

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

WILLER BRUNO ANDRÉ SILVA

**QUANTIFICAÇÃO DE MASTÓCITOS NO TRATO DIGESTÓRIO DA
PROLE DE RATAS ALIMENTADAS COM RAÇÃO CONTENDO 40% DE
LIPÍDEOS**

UBERLÂNDIA

2020

WILLER BRUNO ANDRÉ SILVA

**QUANTIFICAÇÃO DE MASTÓCITOS NO TRATO DIGESTÓRIO DA
PROLE DE RATAS ALIMENTADAS COM RAÇÃO CONTENDO 40% DE
LIPÍDEOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina, pelo Curso de Graduação em Biomedicina da Universidade Federal de Uberlândia.

Área de Concentração: Fisiologia gastrointestinal.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Borges Bispo-da-Silva

UBERLANDIA
2020

WILLER BRUNO ANDRÉ SILVA

**QUANTIFICAÇÃO DE MASTÓCITOS NO TRATO DIGESTÓRIO DA
PROLE DE RATAS ALIMENTADAS COM RAÇÃO CONTENDO 40% DE
LIPÍDEOS**

Trabalho de conclusão de curso aprovado para a
obtenção do título de Bacharel em Ciências
Biomédicas, pelo Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade Federal de
Uberlândia (MG), pela banca examinadora
formada por:

Uberlândia, 15 de Dezembro de 2020.

Msc. Richarlisson Borges de Moraes
Escola Técnica em Saúde (ESTES) - UFU

Msc. Bruno Antônio Ferreira
Instituto de Biotecnologia (IBTEC) - UFU

Prof. Dr. Luiz Borges Bispo-da-Silva
Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) - UFU

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, causa primária de todas as coisas, por me conceder a benção da encarnação e reencarnação, pelos obstáculos que fizeram meu espírito ser diferente do que era ontem, amadurecendo em todos os sentidos que me foram dados.

Sou eternamente grato aos meus pais, José Roberto e Maria da Paz, pelo amparo nos mais variados sentidos, mesmo que eu tivesse todos os sábios escritores a minha disposição para transcrever os meus sentimentos de gratidão, reverencia e amor, ainda assim não seriam suficientes para traduzir o que sinto. Sem a luta diária de vocês, a possibilidade da minha graduação em uma universidade pública não existiria. Sou o primeiro homem da família a cursar uma universidade pública, fui transformado e, com isso, toda a geração após a minha será transformada, graças aos seus esforços para que a conclusão da minha graduação fosse possível; amo vocês!

Agradeço também aos meus avós, Maria Etelvina (Dona Branca) e João Batista, Maria José e Gercino, e também agradeço aos meus bisavós, Maria Abadia (Dona Badia) e Manoel Cândido, que lutaram em vida para que as gerações posteriores pudessem viver em condições melhores; amo vocês!

A minha companheira Vanessa, alma que reconheci de imediato no mundo, agradeço ao apoio em todas as minhas escolhas, por me ajudar a construir meus sonhos profissionais e, principalmente, pessoais. Sem você a caminhada seria mais difícil; te amo!

Agradeço ao meu orientador, Prof. Luiz Borges Bispo-da-Silva, pela orientação paciente e humana, e que se mostrou, além dos aspectos acadêmicos, um bom amigo. Jamais pensei que poderia fazer um trabalho acadêmico desta proporção e você me mostrou que com dedicação e amor ao ofício tudo é possível.

Ao Victor e principalmente ao Mateus, agradeço a ajuda imprescindível no laboratório durante a montagem e análise das lâminas.

Agradeço também à Profa. Dra. Ana Paula Coelho Balbi, por ter gentilmente cedido o material biológico para a realização deste trabalho; muito obrigado!

“Fé inabalável só o é a que pode encarar frente a frente à razão, em todas as épocas da Humanidade.”

Hippolyte Léon Denizard Rivail

RESUMO

Os mastócitos estão localizados na maior parte do trato digestório; essas células possuem várias funções associadas a processos alérgicos mediados por IgE, além disso, os mastócitos parecem contribuir para o desenvolvimento fisiológico de vários tecidos, bem como participam de processos patológicos não alérgicos. Nesse sentido, há relatos do envolvimento dos mastócitos na instalação de fibrose em diversas doenças. A ingestão de dietas ricas em lipídeos se tornou muito comum no ocidente, e a literatura científica tem relatado os efeitos deletérios desse tipo de alimentação. Contudo, pouco é conhecido sobre o impacto em filhos que foram gerados em mães com esse hábito alimentar. Dessa forma, como a ingestão de elevados teores de lipídeos pode produzir modificações de longo prazo na prole, fenômeno denominado de programação fetal (*fetal programming*), objetivamos no presente estudo quantificar a população mastocitária e de fibras colágenas no trato gastrointestinal da prole de ratas Wistar alimentadas com uma dieta constituída por 40% de lipídeos (durante a gestação e lactação), 30 dias após o nascimento. Ratas do grupo controle receberam dieta padrão constituída por 3,5% de lipídeos. Observamos uma redução na densidade mastocitária apenas no jejuno de filhos de mães que consumiram dieta hiperlipídica, contudo, o conteúdo de fibras de colágeno tipo I, colágeno tipo II e colágeno total não foi modificado. Portanto, a dieta hiperlipídica materna induziu programação fetal na prole, afetando especificamente sua população mastocitária no intestino delgado. Contudo, ao menos 30 dias após o nascimento, a redução da população mastocitária não produziu impacto funcional quanto à matriz colágena jejunal.

Palavras-chave: Colágeno. Trato gastrointestinal. Mastócito. Programação fetal.

ABSTRACT

Mast cells can be found in all parts of the gastrointestinal tract; these cells have several functions associated with allergic processes commonly mediated by IgE, in addition, mast cells seem to contribute to the physiological development of various tissues, as well as in non-allergic pathological processes. In this respect, mast cells activity appears to induce fibrosis in several diseases. The intake of high-fat diets has become common in the occident; however, despite its deleterious effects have been extensively reported and studied, little is known about the impact of such eating habit to children from mothers that ingested a high-fat diet during gestation. This is an important issue, since maternal ingestion of high levels of lipid can produce long-term changes in the offspring, a phenomenon called fetal programming, thus, the present study aimed at characterizing the mast cell population and collagen fibers in the gastrointestinal tract of 30 days old offspring from Wistar rat dams fed a 40% lipid diet during gestation and lactation. Control dams were submitted to a normolipid diet (3.5% of lipids). We observed a reduction in mast cell density only in the jejunum of offspring from mothers on a high-fat diet, however, the content of type I, type II and total collagen was not altered. Therefore, maternal high-fat diet induced fetal programming in the offspring, particularly affecting the small intestine and its mast cell population. At least 30 days after birth, a reduction in the mast cell population did not show any functional impact concerning the jejunal collagen matrix.

Keywords: Collagen. Gastrointestinal tract. Mast cell. Fetal programming.

