

Como citar este artigo:

Kunz RI, Capelassi AN, Alegre-Maller AC, Bonfleur ML, Ribeiro LF, Costa RM, et al. Sericina como tratamento da obesidade: efeitos morfofisiológicos de camundongos obesos por dieta hiperlipídica. *einstein* (São Paulo). 2020;18:eAO4876. http://dx.doi.org/10.31744/einstein_journal/2020AO4876

Autor correspondente:

Regina Inês Kunz
Universidade Federal da Fronteira Sul
Rua Capitão Araújo, 20 – Centro
CEP: 99101-200 – Passo Fundo, RS, Brasil
Tel.: (54) 3335-8541
E-mail: regina_kunz@hotmail.com

Data de submissão:

4/12/2018

Data de aceite:

17/6/2019

Conflitos de interesse:

não há.

Copyright 2019

Esta obra está licenciada sob
uma Licença *Creative Commons*
Atribuição 4.0 Internacional.

ARTIGO ORIGINAL

Sericina como tratamento da obesidade: efeitos morfofisiológicos de camundongos obesos por dieta hiperlipídica

Sericin as treatment of obesity: morphophysiological effects in obese mice fed with high-fat diet

Regina Inês Kunz¹, Angélica Novi Capelassi², Ana Cláudia Paiva Alegre-Maller², Maria Lúcia Bonfleur², Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro², Rose Meire Costa², Maria Raquel Marçal Natali³

¹ Universidade Federal da Fronteira Sul, Passo Fundo, RS, Brasil.

² Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, PR, Brasil.

³ Universidade Estadual do Maringá, Maringá, PR, Brasil.

DOI: 10.31744/einstein_journal/2020AO4876

RESUMO

Objetivo: Investigar os efeitos da sericina extraída de casulos de *Bombyx mori* na morfofisiologia de camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica. **Métodos:** Camundongos machos C57Bl6, com 9 semanas de idade, foram distribuídos em Grupos Controle e Obeso, que receberam ração padrão para roedores ou dieta hiperlipídica por 10 semanas, respectivamente. Posteriormente, os animais foram redistribuídos em quatro grupos, com sete animais cada: Controle, Controle-Sericina, Obeso e Obeso-Sericina. Os animais permaneceram recebendo ração padrão ou hiperlipídica por 4 semanas, período no qual a sericina foi administrada oralmente na dose de 1.000mg/kg de massa corporal aos Grupos Controle-Sericina e Obeso-Sericina. Parâmetros fisiológicos, como ganho de peso, consumo alimentar, peso das fezes em análise de lipídios fecais, motilidade intestinal e tolerância à glicose foram monitorados. Ao término do experimento, o plasma foi coletado para dosagens bioquímicas e fragmentos de tecido adiposo branco; fígado e jejuno foram processados para análises histológicas, e amostras hepáticas foram usadas para determinação lipídica. **Resultados:** Camundongos obesos apresentaram ganho de peso e acúmulo de gordura significativamente maior que os controles, aumento do colesterol total e glicemia. Houve hipertrofia dos adipócitos retroperitoneais e periepídídímicos, instalação de esteatose e aumento do colesterol e triglicérides hepáticos, bem como alteração morfométrica da parede jejunal. **Conclusão:** O tratamento com sericina não reverteu todas as alterações fisiológicas promovidas pela obesidade, mas restaurou a morfometria jejunal e aumentou a quantidade de lipídios eliminados nas fezes dos camundongos obesos, apresentando-se como potencial tratamento para a obesidade.

Descritores: *Bombyx mori*; Obesidade/tratamento farmacológico; Sericinas/uso terapêutico; Fígado; Intestino delgado; Jejunio; Dieta hiperlipídica; Camundongos

ABSTRACT

Objective: To investigate the effects of sericin extracted from silkworm *Bombyx mori* cocoon on morphophysiological parameters in mice with obesity induced by high-fat diet. **Methods:** Male C57Bl6 mice aged 9 weeks were allocated to one of two groups - Control and Obese, and fed a standard or high-fat diet for 10 weeks, respectively. Mice were then further subdivided into four groups with seven mice each, as follows: Control, Control-Sericin, Obese, and Obese-Sericin. The standard or

high fat diet was given for 4 more weeks; sericin (1,000mg/kg body weight) was given orally to mice in the Control-Sericin and Obese-Sericin Groups during this period. Weight gain, food intake, fecal weight, fecal lipid content, gut motility and glucose tolerance were monitored. At the end of experimental period, plasma was collected for biochemical analysis. Samples of white adipose tissue, liver and jejunum were collected and processed for light microscopy analysis; liver fragments were used for lipid content determination. **Results:** Obese mice experienced significantly greater weight gain and fat accumulation and had higher total cholesterol and glucose levels compared to controls. Retroperitoneal and periepididymal adipocyte hypertrophy, development of hepatic steatosis, increased cholesterol and triglyceride levels and morphometric changes in the jejunal wall were observed. **Conclusion:** Physiological changes induced by obesity were not fully reverted by sericin; however, sericin treatment restored jejunal morphometry and increased lipid excretion in feces in obese mice, suggesting potential anti-obesity effects.

