. Thesis, The University of Sheffield. 1999. Available from: <a href="http://cuminad.scix.net/cgi-bin/works/Show?2e09">http://cuminad.scix.net/cgi-bin/works/Show?2e09</a>  |
| <b>Databases and repositories (Figshare, arXiv)</b>                       | Roberts SB. QPX Genome Browser Feature Tracks; 2013 [cited 2013 Oct 5]. Database: figshare [Internet]. Available from: <a href="http://figshare.com/articles/QPX_Genome_Browser_Feature_Tracks/701214">http://figshare.com/articles/QPX_Genome_Browser_Feature_Tracks/701214</a>  |
| <b>Multimedia (videos, movies, or TV shows)</b>                           | Hitchcock A, producer and director. Rear Window [Film]; 1954. Los Angeles: MGM.   |

### Supporting Information

Authors can submit essential supporting files and multimedia files that are auxiliary to the main content of the article. All Supporting Information will be subject to peer review. These files are published exactly as provided and are not copyedited.

List supporting information captions at the end of the manuscript file. Do not submit captions in a separate file.

Read the Supporting Information guidelines for further technical and formatting guidance.

### Figures

Prepare and upload each figure to the submission system as an individual file. Do not include figures in the main manuscript file.

Insert your figure captions in ascending numerical order after their citations in the manuscript.

Avoiding image manipulation

As part of our efforts to improve published figure quality, we routinely and thoroughly check all main and supporting figures for all papers editorially accepted for publication in PLOS Biology. In doing so, we not only ensure that all figure files meet our requirements for publication and are available to publish under our CC BY license, but also that we remain vigilant to image manipulation of photographic images.

Image files should not be manipulated or adjusted in any way that could lead to misinterpretation of the information present in the original image. For full details on best practices regarding your figures, read our figure guidelines.

If evidence is found of inappropriate manipulation, we reserve the right to ask for original data and, if that is not satisfactory, we may decide not to accept the manuscript, and may also contact the authors' institutions to ask them to assist with investigation.

In checking for manipulation, we may request higher resolution versions of your images, or the original images, so that we can efficiently and accurately check all figures.

If you ever need to email files to the journal office, our system has a 10 MB attachment limit, meaning that we will not receive any emails larger than this size. If your files are larger than 10 MB, please either send them one email at a time, or look into reducing the size of the files. If you are having problems sending us large files, please contact the journal office for details of how we can help you transfer your files.

#### Tables

Cite tables in ascending numeric order upon first appearance in the manuscript file.

Place each table in your manuscript file directly after the paragraph in which it is first cited (read order). Do not embed your tables as images or submit them in separate files.

Tables require a label (e.g., "Table 1") and brief descriptive title to be placed above the table. Place legends, footnotes, and other text below the table.

#### Data presentation in graphs

To better illustrate your results and to improve the reader's understanding and interpretation of your data, we discourage the use of bar graphs and line plots for continuous data, particularly for studies with small sample sizes ( $n \leq 9$  independent observations per group).

- We recommend that continuous data is presented in such a way that the reader can evaluate the distribution of the individual data points. Scatterplots, boxplots, and histograms are more informative than bar or line charts.
- If there is a particular reason that bar or line graphs are preferred, these must include inferential error bars: SD - standard deviation of the population, or CI - confidence intervals.
- Paired or non-independent data should be presented to include information about whether changes are consistent across individuals.
- Figures presenting small sample size data ( $n \leq 9$  independent observations per group) should show the full distribution of the data, as opposed to summary statistics.
- All numerical values used to generate graphs must be provided as per the [PLOS Data Availability policy](#).

Instructions for PLOS submissions with data deposited in an integration partner repository:

- Deposit data in the integrated repository of choice.
- Once deposition is final and complete, the repository will provide you with a dataset DOI (provisional) and private URL for reviewers to gain access to the

data. Insert these details into the Data Availability section of the submission system.

If you have any questions, please email us.