SUMÁRIO

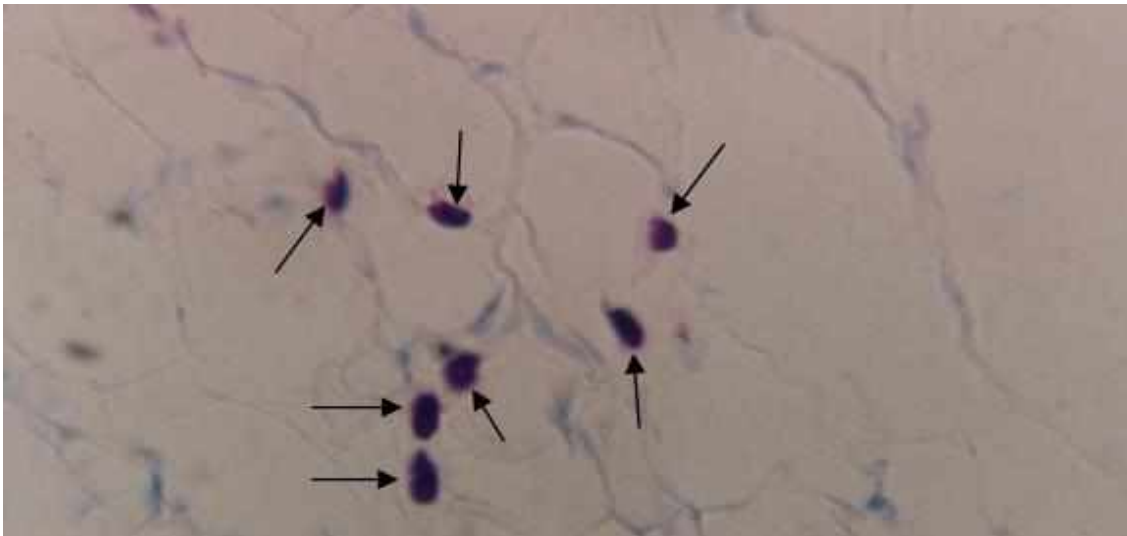
1.	INTRODUÇÃO.....	10
1.1	MASTÓCITOS: TRATO GASTRINTESTINAL E FIBROSE.....	10
1.2	PROGRAMAÇÃO FETAL E DIETA: CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	13
2.	JUSTIFICATIVA	16
3.	OBJETIVOS	17
3.1	OBJETIVO	17
4.	MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1	ANIMAIS.....	18
4.2	COMPOSIÇÃO DAS RAÇÕES.....	18
4.3	AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DO SISTEMA GASTRINTESTINAL.....	19
4.4	ANÁLISE HISTOLÓGICA	19
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	20
5.	RESULTADOS	22
6.	DISCUSSÃO	27
7.	CONCLUSÃO	29
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29
9.	ANEXO 1	34
	ANEXO 2.....	35

1. INTRODUÇÃO

1.1 Mastócitos: trato gastrointestinal e fibrose.

Os mastócitos são células granuladas que residem em todos os tecidos vascularizados do organismo (Figura 1). São derivados de células-tronco hematopoiéticas e circulam em baixa concentração no sangue até migrarem para os tecidos, local onde sofrem diferenciação e maturação (A S KIRSHENBAUM *et al.*, 1991) (BISCHOFF, 2007).

Figura 1. Fotomicrografia evidenciando a presença de mastócitos no jejuno.



Lâmina corada com azul de toluidina e observada utilizando-se lente objetiva de 40X. As setas indicam os mastócitos.

Fonte: (O Autor).

Os mastócitos são células que apresentam importante função na defesa do organismo contra patógenos e na imunorregulação. Assim, sua presença no trato gastrointestinal é um achado comum e esperado, já que a mucosa do aparelho digestório representa a maior interface entre o meio externo e interno e está constantemente exposta a diferentes agentes. Os mastócitos apresentam muitas funções no trato gastrointestinal, de fato, são capazes de influenciar o fluxo sanguíneo, a secreção de água e de eletrólitos, participam na mediação da dor, entre outras funções (Tabela 1). Os mastócitos podem ser encontrados em todas as camadas do trato gastrointestinal, concentrando-se na lâmina própria da mucosa e na submucosa (ALBERT-BAYO *et al.*, 2019). A migração que permite a residência dos mastócitos no trato gastrointestinal é inteiramente dependente da expressão da integrina $\alpha_4\beta_7$ (ABONIA *et al.*, 2005).

Tabela 1. Papel fisiológico dos mastócitos no trato gastrointestinal.

Função epitelial	Função endotelial	Influxo de células para o tecido.	Função neuroentérica.	Reparo tecidual.	Defesa do hospedeiro a patógenos
- Secreção de água e eletrólitos. - Junção - integridade da barreira epitelial.	-Fluxo sanguíneo. -Contração do vaso. -Permeabilidade-coagulação/fibrinólise.	-Neutrófilos -Eosinófilos -Linfócitos	-Peristaltismo -Mediação de dor	-Cicatrização de feridas -Fibrose	-Bactérias -Vírus -Parasitas

Fonte: adaptado de BISCHOFF, (2007).

O fenótipo dos mastócitos pode ser definido pelo conteúdo de proteases de seus grânulos. De acordo com esse critério, temos: mastócitos que expressam triptase, mas com pouca ou nenhuma quimase (MCT); mastócitos que expressam quimase, mas com baixa ou nenhuma expressão de triptase (MCC), e; mastócitos que expressam triptase, quimase e caxboxipeptidase (MCTC) (WEIDNER e AUSTEN, 1993). Alguns autores consideram que a classificação baseada apenas no conteúdo de proteases é ambígua (ALBERT BAYO *et al.*; 2019), já que a expressão dessas proteínas pode variar dependendo do microambiente tecidual (GALLI, BORREGAARD e THOMAS, 2011). Assim, a classificação usual é baseada na localização anatômica, de acordo com esse critério, essas células podem ser agrupadas em mastócitos de tecido conjuntivo ou mastócitos de mucosa.

No trato digestório, os MCT são predominantes na camada mucosa (cerca de 98%), em contrapartida, representam apenas 23% de todos os mastócitos na submucosa (IRANI *et al.*, 1986); por outro lado, os MCTC são o principal fenótipo na submucosa (quase 77%), enquanto o restante da população é do fenótipo de MCT (IRANI *et al.*, 1989). Os mastócitos contendo quimase, mas pouca ou nenhuma triptase (MCC), podem ser encontrados, mas são bem incomuns (Tabela 2) (WEIDNER e AUSTEN, 1993).

Os mastócitos possuem papel direto na inflamação e através da liberação de mediadores, como histamina, heparina, triptase, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) e fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF), essas células podem modular o reparo tecidual e a extensão da fibrose tissular (CHURCH e LEVI, 1997). De fato, em modelo murino de colite, os mastócitos aumentaram a proliferação de fibroblastos, a síntese de colágeno e a extensão da fibrose (XU, *et al.*, 2002). Os fenótipos mastocitários do trato gastrointestinal e os respectivos mediadores liberados por essas células foram apresentados resumidamente na tabela 2.

Tabela 2- Distribuição mastocitária e mediadores associados.

CARACTERÍSTICAS	MCT	MCTC	MCC	MTC
TECIDO				
Mucosa intestinal	++	+	-	n.r
Submucosa intestinal	+	++	-	n.r
MEDIADOR SINTETIZADO				
Histamina	+++	+++	n.r	+++
Quimase	-	++	++	-
Triptase	++	++	-	+++
Carboxipeptidase	-	++	n.r	+++
Catepsina g	-	++	n.r	n.r
LTC4	++	++	n.r	n.r
PGD2	++	++	n.r	n.r
TNF-A	++	++	n.r	n.r
IL-4, IL-5, IL-6, IL-13	++	++	n.r	n.r