Keywords: *Bombyx mori*; Obesity/drug therapy; Sericins/therapeutic use; Liver; Intestine, small; Jejunum; Diet, high-fat; Mice

INTRODUÇÃO

A obesidade, uma epidemia mundial, é caracterizada pelo excesso de gordura corporal acompanhada por complicações cardiometabólicas, que são diretamente impulsionadas pela ingestão excessiva de calorias, açúcar, sal e gordura, associada às atividades laborais e de entretenimento cada vez mais passivas.⁽¹⁾

O intestino delgado, responsável pela absorção e pelo processamento metabólico eficiente dos nutrientes ingeridos,^(2,3) é o primeiro órgão exposto à energia derivada dos alimentos,⁽⁴⁾ capaz de se adaptar funcional e morfológicamente em relação à quantidade e à qualidade do alimento consumido.⁽⁵⁾ Sabe-se que a obesidade, principalmente a induzida por dietas hiperlipídicas e/ou hipercalóricas, afeta os componentes da parede intestinal.^(3,5,6)

Somada às alterações no tecido adiposo e às eventuais adaptações no intestino delgado, a obesidade, por si só, é fator de risco para o desenvolvimento de outras patologias, como a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) – a doença crônica mais comum do fígado.^(7,8)

Mudanças no estilo de vida, como melhora nos hábitos alimentares e prática de atividade física, são as principais alternativas para o tratamento da obesidade e da DHGNA.^(7,9) Porém, a capacidade individual de resposta frente a estas estratégias pode não ser suficiente.⁽¹⁰⁾

Neste sentido, pesquisas de potenciais agentes terapêuticos naturais para a obesidade, com menos efeitos colaterais, vem ganhando destaque,^(7,11) como a do biopolímero sericina, produzido pelo bicho-da-seda *Bombyx mori* (*Lepidoptera, Bombycidae*). Trata-se de uma pro-

teína globular natural, altamente hidrofílica, com peso molecular de 20 a 400kDa e que, em conjunto com a fibroína, forma o fio de seda.⁽¹²⁾ As características físico-químicas da molécula lhe conferem diversas propriedades, investigadas quanto à sua aplicabilidade biológica.⁽¹²⁻¹⁴⁾

Estudos evidenciaram que quando administrada concomitantemente à dieta hiperlipídica, a sericina melhora a tolerância à glicose e apresenta efeito hipolipidêmico,⁽¹⁵⁾ além de aumentar a concentração da lipoproteína de alta densidade (HDL) e regular a produção de citocinas pelo tecido adiposo, com redução da leptina, resistina e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), e aumento da concentração plasmática de adiponectina.⁽¹⁶⁾ Ainda, promove a inibição da absorção de colesterol pelas células intestinais⁽¹⁷⁾ e possui propriedade antioxidante.⁽¹⁸⁾ Neste sentido, é creditado à sericina amplo potencial como medida preventiva, mas não foi estabelecido seu efeito como terapia administrada após a instalação da obesidade e de suas comorbidades.

OBJETIVO

Investigar os efeitos da sericina sobre os parâmetros plasmáticos e morfologia adiposa, hepática e intestinal de camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica.

MÉTODOS

O estudo foi realizado na Universidade Estadual do Oeste do Paraná no período de julho de 2014 a dezembro de 2016.

Extração e determinação aminoacídica da sericina

A sericina foi obtida a partir de casulos de *Bombyx mori*, cedidos pela indústria sericícola BRATAC S.A (Londrina, PR, Brasil). Os casulos foram cortados em pedaços de aproximadamente 1cm² e submetidos ao processo de extração da sericina com o uso de alta temperatura e pressão em autoclave (CS 30, Primatec, Itu, SP, Brasil), a 120°C e pressão de 1kgf/cm², por 60 minutos. A extração ocorreu sem adição de produtos químicos, utilizando-se 6g de casulo para cada 100mL de água destilada. A fibroína foi separada utilizando-se peneira de 18 malhas, e a solução de sericina foi congelada (-20°C) e, posteriormente, liofilizada (LT 1000, Terroni Equipamentos Ltda., São Carlos, SP, Brasil), obtendo-se a sericina em pó.

A determinação da composição de aminoácidos solúveis da sericina foi realizada por cromatografia lí-

quida de ultraeficiência (UPLC), utilizando coluna analítica C18, fase reversa, acoplada a um detector ajustado no comprimento de onda de 214nm, no Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan (São Paulo, SP, Brasil).

Animais e dieta

Todos os procedimentos utilizados foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética Animal institucional (11 de abril de 2014).

Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57Bl/6, com aproximadamente 9 semanas de vida e peso de $26,9 \pm 2,2$ g, mantidos em ambiente controlado (23 a 25°C e ciclo claro-escuro de 12 horas). Após 1 semana de aclimação, foram divididos em dois grupos: Controle (n=14), que recebeu dieta padrão para roedores (Algomix®, Algomix Agroindustrial Ltda., Ouro Verde do Oeste, PR, Brasil) e água; e Obeso (n=14), que recebeu dieta hiperlipídica e água. Após 10 semanas de dieta, cada grupo foi subdividido, formando quatro grupos experimentais, com sete animais cada, submetidos ou não ao tratamento com sericina: Controle e Controle-Sericina; Obeso e Obeso-Sericina. Ao longo de todo o experimento, água e ração padrão ou hiperlipídica foram ofertados *ab libitum*.

Os ingredientes utilizados na composição da dieta hiperlipídica foram adquiridos na indústria Prag Soluções (Jaú, SP, Brasil). A ração foi preparada com a mistura dos componentes (30,07% de amido de milho, 14% de caseína, 12% de sacarose, 4% de óleo de soja, 5% de celulose microcristalina, 3,5% de mix mineral AIN-93M, 1,0% de mix vitamínico AIN-93M, 0,18% de L-cistina, 0,25% de bitartarato de colina e 30% de banha de porco). A ração foi ofertada aos animais na forma de pellets, contendo 32,21% de carboidratos, 10,6% de proteínas e 57,2% de lipídios.

O tratamento com sericina iniciou-se nos Grupos Controle-Sericina e Obeso-Sericina após 10 semanas das respectivas dietas e foi realizado diariamente, no mesmo horário, por 4 semanas consecutivas, utilizando-se a dose de 1.000mg/kg de peso corporal. A administração da sericina foi feita por gavagem, sendo a dose diária diluída em 300µL de salina 0,9%. Os animais dos Grupo Controle e Obeso foram gavados com 300µL de salina 0,9% pura.