### Identifiers

As much as possible, please provide accession numbers or identifiers for all entities such as genes, proteins, mutants, diseases, etc., for which there is an entry in a public database, for example:

- Ensembl
- Entrez Gene
- FlyBase
- InterPro
- Mouse Genome Database (MGD)
- Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)
- PubChem

Identifiers should be provided in parentheses after the entity on first use.

### Research Resource Identifiers

Research Resource Identifiers are unique Resource Identifiers (RRIDs) for citing resources used in the research. We encourage authors to use RRIDs within the text of their papers to identify their model organisms, antibodies, or tools.

PLOS is a part of the Research Resource Identification Initiative (#RII), a cross-publisher effort to enable effective tracking of the utilization of particular research resources across all biomedical literature and promote reproducibility in science. RRIDs are found via the RRID portal.

If an RRID does not exist, you may create a new one as needed through the RRID Portal. The Research Resource Citation guidelines provide instructions on how to cite the resource in the manuscript.

### Small and macromolecule crystal data

Manuscripts reporting new and unpublished three-dimensional structures must include sufficient supporting data and detailed descriptions of the methodologies used to allow the reproduction and validation of the structures. All novel structures must have been deposited in a community endorsed database prior to submission (please see our list of recommended repositories).

#### Small molecule single crystal data

Authors reporting X-Ray crystallographic structures of small organic, metal-organic, and inorganic molecules must deposit their data with the Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC), the Inorganic Crystal Structure Database (ICSD), or similar community databases providing a recognized validation functionality. Authors are also required to include the relevant structure reference numbers within the main text (e.g. the CCDC ID number), as well as the crystallographic information files (.cif format) as Supplementary Information, along with the checkCIF validation reports that can be obtained via the International Union of Crystallography (IUCr).

#### Macromolecular structures

Authors reporting novel macromolecular structures must have deposited their data prior to submission with the Worldwide Protein Data Bank (wwPDB), the Biological Magnetic Resonance Data Bank (BMRB), the Electron Microscopy Data Bank (EMDB), or other community databases providing a recognized validation functionality. Authors must

include the structure reference numbers within the main text and submit as Supplementary Information the official validation reports from these databases.

#### Striking image

You can choose to upload a “Striking Image” that we may use to represent your article online in places such as the journal homepage. All striking image files that are submitted are also eligible to be chosen as the monthly Issue Image, which is chosen by the editorial staff.

The striking image must visually represent the article in a striking and eye-catching way. This could be derived from a figure or supporting information file from the paper, i.e., a cropped portion of an image or the entire image. Alternatively, you may create or source an image which represents the article, as long as this image adheres to our CC BY license. Striking images should ideally be high resolution, eye-catching, single panel images, and should ideally avoid containing added details such as text, scale bars, and arrows.

Should your manuscript be accepted for publication, you will be asked to provide a caption describing the image and a full image credit that details who should be credited with the creation of the image. We are unable to use striking image files that do not include an accompanying caption and credit.

If no striking image is uploaded, the journal team will choose an appropriate image, which may be a figure from the submission or a separately sourced CC BY image.

#### Funding Disclosure

Declare any funding received for this study including details such as funder name, grant numbers, and the funder’s website in the submission system.

#### Competing Interests

In the submission system, declare on behalf of all authors whether there are any financial, personal, or professional interests that could be construed to have influenced the work.

Any relevant competing interests of authors must be available to editors and reviewers during the review process and will be stated in published articles.

#### Related Manuscripts

When submitting a manuscript, all authors are asked to indicate that they do not have a related or duplicate manuscript under consideration (or accepted) for publication elsewhere. If related work has been or will be submit elsewhere or is in press elsewhere, then a copy must be uploaded with the article submitted to PLOS. Reviewers will be asked to comment on the overlap between related submissions.

PLOS does support authors who wish to share their work early and receive feedback before formal peer review. Deposition of manuscripts with preprint servers does not impact consideration of the manuscript at any PLOS journal.