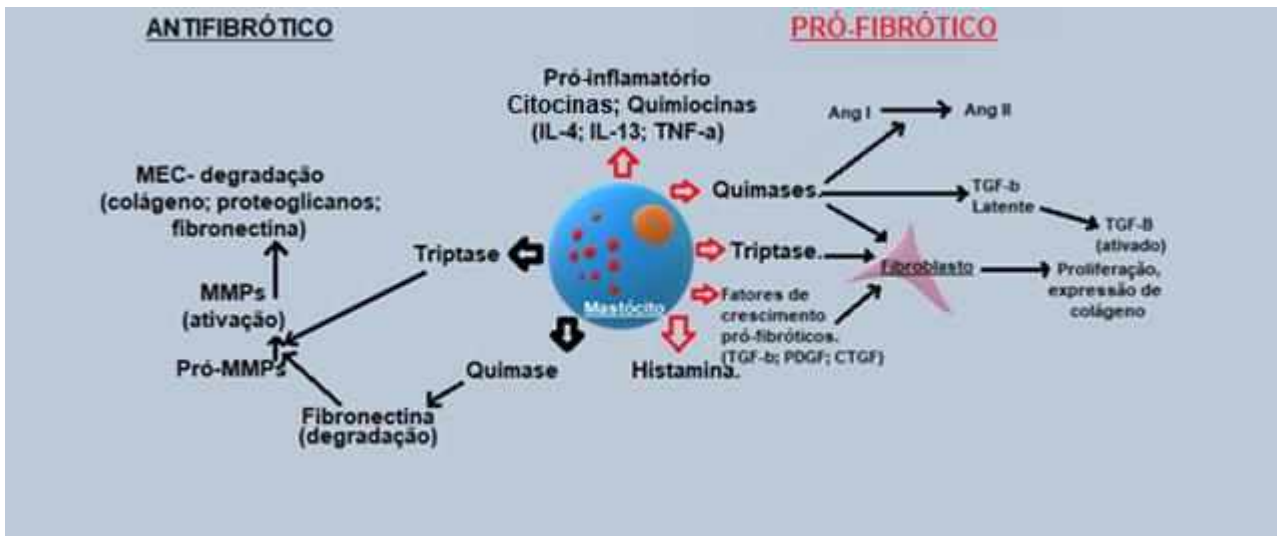
Os sinais representam uma medida qualitativa da presença de mastócitos: +, baixa quantidade; ++, quantidade moderada; +++, quantidade elevada; n.r, não relatado. (MCT) Mastócitos com triptases; (MCTC) Mastócitos com triptase e quimase; (MCC) Mastócitos com quimase; (MTC) Mastócito de tecido conjuntivo; (LTC4) Leucotrieno C4; (PGD2) Prostaglandina D2; (TNF-A) Fator de Necrose Tumoral; (IL-4) Interleucina-4; (IL-5) Interleucina-5; (IL-6) Interleucina-6; (IL-13) Interleucina-13.

Fonte: adaptada de KRISHNASWAMY, AJITAWI e CHI (2006).

Pelo exposto acima, é comum a associação do aumento do número de mastócitos com a fibrose tecidual em diferentes órgãos, e foi demonstrado que proteases mastocitárias (triptase e carboxipeptidase) estimulam a proliferação de fibroblastos (RUOSS, HARTMANN e CAUGHEY, 1991) ou possuem efeitos pró-fibróticos (quimase) (BRADDING e PEJLER, 2018). Por outro lado, um estudo de revisão sugere uma ação antifibrótica para as proteases mastocitárias, sendo a triptase e a quimase capazes de ativar metaloproteinases da matriz (MMPs), as quais possuem ação colagenásica (BRADDING e PEJLER G, 2018).

Bradding e Pejler (2018) aventaram a hipótese de que a expressão da ação pró-fibrótica ou antifibrótica dos mastócitos dependa da duração e/ou frequência da injúria tecidual; argumentam que na vigência de estímulos passageiros a ação antifibrótica dos mastócitos prevalece, enquanto que durante estímulos crônicos ou repetitivos, a ação pró-fibrótica se expressa (Figura 2).

Figura 2: Ações pró-fibróticas e antifibróticas dos mastócitos e os possíveis mediadores envolvidos.



Matriz Extracelular (MEC); Metaloproteinasas da Matriz (MMPs); Interleucina 4 (IL-4); Interleucina 13 (IL-13); Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α); Fator de Transformação do Crescimento Beta (TGF- β); Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF); Fator de Crescimento do Tecido Conjuntivo (CTGF); Angiotensina 1 (Ang I); Angiotensina 2 (Ang II).

Fonte: adaptado de BRADDING e PEJLER G (2018).

1.2 Programação Fetal e Dieta: Considerações Gerais.

Alterações no ambiente intrauterino podem produzir modificações em longo prazo na prole, fenômeno denominado de programação fetal (BOWMAN, SELEN ALPERGIN, *et al.*, 2019).

A programação fetal ocorre quando o ambiente ideal em que o feto se desenvolve é interrompido por fatores hostis, especialmente em períodos críticos da organogênese (Figura 3). Parece ser um mecanismo importante que permite ao organismo em desenvolvimento lidar com condições inadequadas. Contudo, uma vez que as mudanças ocorrem, o fenótipo pode se tornar permanente e determinar futuros problemas de saúde (PERRONE, SANTACROCE, *et al.*, 2016). Do ponto de vista mecanístico, a programação fetal pode resultar de alterações epigenéticas, como a metilação de alguns genes (GRATTAN, 2008)

Apesar de alguns estudos sugerirem que a dieta materna possa causar programação fetal, resultando em adaptação posterior (SHANKAR, HARRELL, *et al.*,

2008), e que dietas maternas desequilibradas possam resultar em predisposição da prole a doenças, mesmo na ausência de obesidade materna pré-gestacional (GRIFFITHS, WALTON, *et al.*, 2016), os impactos sobre os fetos gestados em mães que ingerem dietas ricas em lipídeos foram apenas parcialmente investigados.

Mudanças no ambiente intrauterino de mulheres com dietas hipercalóricas podem causar adaptações metabólicas nos fetos, com consequências imediatas ou tardias (NELSON, PHILLIPPA MATTHEWS e POSTON, 2010). Nesse caso, assim como se observa em outras condições que afetam o trato gastrointestinal, o mastócito poderia deixar de desempenhar um papel protetor e homeostático e passar a ter um papel prejudicial e pró-inflamatório, levando ao desenvolvimento de doença gastrointestinal como inflamação crônica, afetando a motilidade, a permeabilidade da mucosa, a função de barreira intestinal e a sensibilidade visceral (RAVANBAKHSH e KESAVAN, 2019).

Figura 3. Influência da programação fetal no desenvolvimento da prole.



Fonte: adaptado de LINDSAY, BUSS, *et al.*, (2019).

1.2 Mastócitos, programação fetal e trato gastrointestinal.

Do nascimento à infância, há um crescimento importante na densidade mastocitária no trato gastrointestinal, no entanto, a densidade e a distribuição dessas células no aparelho digestório de crianças ainda não são bem definidas (RAVANBAKHSH e

KESAVAN, 2019). Evidências sugerem que os mastócitos participam na patogênese de muitos distúrbios do trato gastrointestinal (RAVANBAKHS e KESAVAN, 2019). Assim, na dispepsia funcional (DF), o aumento na densidade antral de mastócitos parece provocar retardos no esvaziamento gástrico e disritmia pré-prandial em indivíduos pediátricos; ainda, há correlação entre a densidade mastocitária gástrica e os sintomas de plenitude pós-prandial e saciedade precoce comumente observada na DF (FRIESEN *et al* 2013). Apenas para citar outro exemplo, os mastócitos parecem participar na instalação de fibrose na esofagite eosinofílica (WERSHIL, 2009).

Cabe salientar que dietas maternas hipercalóricas e hiperlipídicas causam modulação imunológica em longo prazo nos filhotes, como demonstrado no tecido pulmonar (GRIFFITHS, WALTON, *et al.*, 2016). Dessa forma, poder-se-ia conjecturar que tais modulações, oriundas de programação fetal, alterassem também a função mastocitária, a qual passaria a adquirir um papel pró-inflamatório.

Portanto, considerando as evidências de que os mastócitos participam ativamente na patogênese de inúmeros distúrbios do trato gastrointestinal em crianças e orquestram a produção e degradação de fibras de colágeno, avaliamos a hipótese de que a densidade mastocitária pudesse estar alterada no trato gastrointestinal de filhotes de mães submetidas à dieta hiperlipídica, e que essa alteração pudesse modificar o conteúdo de colágeno ao longo do trato digestório como consequências de um processo de programação fetal.

Uma melhor compreensão de como essas células são afetadas em indivíduos pediátricos permitirá o desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas no futuro.