Pesagem dos animais, controle alimentar e coleta das fezes

A evolução do peso corporal foi obtida pela pesagem individual dos animais semanalmente. Na última

semana de experimento, os animais foram alocados individualmente em gaiola metabólica por três períodos consecutivos de 12 horas, para a determinação do consumo alimentar. Posteriormente, calculou-se a média do consumo nos três períodos analisados. Após os três períodos de permanência na gaiola metabólica, as fezes dos animais foram coletadas, pesadas, congeladas e utilizadas para a determinação da quantidade total de lipídios.⁽¹⁹⁾

Teste de trânsito intestinal

Quatro dias antes da eutanásia, 300µL de marcador (3g de carmin em 50mL de etilcelulose 0,5%) foram administrados por gavagem aos camundongos. O tempo decorrido da administração do marcador até a eliminação do primeiro pellet fecal colorido (vermelho-róseo) foi utilizado para determinação do trânsito intestinal.⁽²⁰⁾

Teste oral de tolerância à glicose

Dois dias antes da eutanásia e após 8 horas de jejum, os animais foram submetidos ao teste oral de tolerância à glicose (oGTT). Após a pesagem, foi realizada a coleta de sangue pela cauda, para obtenção da glicemia de jejum (tempo 0) com auxílio de glicosímetro (Accu-Chek Active®, Roche Diagnóstica Brasil Ltda., SP, Brasil). Após, os animais receberam glicose na concentração de 2g/kg de massa corporal por gavagem. A glicemia foi verificada aos 15, 30, 60 e 120 minutos após a administração da glicose. A área sob a curva (ASC) foi calculada para cada camundongo usando o software GraphPad Prism 6.0.

Dosagens plasmáticas

Após jejum de 12 horas, os camundongos foram anestesiados intraperitonealmente com cloridrato de xetamina (100mg/kg) e xilazina (10mg/kg) e eutanasiados por exsanguinação do plexo orbital, com auxílio de capilar heparinizado. Após centrifugação (10.000rpm/10 minutos, a 4°C), o plasma foi retirado para dosagem de triglicerídeos e colesterol total, por meio de *kit* comercial, seguindo as instruções do fabricante (Laborclin®, Bioliquid, PR, Brasil), bem como determinação de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), de acordo com as instruções do fabricante (Analisa®, Gold Analisa Diagnóstica Ltda., Belo Horizonte, MG, Brasil). A dosagem da glicemia foi obtida com auxílio do glicosímetro.

Avaliação da obesidade

Ao final das 14 semanas experimentais, com aproximadamente 160 dias de vida, os animais foram pesados, e

as gorduras retroperitoneal e periepididimal foram retiradas e pesadas, para determinação da instalação da obesidade.

Estudos morfológicos

Amostras das gorduras retroperitoneal e periepididimal foram fixadas em paraformaldeído 4% em tampão fosfato-salina (PBS) por 24 horas, desidratadas em série crescente de álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Cortes de 5 μ m de espessura foram corados em hematoxilina e eosina (HE). Em seguida, com o auxílio do programa Image Pro Plus[®] 6.0 (Media Cybernetics, USA), foi mensurada a área de 100 adipócitos por tipo de gordura por animal, distribuídos em 10 pontos aleatórios por corte.

O fígado foi excisado da cavidade abdominal e pesado para determinação da sua massa. Amostras do lobo direito foram coletadas e fixadas em paraformaldeído 4% em PBS por 24 horas, com posterior processamento para inclusão em parafina. Os cortes de 5 μ m de espessura foram corados em HE, para análise da morfologia geral, e tricrômico de Masson, para análise do tecido conjuntivo hepático. A determinação do grau de esteatose de zero a 3 foi adaptada de Kleiner et al.,⁽²¹⁾ sendo grau 0 se até 5%; grau 1 se 5 a 33%; grau 2 se 33 a 66%; e grau 3 se acima de 66% – sendo realizada avaliação duplo-cega.

O intestino delgado foi completamente estendido e mensurado quanto ao seu comprimento total. Amostras do jejuno foram abertas na borda mesentérica, fixadas em paraformaldeído 4% em PBS, e seguiram o procedimento histológico de rotina para inclusão em parafina. Os cortes semisseriados de 6 μ m de espessura foram corados com HE, para análise morfológica e morfométrica, e método histoquímico de ácido periódico-Schiff para evidênciação das células caliciformes.

As análises morfométricas do jejuno foram realizadas no programa Image Pro Plus[®] 6.0 previamente calibrado. No aumento de 200x, foram mensuradas a espessura total da parede intestinal e a altura do vilão, em 10 pontos aleatórios por corte, separados entre si por 30 μ m, perfazendo 50 mensurações por animal. Já no aumento de 400x, foram mensuradas a espessura da túnica muscular, a profundidade da cripta e a largura do vilão, sendo realizadas 50 mensurações por animal para cada análise.

As células caliciformes foram quantificadas no vilão. Para tanto, o número de células caliciformes de um lado do vilão e o número total de células do mesmo lado do vilão foram contadas até um total de aproximadamente 1.500 células por animal. Assim, a porcentagem de células

caliciformes foi calculada como o total de caliciformes corrigido pelo total de células contadas.

Determinação de lipídios hepáticos

Fragmentos de aproximadamente 500mg de fígado por animal foram coletados e imediatamente congelados. Posteriormente, os lipídios hepáticos foram extraídos⁽¹⁹⁾ com determinação do colesterol e triglicerídeos, com os mesmos kits utilizados na determinação plasmática.

Análise estatística

Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média e analisados no programa GraphPad Prism 6.0. Após constatada a normalidade dos dados por meio do teste de Shapiro-Wilk, foi utilizado o teste de Análise de Variância (ANOVA) *two-way* com pós-teste de Tukey, adotando-se $p < 0,05$ como estatisticamente significativo.

RESULTADOS

Composição de aminoácidos da sericina

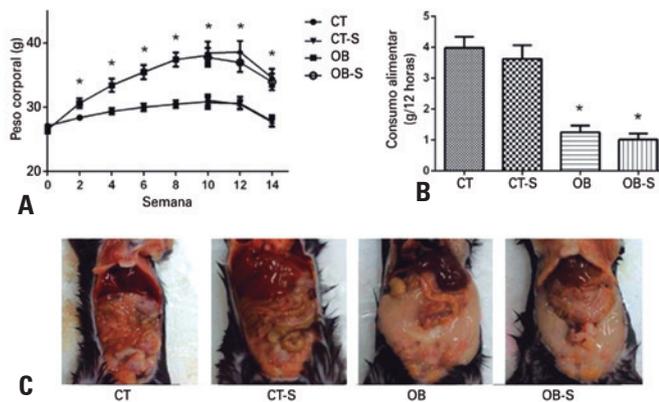
A análise do perfil cromatográfico da sericina, realizada em UPLC, revelou a presença de 17 aminoácidos, com maior percentual de serina, glicina e ácido aspártico (Tabela 1).