2. JUSTIFICATIVA

Para a realização desta pesquisa, levamos em consideração a ausência de informações na literatura científica sobre a influência da programação fetal na quantidade de mastócitos e no teor de fibras de colágeno ao longo do trato gastrointestinal. Muitos processos nocivos que acometem o trato digestório estão relacionados aos mastócitos e à fibrose tecidual. Tal fato aliado à sugestão de que hábitos alimentares hiperlipídicos maternos possam impactar na saúde da prole, justificam estudos que visam investigar se existe programação fetal no que tange a população mastocitária e o conteúdo de colágeno no trato gastrointestinal de filhos de mães que ingeriram dietas ricas em lipídeos durante a gestação e lactação.

3. OBJETIVO

O objetivo do presente estudo foi determinar a densidade mastocitária e quantificar, apenas nas regiões onde a densidade mastocitária se mostrou alterada, as fibras de colágeno do tipo I e III no trato gastrointestinal da prole de ratas Wistar alimentadas com ração contendo 40% de lipídeos.

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1. Animais.

O material biológico utilizado no presente estudo foi obtido de projeto devidamente avaliado, revisto e aprovado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia, CEUA/UFU (protocolo nº054/18 de 29 de agosto de 2018; ANEXO I).

Os animais utilizados foram ratos Wistar machos e fêmeas com peso acima de 300 g e 180 g, respectivamente, os quais foram cedidos pelo antigo Centro de Bioterismo e Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia (CEBEA/UFU). Os animais tiveram livre acesso à ração e água, e foram mantidos em gabinetes com controle de temperatura (25° C) e submetidos a ciclo claro-escuro de 12 h.

Ao final de cada dia, as fêmeas foram colocadas nas caixas dos animais machos, sendo 2 a 3 fêmeas para cada macho. Pela manhã, foram identificadas as fêmeas grávidas, através de esfregaço vaginal, as quais foram alocadas em caixas individuais e divididas nos seguintes grupos:

Grupo 1 (grupo controle): animais que receberam dieta comercial durante a gestação e lactação, cujo teor de lipídeos foi de 3,5%;

Grupo 2 (grupo experimental - dieta hiperlipídica 40%): animais que receberam dieta hiperlipídica com teor de 40% de lipídeos durante a gestação e lactação.

4.2 Composição das Rações.

A ração normolipídica consistiu em ração comercial (Nuvilab®) para ratos, contendo por peso: 19% de proteínas, 56% de carboidratos e 3,5% de lipídeos, totalizando 4,068 kcal/g (17,03 KJ/g). Já a ração hiperlipídica 40% foi preparada por Fortunato-Silva (2019): adicionou-se à 48 g de ração comercial (Nuvilab), 18 g de amendoim torrado, 5 g de chocolate ao leite, 3 g de biscoito maisena e 26 g de banha de porco. Os ingredientes foram moídos, misturados e oferecidos na forma de *pellets*, contendo por peso: 14% de proteínas, 35% carboidratos e 40% de lipídeos, totalizando 5,83 kcal/g (24,39 KJ/g).

4.3. Avaliação Morfométrica do Sistema Gastrointestinal

4.3.1. Preparo dos órgãos e fixação.

Para a avaliação morfométrica, a fim de garantir a variabilidade amostral, foram utilizados no máximo dois filhotes de cada mãe para cada experimento realizado. Os filhotes selecionados tinham idade de 30 dias e foram anestesiados com tiopental (150 mg/kg, i.p.), eutanasiados por deslocamento cervical e órgãos, como estômago, duodeno, jejuno, íleo, cólon, ceco e reto, foram coletados. O material foi irrigado com salina a 0,9% para remover todo conteúdo luminal e em seguida foi injetado o fixador Methacarn (60% metanol, 30% clorofórmio e 10% ácido acético glacial), com uma seringa, dentro de cada órgão.

Em seguida, o material foi fixado em Methacarn por mais 24 horas e posteriormente mantidos em álcool 70%. Após a etapa de fixação, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol (75, 85, 95 e três vezes em álcool absoluto), três trocas de xilol e três de parafina por meia hora em cada passo. Assim, o material incluído em parafina foi cortado em micrótomo de forma a obtermos secções transversais com 5 µm de espessura, as quais foram montadas em lâminas de vidro.

4.4. Análises Histológicas

4.4.1. Coloração com azul de toluidina.

As lâminas foram desparafinizadas e hidratadas até a obtenção de uma graduação alcoólica de 70%, foram então lavadas em água corrente por 10 minutos, mantidas em água destilada por 5 minutos e, por fim, imersas em tampão citrato (pH 3) por mais 5 minutos.

As lâminas equilibradas em tampão citrato foram coradas, por 3 minutos, em solução de azul de toluidina (0,5%) em tampão citrato (pH 3). O excesso de corante foi removido por uma imersão rápida em tampão citrato e as lâminas foram desidratadas e montadas com goma de damar.

4.4.1.1. Análise das lâminas coradas com azul de toluidina.

A coloração com azul de toluidina permitiu que os mastócitos fossem facilmente identificados, assim, realizamos a contagem total de mastócitos (expressa em mastócitos/mm²). As análises foram feitas em microscópio óptico (OLYMPUS MODEL CHT) utilizando-se lente objetiva de 40x. Para determinação da densidade mastocitária, as lâminas foram escaneadas (HP scanjet 2400) e as áreas das secções teciduais foram determinadas utilizando-se o programa Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) devidamente calibrado.

4.4.2. Coloração com *picrosirius red*.

As lâminas foram desparafinizadas e hidratadas até a obtenção de uma gradação alcóolica de 70%, foram então lavadas em água corrente por 20 minutos, mantidas em água destilada por 5 minutos e em seguida permaneceram no corante *picrosirius red* (vermelho de picrossírius) por uma hora. Foram novamente lavadas em água corrente por 15 minutos e em seguida contracoradas com hematoxilina por 30 segundos. As lâminas foram, então, desidratadas e montadas com goma de Damar.

4.4.2.1. Análise das lâminas coradas com *picrosirius red*.

A combinação da coloração com *picrosirius red* e a luz polarizada fornece uma ferramenta poderosa para a análise estrutural do colágeno (Lattouf *et al.*, 2014). As fibras de colágeno mais espessas, fortemente birrefringentes, apresentam-se coradas em amarelo e vermelho e representam o colágeno tipo I, enquanto as fibras mais finas e dispersas, fracamente birrefringentes, apresentam-se coradas em verde e representam o colágeno tipo III. Assim, para a quantificação do colágeno total (tipo I + tipo III), lâminas coradas com *picrosirius red* foram observadas em microscópio Nikon equipado com filtro de polarização. Foram analisados os campos histológicos do jejuno utilizando-se lente objetiva de 40x. Todas as imagens foram analisadas pelo programa Image J, e os valores obtidos foram expressos como porcentagem de área marcada (ANEXO II). Como o trato gastrointestinal é constituído de vísceras ocas, cabe ressaltar que apenas as áreas correspondentes aos tecidos foram consideradas e computadas nas análises. Os dados foram expressos em porcentagem.