Tabela 1. Composição aminoacídica da sericina

Aminoácido	Percentual molar
Ácido aspártico	14,5
Ácido glutâmico	4,85
Serina	30,37
Glicina	27,16
Histidina	2,31
Arginina	2,55
Treonina	1,97
Alanina	0,73
Prolina	2,61
Tirosina	2,89
Valina	1,47
Metionina	0,19
Cisteína	0,84
Isoleucina	0,81
Leucina	2,54
Fenilalanina	0,17
Lisina	4,04

Evolução do peso corporal

A partir da segunda semana de experimento, a ingestão de dieta hiperlipídica favoreceu o aumento estatisticamente significativo do peso corporal em relação aos animais que receberam ração padrão, resultado que se manteve ao longo das 14 semanas de experimento (Figura 1A). A oferta de ração hiperlipídica causou ingestão significativamente menor comparada à ração padrão (Figura 1B), embora tenha promovido o aumento da adiposidade, constatada pelas imagens da cavidade abdominal dos animais (Figura 1C).



Resultados expressos por média \pm erro padrão da média (n=7/grupo). * p<0,01 em relação ao CT e CT-S. Análise de Variância two-way e pós-teste de Tukey. CT: controle; CT-S: controle-sericina; OB: obeso; OB-S: obeso-sericina.

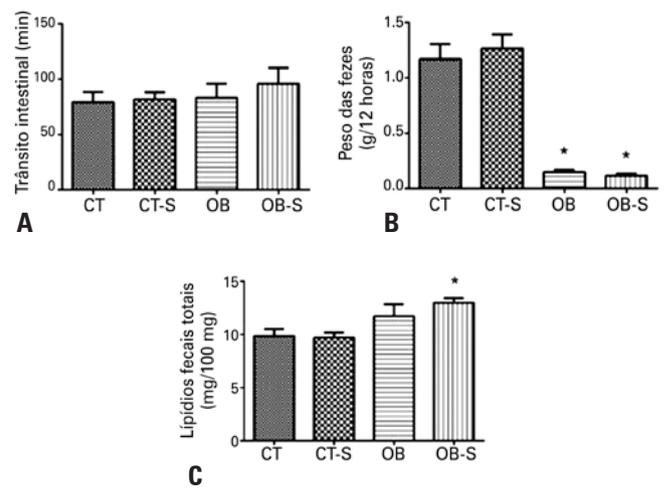
Figura 1. Evolução do peso corporal. Gráfico da evolução do peso corporal (A) e consumo alimentar (B), e fotografias da cavidade abdominal aberta de camundongos C57Bl6 (C)

Teste de trânsito intestinal, peso das fezes e total de lipídios

A obesidade induzida por dieta e o tratamento com sericina não alteraram o tempo de trânsito intestinal dos animais (Figura 2A); entretanto, o volume total de fezes foi estatisticamente menor nos animais que receberam dieta hiperlipídica, o que esteve diretamente relacionado ao menor consumo alimentar observado nestes grupos, independente do tratamento com sericina (Figura 2B). Ainda, no Grupo Obeso-Sericina, houve aumento na quantidade total de lipídios fecais em comparação com as fezes dos animais alimentados com ração padrão (Figura 2C).

Teste oral de tolerância a glicose

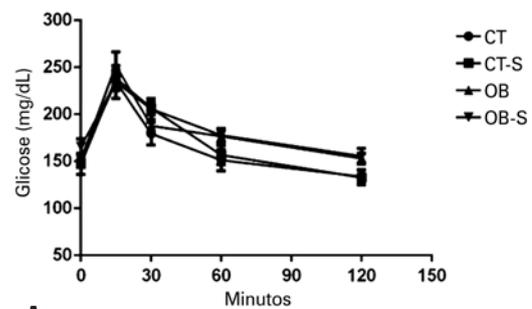
Na figura 3A, verifica-se que no oGTT houve pico glicêmico aos 15 minutos para os animais de todos os grupos, com redução gradual da glicemia ao longo do teste e normalização aos 120 minutos. A ASC da glicemia não foi estatisticamente diferente nos grupos estudados (Figura 3B).



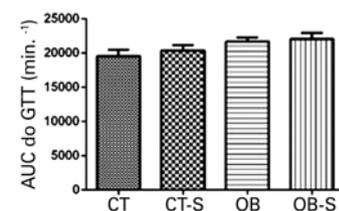
Resultados expressos por média \pm erro padrão da média (n=7/grupo). * p<0,01 em relação ao CT e CT-S. Análise de Variância two-way e pós-teste de Tukey.

CT: controle; CT-S: controle-sericina; OB: obeso; OB-S: obeso-sericina.

Figura 2. Análise do trânsito intestinal e parâmetros fecais. Teste de trânsito intestinal (A), peso das fezes (B), quantidade total de lipídios fecais (C)



A



B

Resultados expressos por média \pm erro padrão da média (n=7/grupo). Análise de Variância two-way e pós-teste de Tukey. CT: controle; CT-S: controle-sericina; OB: obeso; OB-S: obeso-sericina; GTT: teste oral de tolerância à glicose; ASC: área sob a curva.

Figura 3. Resultado do teste oral de tolerância à glicose. Valores de glicemia durante o teste oral de tolerância à glicose (A), área sob a curva do teste oral de tolerância à glicose (B). Resultados expressos em média \pm erro padrão da média (n=7/grupo). Anova Two Way e pós-teste de Tukey

Validação do modelo de obesidade

Os parâmetros biométricos capazes de caracterizar a instalação da obesidade são apresentados na tabela 2. O peso corporal final, o peso da carcaça e o acúmulo de gordura retroperitoneal e periepididimal foram influenciados somente pelo consumo de dieta hiperlipídica, indicando a instalação da obesidade, e o tratamento com sericina não influenciou nesses parâmetros.