4.5. Análise Estatística.

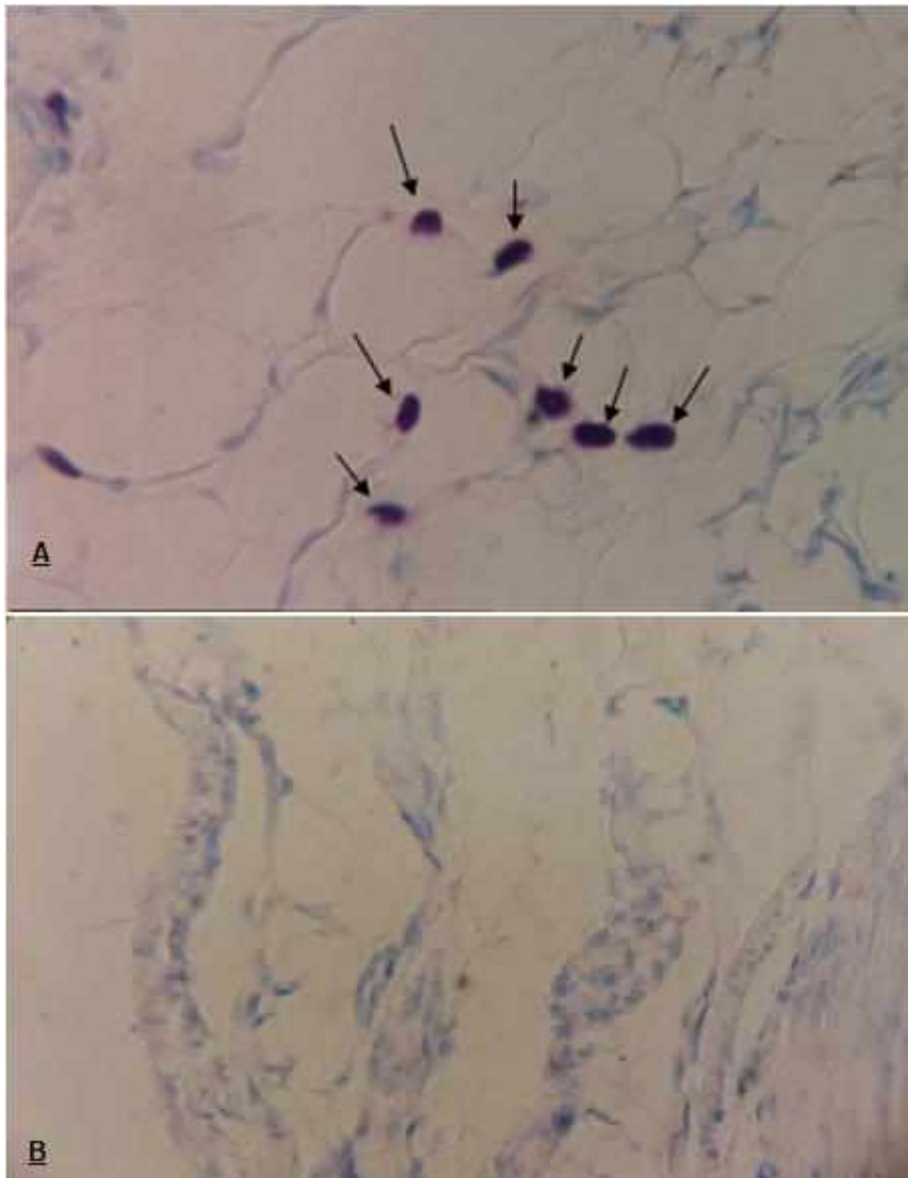
Para todos os parâmetros analisados utilizamos o software *GraphPad Prism Version 5.00*®, empregando-se o teste de Kolmogorov-Sminorv para verificar se os dados apresentavam ou não distribuição normal (Gaussiana). Para os dados que apresentaram distribuição normal, foi empregado o teste t de Student, para os que não apresentaram, utilizamos o teste de Mann-Whitney. O nível de significância adotado foi de 5% ($P < 0,05$).

6. RESULTADOS

6.1 Densidade de mastócitos no trato gastrointestinal da prole de ratas submetidas à dieta hiperlipídica.

A densidade mastocitária da prole de Ratas *Wistar*, submetidas à dieta hiperlipídica, foi alterada apenas no jejuno (Figura 4 e 5).

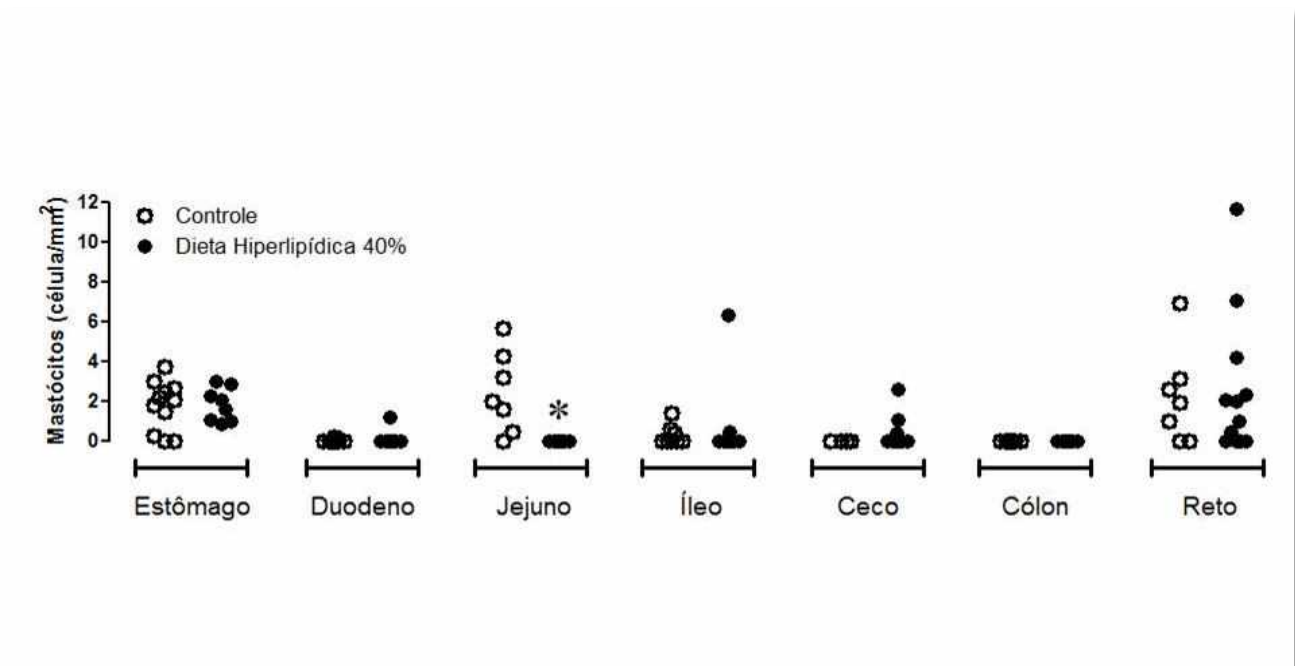
Figura 4. Fotomicrografia do jejuno de animal do grupo controle (A) e da prole de ratas submetidas à dieta hiperlipídica (B).



Lâminas coradas com azul de toluidina e observadas utilizando-se lente objetiva de (40X). As setas indicam os mastócitos. Note a ausência de mastócitos no jejuno de filhos de mães que ingeriram dieta hiperlipídica 40%.

Fonte: O Autor, 2020.

Figura 5. Densidade de mastócitos ao longo do trato digestório de filhotes de mães que ingeriram dieta controle (3,5% de lipídeos) ou dieta hiperlipídica 40%. * $P < 0,05$ vs. controle (Mann-Whitney). Os valores representam os dados individuais de 5 a 11 animais.