Tabela 2. Parâmetros biométricos

Parâmetros biométricos	CT	CT-S	OB	OB-S
Peso corporal final, g	27,3±0,8	27,3±0,6	35,2±1,4* [†]	34,7±1,2* [†]
Peso da carcaça, g	19,9±0,7	20,3±0,6	25,6±1,2* [†]	25,1±1,0* [†]
Gordura retroperitoneal, % peso corporal	0,26±0,04	0,37±0,08	2,06±0,29* [†]	1,98±0,21* [†]
Gordura periepídimal, % peso corporal	0,72±0,06	0,82±0,09	3,92±0,29* [†]	3,66±0,50* [†]

Resultados expressos por média ± erro padrão da média (n=7/grupo). Análise de Variância two-way e pós-teste de Tukey.

* Diferença estatisticamente significativa em relação ao CT; p<0,01; [†] diferença estatisticamente significativa em relação ao CT-S; p<0,01.

CT: controle; CT-S: controle-sericina; OB: obeso; OB-S: obeso-sericina.

Parâmetros plasmáticos

As concentrações plasmáticas de glicose e colesterol total foram influenciadas pelo consumo de dieta hiperlipídica, com aumento estatisticamente significativo nos animais obesos em relação aos controles, sendo que o tratamento com sericina não influenciou nesses parâmetros. Triglicerídeos e AST plasmáticas não diferiram entre os grupos, enquanto a concentração de ALT foi maior nos animais obesos quando comparada à dos animais que receberam ração padrão (Tabela 3).

Tabela 3. Parâmetros plasmáticos

Parâmetros plasmáticos	CT	CT-S	OB	OB-S
Glicose, mg/dL	104,7±3,5	109,9±5,6	155,0±7,9* [†]	153,0±9,4* [†]
Colesterol, mg/dL	81,7±5,5	83,8±3,2	115,7±8,2* [†]	127,0±7,2* [†]
Triglicerídeos, mg/dL	55,4±6,7	58,1±3,0	55,6±4,0	50,7±2,4
ALT, U/L	13,9±2,7	15,0±1,2	29,1±3,8* [†]	30,2±6,3* [†]
AST, U/L	36,0±4,0	34,4±4,6	41,6±6,8	37,9±4,9

Resultados expressos por média ± erro padrão da média (n=7/grupo). Análise de Variância two-way e pós-teste de Tukey.

* Diferença estatisticamente significativa em relação ao CT; p<0,01; [†] diferença estatisticamente significativa em relação ao CT-S; p<0,01.

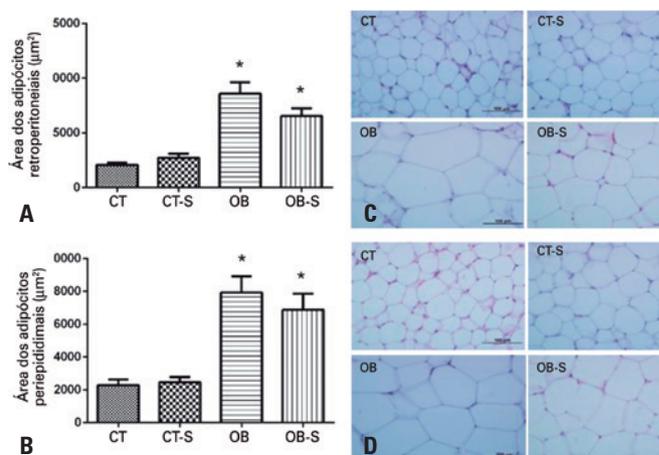
CT: controle; CT-S: controle-sericina; OB: obeso; OB-S: obeso-sericina; ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase.

Morfologia do tecido adiposo

A área dos adipócitos retroperitoneais e periepídimalis foi estatisticamente maior nos animais obesos, em relação aos alimentados com ração padrão (Figuras 4A e 4B). Apesar da discreta redução na área dos adipócitos no Grupo Obeso-Sericina, o tratamento com sericina não interferiu significativamente nesse parâmetro (Figuras 4C e 4D).

Morfologia e análise de lipídios hepáticos

Não houve diferença estatística quanto ao peso do fígado entre os grupos (Figura 5A). A análise de lipídios hepáticos indicou maior quantidade de colesterol e triglicerídeos (p<0,0001) nos animais obesos em relação aos controles (Figura 5B e 5C). Nos camundongos dos

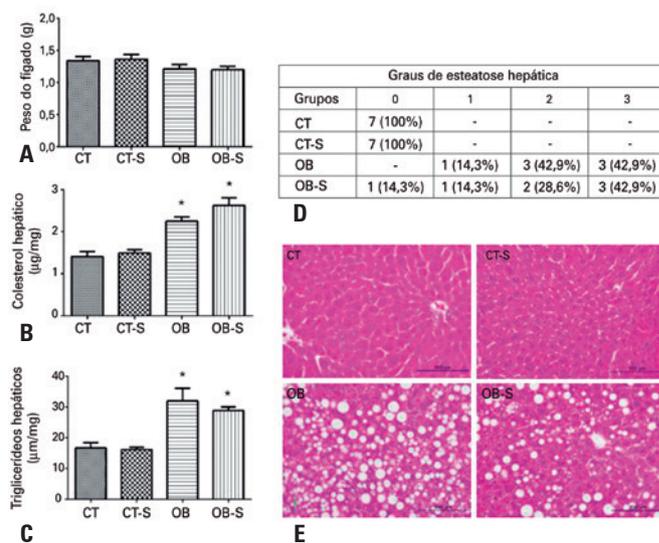


Resultados expressos por média ± erro padrão da média (n=7/grupo). Análise de Variância two-way e pós-teste de Tukey.