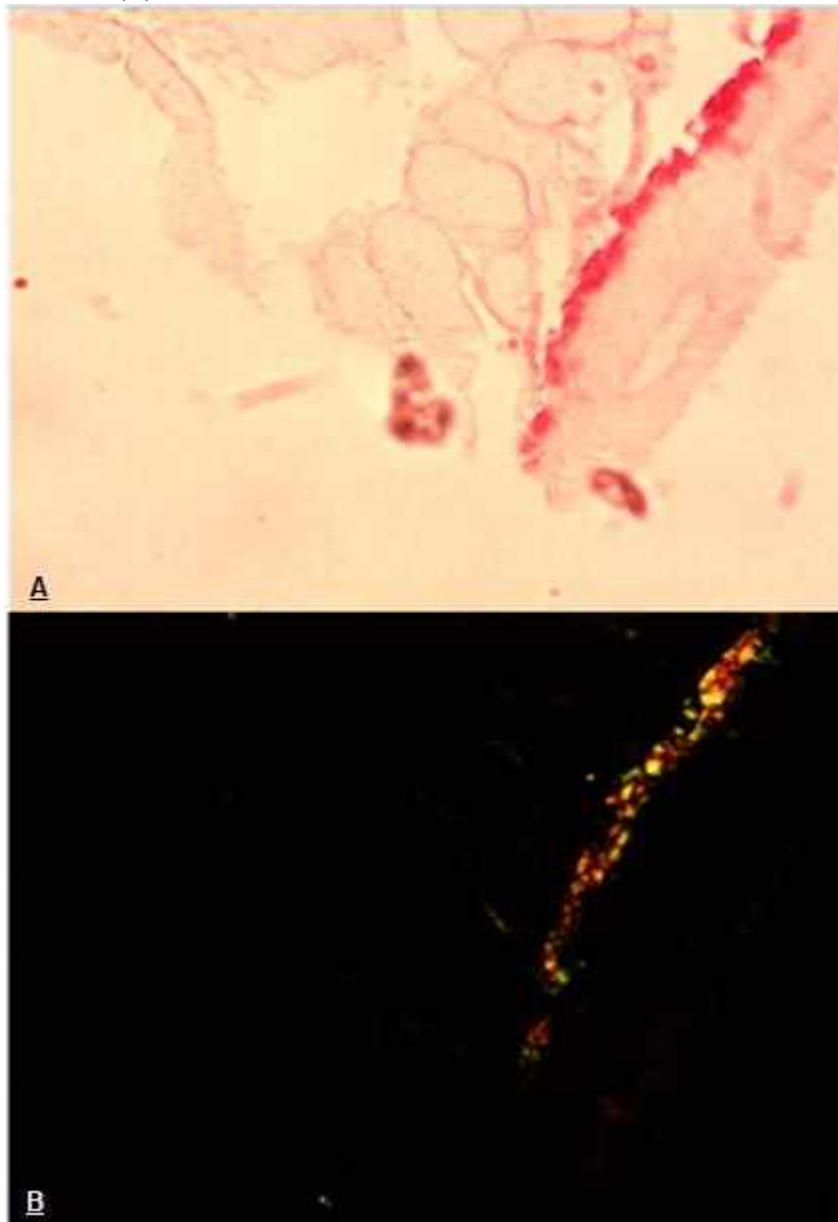


Fonte: O Autor, 2020.

6.2 Colágeno no jejuno da prole de ratas Wistar submetidas à dieta padrão ou hiperlipídica.

No jejuno da prole de ratas *Wistar* submetidas à dieta hiperlipídica durante a gestação e lactação, nem a quantidade de fibras de colágeno do tipo I e III nem o colágeno total foram diferentes quando comparadas àquela da prole oriunda de ratas que ingeriram dieta padrão.

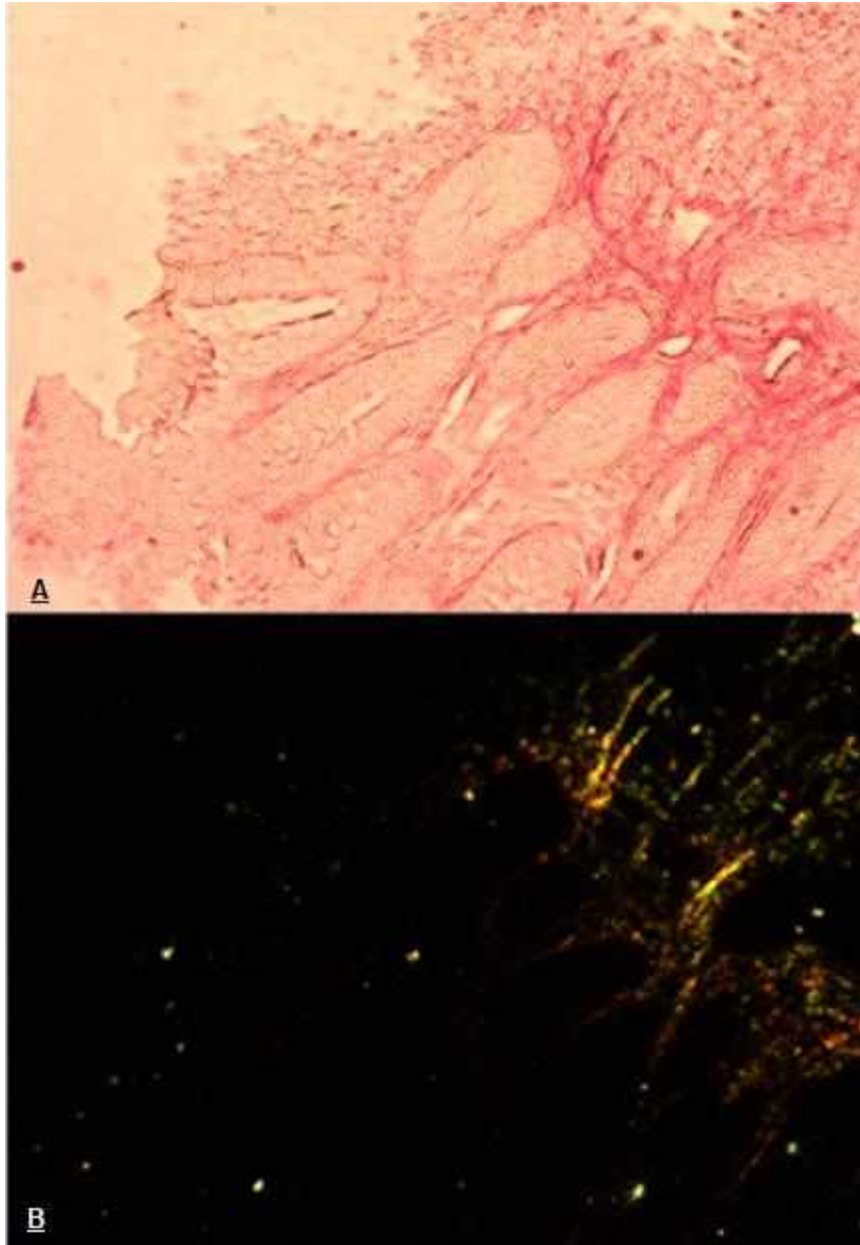
Figura 6, Fotomicrografia da mesma secção do jejuno de rato do grupo controle obtida com luz não polarizada (A) e polarizada (B).



As lâminas foram coradas com *picrosirius red*, contracoradas com hematoxilina e observadas utilizando-se lente objetiva de 40X.

Fonte: O Autor, 2020.