* p<0,01 em relação ao CT e CT-S.

CT: controle; CT-S: controle-sericina; OB: obeso; OB-S: obeso-sericina.

Figura 4. Morfometria e morfologia do tecido adiposo. Área dos adipócitos retroperitoneais (A) e periepídimalis (B) fotomicrografias do tecido adiposo retroperitoneal (C) e periepídimal (D) de camundongos, coloração com hematoxilina e eosina



Resultados expressos por média ± erro padrão da média (n=7/grupo). Análise de Variância two-way e pós-teste de Tukey.

* p<0,01 em relação ao CT e CT-S.

CT: controle; CT-S: controle-sericina; OB: obeso; OB-S: obeso-sericina.

Figura 5. Morfologia hepática e análise lipídica do fígado. Peso do fígado (A), análise do colesterol (B), e triglicerídeos (C) hepáticos; classificação de esteatose hepática (D), fotomicrografias do fígado de camundongos e coloração com hematoxilina e eosina (E)

Grupos Controle e Controle-Sericina, não foi verificada a presença de esteatose hepática, sendo os animais classificados como grau zero. Nos Grupos Obeso e Obeso-Sericina foi constatada a presença de esteatose, com variação dos graus obtidos na classificação (Figura 5D). Nos Grupos Obeso e Obeso-Sericina, além da presença de vesículas adiposas (Figura 5E), em alguns animais, o citoplasma dos hepatócitos se mostrou em aspecto de balão, com eventual formação de sincício entre células adjacentes.

Morfometria intestinal

O consumo de dieta hiperlipídica alterou alguns parâmetros da morfometria intestinal, apresentados na tabela 4. O comprimento do intestino delgado foi menor nos animais obesos em relação aos que receberam ração padrão. A altura do vilão foi estatisticamente maior no Grupo Obeso ($p < 0,01$; $p < 0,05$), enquanto houve redução da espessura da camada muscular ($p < 0,01$; $p < 0,05$) dos animais do Grupo Obeso em relação ao Controle e Controle-Sericina, respectivamente. Ainda, houve diminuição na profundidade da cripta nos animais obesos comparados aos controles ($p < 0,05$). As alterações promovidas pelo consumo de dieta hiperlipídica foram revertidas pelo tratamento com sericina no Grupo Obeso-Sericina. A altura total da parede intestinal, largura do vilão e índice de células caliciformes não diferiu entre os grupos estudados.

Tabela 4. Morfometria intestinal

Morfometria intestinal	CT	CT-S	OB	OB-S
Comprimento do intestino delgado, cm	39,7±0,9	39,9±0,6	33,1±0,9*†	33,8±0,9*†
Espessura total da parede intestinal, μm	496,4±17,9	504,7±24,0	558,7±30,6	513,0±17,7
Altura do vilão, μm	306,0±19,9	327,9±13,6	390,2±18,8*†	356,4±8,4
Profundidade da cripta, μm	96,2±3,0	90,2±4,0	78,5±5,6*	84,2±4,7
Largura do vilão, μm	94,0±2,3	95,5±2,5	91,0±1,2	90,5±1,6
Espessura da túnica muscular, μm	51,1±3,6	50,1±3,87	37,2±1,6*†	41,1±1,9
Células caliciformes, %	5,0±0,3	4,7±0,3	4,4±0,3	4,2±0,3

Resultados expressos por média \pm erro padrão da média ($n=7$ /grupo). Análise de Variância two-way e pós-teste de Tukey. * Diferença estatisticamente significativa em relação ao CT; † diferença estatisticamente significativa em relação ao CT-S. CT: controle; CT-S: controle-sericina; OB: obeso; OB-S: obeso-sericina.

DISCUSSÃO

O camundongo C57Bl/6 é um modelo animal suscetível ao desenvolvimento de obesidade induzida por dieta.⁽²²⁾ Constatamos que, apesar da menor ingesta, a dieta hiperlipídica foi eficaz na indução da obesidade, promovendo aumento do peso corporal, acúmulo de gordura e maior concentração plasmática de colesterol e glicose nos camundongos. Esses dados estão de acordo com a literatura atual,⁽²³⁻²⁶⁾ segundo a qual o consumo de dietas ricas em lipídios saturados, como a usada neste estudo, induzem à obesidade.

Apesar do maior consumo de lipídios, não houve aumento na concentração plasmática de triglicerídeos nos animais obesos, resultado encontrado também em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica⁽²⁴⁻²⁶⁾ e em ratos.⁽²³⁾ Provavelmente, a concentração sérica de triglicerídeos não foi alterada devido ao redireciona-

mento dessas moléculas para outros tecidos, principalmente o tecido adiposo, no qual são armazenados.⁽²⁷⁾ Hipertrofia ou hiperplasia costumam ser respostas dos adipócitos frente ao acúmulo de triglicerídeos.⁽²⁸⁾ Constatamos o aumento da massa de gordura depositada nas regiões retroperitoneal e periepídica, bem como aumento na área dos adipócitos dos animais obesos. Além da hipertrofia, os adipócitos podem sofrer com alterações na homeostase celular, como hipóxia, infiltração de macrófagos, fibrose e resistência à insulina no tecido adiposo, condições que podem culminar na síndrome metabólica.⁽²⁹⁾

Partículas remanescentes de gordura são removidas da circulação pelo fígado,⁽²⁷⁾ que passa a acumular quantidades significativas de lipídios em indivíduos obesos, caracterizando a DHGNA.⁽⁸⁾ Verificamos que houve aumento da quantidade de triglicerídeos e colesterol hepáticos, bem como o acúmulo de gordura na forma de vesículas no fígado dos camundongos obesos. O aparecimento de vesículas brancas na coloração em HE do fígado comprova a esteatose hepática,⁽²⁵⁾ condição morfológica também evidenciada em camundongos⁽²⁴⁾ e em ratos.⁽¹⁸⁾ A análise bioquímica revelou aumento na concentração sérica de ALT nos camundongos obesos, embora estudos recentes difiram quanto ao efeito da obesidade sobre as transaminases hepáticas, visto que os mesmos não são unânimes quanto ao uso dos modelos animais e às dietas utilizadas. Sung et al.,⁽²⁵⁾ não verificaram alterações nas concentrações das transaminases, enquanto Choi et al.,⁽³⁰⁾ não observaram mudanças na concentração de ALT. Pang et al.,⁽²⁶⁾ só observaram aumento de AST nos camundongos obesos por dieta hiperlipídica. Ainda, Abd El-Kader et al.,⁽⁸⁾ ressaltam que as enzimas hepáticas podem estar normais ou minimamente alteradas na DHGNA.

Além de seu papel essencial na digestão e na absorção dos nutrientes, o intestino delgado pode rapidamente alterar seu metabolismo em resposta ao maior conteúdo luminal de lipídios,⁽⁴⁾ o que pode estar relacionado com a progressão da síndrome metabólica em outros órgãos.^(31,32) A oferta de dieta hiperlipídica promoveu a redução no comprimento do intestino delgado e o aumento na altura dos vilões, associados à diminuição da profundidade da cripta e da espessura da túnica muscular no jejuno dos animais estudados. Com exceção da espessura da túnica muscular, resultados morfométricos similares foram previamente encontrados em camundongos *Swiss* alimentados com dieta hiperlipídica por 8 semanas.⁽⁶⁾ Como o consumo alimentar dos animais obesos foi menor, as alterações na mucosa não podem ser relacionadas à hiperfagia,⁽⁵⁾ e sim ao tipo de

alimento.⁽³⁾ A maior área de absorção intestinal promovida pelo aumento da altura do vilão⁽⁵⁾ provavelmente resultou no ganho de peso dos animais obesos. Dietas de consistência mais líquida, como a hiperlipídica, podem não alterar a morfologia da cripta, ao mesmo tempo em que promovem redução da espessura da túnica muscular,⁽³³⁾ como verificado no presente estudo, devido à provável diminuição da motilidade do trato gastrointestinal. Evidências experimentais têm demonstrado que dietas hiperlipídicas podem ainda causar perda neuronal no plexo mioentérico,⁽³⁴⁾ promovendo redução da espessura muscular, e, conseqüentemente, reduzir a motilidade intestinal. Apesar da aparente redução do peristaltismo necessário à digestão e à absorção da dieta hiperlipídica, o tempo de trânsito intestinal e o índice de células caliciformes, produtoras de muco para a proteção e lubrificação do epitélio intestinal,⁽³⁾ não foram diferentes entre os grupos estudados, demonstrando que não houve alteração na função.

A sericina utilizada no presente estudo foi extraída sem utilização de qualquer aditivo químico, obtendo-se um produto final sem impureza⁽¹⁸⁾ e composto por 17 aminoácidos, sendo que serina, glicina e ácido aspártico correspondem a mais de 72% da proteína. Composição aminoacídica semelhante foi descrita anteriormente,^(13,15,17) confirmando a característica hidrofílica da sericina. Quando administrada aos camundongos do Grupo Controle-Sericina, a proteína não promoveu alteração plasmática ou morfológica nos tecidos analisados, confirmando o uso seguro para consumo.^(16,35)

Apesar de não ter revertido as alterações plasmáticas e biométricas promovidas pela obesidade induzida por dieta hiperlipídica, o tratamento com sericina restaurou a morfometria intestinal. Segundo Sasaki et al.,⁽³⁵⁾ a sericina é uma proteína de baixa digestibilidade, que pode permanecer por maior tempo no lúmen intestinal.⁽³⁶⁾ Assim, as alterações promovidas pelo acúmulo de lipídios são revertidas pela presença de sericina, que está em contato com a mucosa intestinal. Além disso, verificamos que o tratamento com sericina promoveu maior excreção de lipídios nas fezes. Resultado similar foi encontrado previamente,⁽¹⁶⁾ utilizando quantidades equivalentes de sericina e fibroína em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica. Segundo Limpeanchob et al.,⁽¹⁷⁾ a sericina reduz a absorção de colesterol em células Caco-2, bem como sua solubilização em micelas, promovendo a diminuição da concentração plasmática de colesterol. Assim, a presença de sericina no lúmen do intestino delgado parece interferir na absorção dos lipídios da dieta, que são, então, eliminados em maior quantidade nas fezes.

Outros estudos verificaram que o consumo de sericina pode exercer efeito protetor às alterações metabólicas promovidas por dietas obesogênicas. Dentre os efeitos, podem ser destacados: inibição do ganho de peso e acúmulo de massa adiposa, melhora do perfil lipídico plasmático e da tolerância à glicose, redução da concentração de mediadores inflamatórios (leptina, resistina e TNF- α) e aumento de adiponectina, bem como diminuição da atividade de enzimas lipogênicas no tecido adiposo e hepático, associado ao aumento da betaoxidação no fígado.^(15,16) Recentemente, em um estudo com ratos com hipercolesterolemia e hiperglicemia induzidas, a sericina reduziu o colesterol plasmático e reverteu os danos mitocondriais no coração e fígado. Ainda, atenuou a esteatose hepática, ao mesmo tempo em que diminuiu o estresse oxidativo no órgão, características que podem ser associadas à propriedade antioxidante da sericina.⁽¹⁸⁾

Cabe ressaltar que ainda não estão completamente elucidados na literatura os efeitos da proteína sericina, sobretudo quando aplicada como medida terapêutica na obesidade induzida por dieta hiperlipídica, modelo que reproduz o estilo ocidental. Duas alterações promovidas pela dieta hiperlipídica no presente estudo foram revertidas pelo uso de sericina por 4 semanas, de modo que maior tempo de tratamento pode revelar resultados mais significativos. Ainda, considerando que o intestino delgado é um dos primeiros órgãos a se adaptar às dietas obesogênicas,⁽⁴⁾ o reestabelecimento da morfometria intestinal indica que a sericina apresenta potencial tratamento para a obesidade.