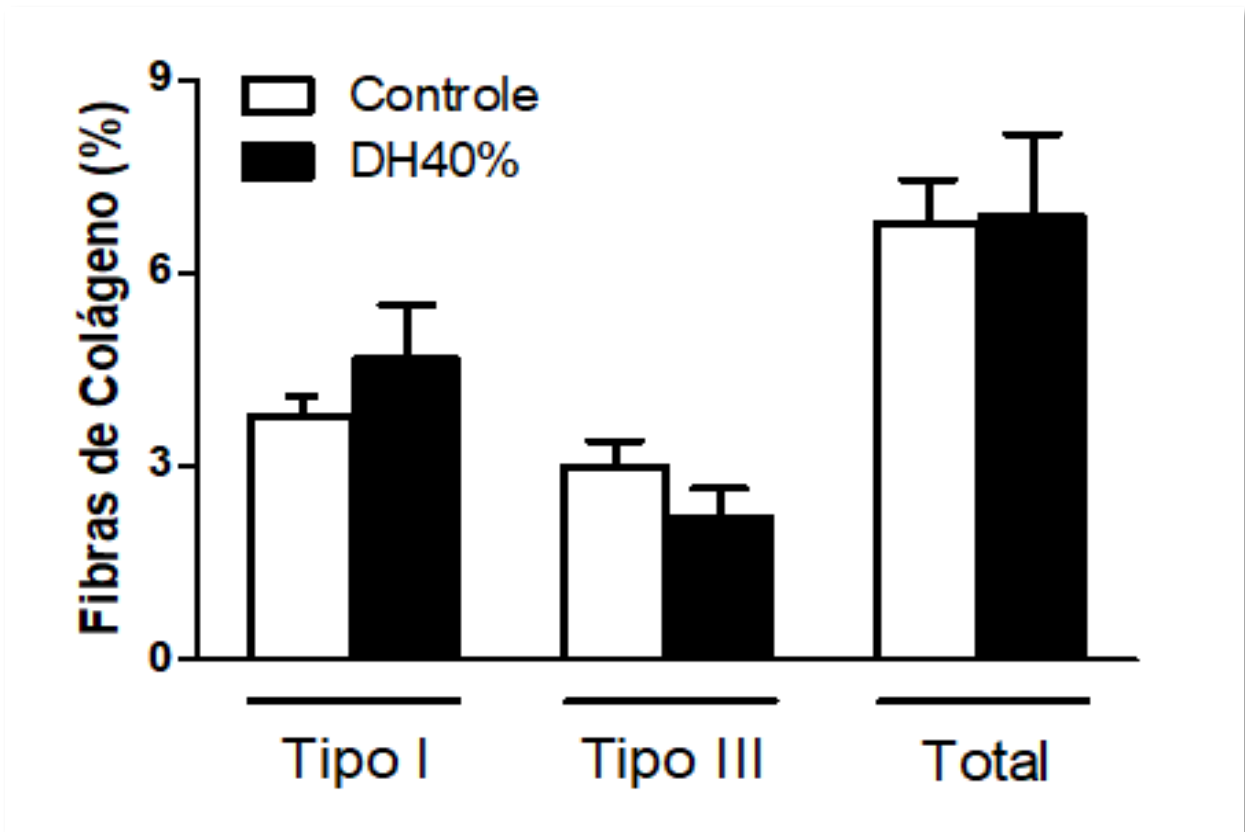
Figura 7. Fotomicrografia da mesma secção do jejuno da prole de rata do grupo experimental submetida à dieta hiperlipídica obtida com luz não polarizada (A) e polarizada (B).



As lâminas foram coradas com *picrosirius red*, contracoradas com hematoxilina e observadas utilizando-se lente objetiva de 40X.

Fonte: O Autor, 2020.

Figura 8. Tipos de colágenos no jejuno de ratos do grupo controle e na prole de ratas submetidas à dieta hiperlipídica 40% (DH40%). $P > 0,05$ vs. controle (teste t de Student). Os valores representam a média \pm EPM de 5 a 8 animais.



Fonte: O Autor, 2020.

8. DISCUSSÃO

A redução na população mastocitária do jejuno da prole de ratas submetidas à dieta hiperlipídica evidencia a instalação de programação fetal no trato gastrintestinal associada a essa modificação dietética. Em ratos adultos e humanos, o jejuno corresponde à 90% ou 35% - 50% da extensão do intestino delgado, respectivamente (BLAKER; IRVING; 2014; VDOVIÁKOVÁ et al., 2016). Dada sua extensão, o jejuno é um órgão importante para a absorção de nutrientes e sua motilidade impacta no funcionamento geral do trato gastrintestinal. Portanto, modificações estruturais nessa porção do intestino delgado podem estar associadas a alterações funcionais significativas e merecem investigação. Assim, um aspecto significativo que precisa ser analisado refere-se à matriz extracelular, em especial o teor do seu principal componente, o colágeno (GELSEA; POSCHLB; AIGNERA; 2003). Nesse sentido, apesar dos mastócitos serem capazes de modular o conteúdo de colágeno nos tecidos, não observamos alterações na quantidade de fibras de colágeno do tipo I e III, tão pouco na quantidade total dessas proteínas no jejuno da prole de ratas submetidas à dieta hiperlipídica. Portanto, os mastócitos não parecem participar na formação da matriz colágena durante o desenvolvimento do trato gastrintestinal em ratos, ao menos não até o 30º dia pós-natal. Contudo, a diminuição na densidade jejunal de mastócitos pode tornar a resolução de processos inflamatórios locais deficitária, dada a participação dessas células na referida etapa da inflamação (Albert-Bayo, 2019), uma hipótese que permanece por ser investigada.

A literatura científica relata que os mastócitos podem alterar a permeabilidade da mucosa intestinal e aumentar a secreção de Cl⁻, e a histamina, importante mediador sintetizado e liberado por essas células, parece participar dessa alteração, bem como pode promover aumento no tônus muscular (Albert-Bayo, 2019). Assim, esperar-se-ia que a diminuição dos mastócitos pudesse ter implicações funcionais, tanto na motilidade como na secreção intestinal. Contudo, dados ainda não publicados do nosso grupo de pesquisa mostram que a prole de ratas submetidas à dieta hiperlipídica 40% não apresentou alterações no *enteropooling* (acúmulo de líquidos intestinais) induzido pela administração de óleo de rícino (FORTUNATO-SILVA; 2019); essa constatação associada às observações descritas no presente trabalho sugerem que os mastócitos não participam no efeito do óleo de rícino no que se refere ao acúmulo intraluminal de líquidos, tão pouco

que haja uma maior permeabilidade já instalada, o que favoreceria esse processo. Outro aspecto funcional avaliado por Fortunato-Silva (2019) foi a motilidade intestinal, a qual não se mostrou alterada em filhos de mães que ingeriram dieta hiperlipídica. Dessa forma, a programação fetal desencadeada pela ingestão exagerada de lipídeos, caracterizada aqui por redução na densidade mastocitária no jejuno da prole, não parece estar associada a alterações na motilidade intestinal após 30 dias do nascimento.

Por fim, nossos dados não permitem indicar o que produziu a diminuição dos mastócitos no jejuno, mas como a expressão da integrina $\alpha_4\beta_7$ é importante para permitir a chegada e fixação seletiva dos progenitores mastocitários no intestino delgado (GURISH et al., 2001), é provável que a programação fetal tenha diminuído a expressão dessa molécula de adesão na superfície dos mastócitos, uma hipótese que merece futuras investigações.

9.CONCLUSÃO

A dieta hiperlipídica materna induziu programação fetal na prole, a qual se caracterizou por diminuição na densidade mastocitária jejunal, mas que não se associou a alterações no conteúdo de colágeno nessa porção do intestino delgado.

10. REFERENCIAS

ABONIA, J.P.; AUSTEN, K.F.; ROLLINS, B.J.; JOSHI, S.K.; FLAVELL, R.A.; KUZIEL, W.A.; KONI, P.A.; GURISH, M.F. Constitutive homing of mast cell progenitors to the intestine depends on autologous expression of the chemokine receptor CXCR2. **Blood**, 105, 11, 4308–4313, jun 2005.

ALBERT-BAYO M.; PARACUELLOS I.; GONZÁLEZ-CASTRO AM, et al. Intestinal Mucosal Mast Cells: Key Modulators of Barrier Function and Homeostasis. **Cells**, 8, 2, 1-24, fev 2019. doi:10.3390/cells8020135

BISCHOFF SC.; KRÄMER S. Human mast cells, bacteria, and intestinal immunity. **Immunol Rev**, 217, 1329-1337, jul 2007.

BISCHOFF, S.C. Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: Comparison of human and murine data. **Nat. Rev. Immunol**, 7, 2, 97-104, fev 2007. [CrossRef] [PubMed].

BLAKER, P.; IRVING, P. Physiology and function of the small intestine. *In*: ZWICK, R.; OHLSTEIN, B.; KLEIN, O. (org). **Advanced Nutrition and Dietetics in Gastroenterology**, 1. ed. John Wiley & Sons, Ltd, 2014.

BOWMAN, C. E. et al. Maternal Lipid Metabolism Directs Fetal Liver Programming following Nutrient Stress. **Cell Rep**, 29, 5, 1299-1310, out 2019. ISSN 2211-1247

BRADDING P.; PEJLER G. The controversial role of mast cells in fibrosis. **Immunol Rev**, 282, 1, 198-231, mar 2018. doi: 10.1111/imr.12626. PMID: 29431218.

CHURCH MK.; LEVI-SCHAFFER F. The human mast cell. **J Allergy Clin Immunol**, 99, 2, 60-155, fev 1997.

FORTUNATO-SILVA, J. **Exposição intrauterina à dieta hiperlipídica, com diferentes teores de lipídios, e suas repercussões gastrintestinais e metabólicas: um modelo de programação fetal em ratos Wistar**. 2019. 190 p. (Dissertação de Mestrado em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas) – Instituto de Ciências Biomédica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019.

FRIESEN CA, SCHURMAN JV, COLOMBO JM, ABDEL-RAHMAN SM. Eosinophils and mast cells as therapeutic targets in pediatric functional dyspepsia. **World J Gastrointest Pharmacology**, 4:86-96. 2013

GALLI, S.; BORREGAARD, N.; WYNN, T. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: Macrophages, mast cells and neutrophils. **Nat. Immunol**, 12, 11, 1035-1044, out 2011. [CrossRef] [PubMed].

GELSEA K.; POSCHL E.; AIGNERA T. Collagens - structure, function, and biosynthesis. **Adv Drug Deliv Rev.**, 55, 12, 1531-1546, nov 2003.

GRATTAN D. R. Fetal programming from maternal obesity: eating too much for two? **Endocrinology**, 149, 11, 5345-5347, nov 2008. doi:10.1210/en.2008-1106. PMID: 18936494.

GRIFFITHS P. S.; WALTON C.; SAMSELL L.; PEREZ M. K.; PIEDIMONTE G. Maternal high-fat hypercaloric diet during pregnancy results in persistent metabolic and respiratory abnormalities in offspring. **Pediatr Res**, 79, 2, 278-286, fev 2016. doi:10.1038/pr.2015.226

GURISH M. F.; TAO H; ABONIA J. P et. al. Intestinal mast cell progenitors require CD49beta7 (alpha4beta7 integrin) for tissue-specific homing. **J Exp Med**. 194, 9, 1243-1252, nov 2001. doi:10.1084/jem.194.9.1243

IRANI, A.; SCHECHTER, N.; CRAIG, S.; DEBLOIS, G.; SCHWARTZ, L. Two types of human mast cells that have distinct neutral protease compositions. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 83, 12, 4464–4468, jun 1986. [CrossRef].

IRANI, A. M.; BRADFORD, T. R.; KEPLEY, C. L.; SCHECHTER, N. M.; SCHWARTZ, L. B. Detection of MCT and MCTC types of human mast cells by immunohistochemistry using new monoclonal anti-tryptase and anti-chymase antibodies. **J. Histochem. Cytochem**. 37, 10, 1509–1515, out 1989. [CrossRef]

KIRSHENBAUM, A. S.; KESSLER, S. W.; GOFF, J. P.; METCALFE, D. D. Demonstration of the origin of human mast cells from CD34+ bone marrow progenitor cells. **J. Immunol**. 146, 5, 1410–1415, mar 1991. [PubMed].

KRISHNASWAMY G.; AJITAWI O.; CHI D. S. The human mast cell: an overview. **Methods Mol Biol**. 315, 13-34, 2006. doi:10.1385/1-59259-967-2:013

LATTOUF, R. et al. Picosirius red staining: a useful tool to appraise collagen networks in normal and pathological tissues. **J Histochem Cytochem**, 62, 10, 751-758, ou 2014. ISSN 1551-5044 (Electronic) 0022-1554.

LINDSAY K.L, BUSS C., WADHWA P.D. & ENTRINGER S. The interplay between nutrition and stress in pregnancy: implications for fetal programming of brain development. **Biological Psychiatry**, 85, 2, 135-149, jan 2019. doi: 10.1016/j.biopsych.2018.06.021.

NELSON S. M.; MATHEWS P.; POSTON L. Maternal metabolism and obesity: modifiable determinants of pregnancy outcome. **Hum Reprod Update**, 16, 3, 255-275, jun 2016.

PERRONE, S. et al. Fetal programming and early identification of newborns at high risk of free radical-mediated diseases. **World J Clin Pediatr**, 5, 2, 172-181, mai 2016. ISSN 2219-2808.

RAVANBAKHS N, KESAVAN A. The role of mast cells in pediatric gastrointestinal disease. **Ann Gastroenterol**. 32, 4, 338-345, ago 2019. doi:10.20524/aog.2019.0378

RUOSS S. J.; HARTMANN T.; CAUGHEY G. H. Mast cell tryptase is a mitogen for cultured fibroblasts. **J. Clin. Invest**, 88, 2, 493-499, ago 1991.

SHANKAR K, HARRELL A, LIU X, GILCHRIST JM, RONIS MJ, BADGER TM. Maternal obesity at conception programs obesity in the offspring. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 294, 2, 526-538, fev 2008.

VDOVIÁKOVÁ, K.; PETROVOVÁ, E.; MALOVESKÁ, M.; KREŠÁKOVÁ, L.; TELEKY, J.; ELIAS, M.; PETRÁŠOVÁ, D. "Surgical Anatomy of the Gastrointestinal Tract and Its Vasculature in the Laboratory Rat", **Gastroenterology Research and Practice**, 1-11, 2016.

WEIDNER, N.; AUSTEN, K. F. Heterogeneity of Mast Cells at Multiple Body Sites. Fluorescent determination of avidin binding and immunofluorescent determination of chymase, tryptase, and carboxypeptidase content. **Pathol. Res. Pract.** 189, 2, 156–162., marc 1993. [CrossRef]

WERSHIL BK. **Exploring** the role of mast cells in eosinophilic esophagitis. **Immunol Allergy Clin North Am** ,29:189-195, 2009.

XU, X. et. al. Mast Cells Involvement in the Inflammation and Fibrosis Development of the TNBS-induced Rat Model of Colitis. **Scandinavian journal of gastroenterology**. 37, 3, 330-337, mar 2001. 10.1080/003655202317284246.

ANEXO I



Universidade Federal de Uberlândia
 Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
 - Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) -
 Rua Ceará, S/N - Bloco 2D, sala 02 – CEP 38405-315
 Campus Umuarama – Uberlândia/MG – Ramal (VoIP) 3423
 e-mail: ceua@propp.ufu.br; www.comissoes.propp.ufu.br



ANÁLISE FINAL Nº 134/18 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 054/18

Projeto Pesquisa: “Exposição intrauterina a dieta hiperlipídica, com diferentes teores de lipídeos, e suas repercussões renais, gastrintestinais, cardiovasculares e metabólicas: um modelo de programação fetal em ratos Wistar”.

Pesquisador Responsável: Ana Paula Coelho Balbi

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

Situação: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: A CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 29 de agosto de 2018

Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão
 Coordenador da CEUA/UFU

ANEXO II

Foi utilizado o programa Image J para diferenciação das fibras de colágeno na lâmina corada com *picrosirius red*.

1. Abrir a Figura
2. Clicar em Image >Color>Split Channels
3. Deixar a Aba escrito Red
4. Clicar em Image>Adjust>Threshold
5. Regular o Threshold de acordo com a Figura original
6. O resultado final é apresentado como porcentagem da área marcada em vermelho
7. Clicar na aba escrito Green
8. Clicar em Image >Adjust>Threshold
9. Regular o Threshold de acordo com a Figura original
10. Somatória da área verde com a vermelha, resultando na área total