CONCLUSÃO

O consumo de dieta hiperlipídica foi responsável pela instalação da obesidade, caracterizada por alterações biométricas e plasmáticas nos camundongos, que não foram revertidas pelo tratamento. A dose de 1.000mg/kg de sericina, extraída do casulo de *Bombyx mori*, promoveu maior eliminação de lipídios fecais, bem como restabeleceu a morfometria da parede jejunal nos camundongos obesos.

INFORMAÇÃO DOS AUTORES

Kunz RI: <http://orcid.org/0000-0003-1510-7022>

Capelassi AN: <http://orcid.org/0000-0001-8477-8247>

Alegre-Maller AC: <http://orcid.org/0000-0003-3777-7406>

Bonfleur ML: <http://orcid.org/0000-0001-5526-7421>

Ribeiro LF: <http://orcid.org/0000-0001-5174-7399>

Costa RM: <http://orcid.org/0000-0002-5344-5076>

Natali MR: <http://orcid.org/0000-0002-7486-2581>

REFERÊNCIAS

1. Harper JW, Zisman TL. Interaction of obesity and inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2016;22(35):7868-81. Review.
2. de Wit NJ, Bosch-Vermeulen H, de Groot PJ, Hooiveld GJ, Bromhaar MM, Müller M, et al. The role of the small intestine in the development of dietary fat-induced obesity and insulin resistance in C57BL/6J mice. *BCM Med Genomics*. 2008;1:14.
3. Scoaris CR, Rizo GV, Roldi LP, de Moraes SM, de Proença AR, Peralta RM, et al. Effects of cafeteria diet on the jejunum in sedentary and physically trained rats. *Nutrition*. 2010;26(3):312-20.
4. Clara R, Schumacher M, Ramachandran D, Fedele S, Krieger JP, Langhans W, et al. Metabolic adaptation of the small intestine to short- and medium-term high-fat diet exposure. *J Cell Physiol*. 2017;232(1):167-75.
5. Mao J, Hu X, Xiao Y, Yang C, Ding Y, Hou N, et al. Overnutrition stimulates intestinal epithelium proliferation through β -catenin signaling in obese mice. *Diabetes*. 2013;62(11):3736-46.
6. Soares A, Beraldi EJ, Ferreira PE, Bazotte RB, Buttow NC. Intestinal and neuronal myenteric adaptations in the small intestine induced by a high-fat diet in mice. *BMC Gastroenterol*. 2015;15:3.
7. Hernandez-Rodas MC, Valenzuela R, Videla LA. Relevant aspects of nutritional and dietary interventions in non-alcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci*. 2015;16(10):25168-98. Review.
8. Abd El-Kader SM, El-Den Ashmawy EM. Non-alcoholic fatty liver disease: the diagnosis and management. *World J Hepatol*. 2015;7(6):846-58. Review.
9. Chin SH, Kahathuduwa CN, Binks M. Physical activity and obesity: what we know and what we need to know. *Obes Rev*. 2016;17(12):1226-44. Review.
10. Phillips CM. Metabolically healthy obesity across the life course: epidemiology, determinants, and implications. *Ann N Y Acad Sci*. 2017;1391(1):85-100. Review.
11. Yoo SR, Lee MY, Kang BK, Shin HK, Jeong SJ. Soshiho-tang aqueous extract exerts antiobesity effects in high fat diet-fed mice and inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2016;2016:2628901.
12. Mondal M, Trivedy K, Kumar SN. The silk proteins, sericin and fibroin in silkworm, *Bombyx mori* Linn., - a review. *Caspian J Env Sci*. 2007;5(2):63-76. Review.
13. Kato N, Sato S, Yamanaka A, Yamada H, Fuwa N, Nomura M. Silk protein, sericin, inhibits lipid peroxidation and tyrosinase activity. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1998;62(1):145-7.
14. Sehna F. Prospects of the practical use of silk sericins. *Entomol Res*. 2008;38:S1-8.
15. Okazaki Y, Kakehi S, Xu Y, Tsujimoto K, Sasaki M, Ogawa H, et al. Consumption of sericin reduces serum lipids, ameliorates glucose tolerance and elevates serum adiponectin in rats fed a high-fat diet. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2010;74(8):1534-8.
16. Seo CW, Um IC, Rico CW, Kang MY. Antihyperlipidemic and body fat-lowering effects of silk proteins with different fibroin/sericin compositions in mice fed with high fat diet. *J Agric Food Chem*. 2011;59(8):4192-7.
17. Limpeanchob N, Trisat K, Duangjai A, Tiyaboonchai W, Pongcharoen S, Sutheraawattananonda M. Sericin reduces serum cholesterol in rats and cholesterol uptake into Caco-2 cells. *J Agric Food Chem*. 2010;58(23):12519-22.
18. Ampawong S, Isarangkul D, Aramwit P. Sericin ameliorated dysmorphic mitochondria in high-cholesterol diet/streptozotocin rat by antioxidative property. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2017;242(4):411-21.
19. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*. 1957;226(1):497-509.
20. Nagakura Y, Naitoh Y, Kamato T, Yamano M, Miyata K. Compounds possessing 5-HT₃ receptor antagonistic activity inhibit intestinal propulsion in mice. *Eur J Pharmacol*. 1996;311(1):67-72.
21. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu YC, Torbenson MS, Unalp-Arida A, Yeh M, McCullough AJ, Sanyal AJ; Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005;41(6):1313-21.
22. Lutz TA, Woods SC. Overview of animal models of obesity. *Curr Protoc Pharmacol*. 2012;Chapter 5:Unit5.61. Review.
23. Lee JS, Bok SH, Jeon SM, Kim HJ, Do KM, Park YB, et al. Antihyperlipidemic effects of buckwheat leaf and flower in rats fed a high-fat diet. *Food Chem*. 2010;119(1):235-40.
24. Dixon LJ, Flask CA, Papouchado BG, Feldstein AE, Nagy LE. Caspase-1 as a central regulator of high fat diet-induced non-alcoholic steatohepatitis. *PLoS One*. 2013;8(2):e56100.
25. Sung J, Jeong HS, Lee J. Effect of the capsicoside G-rich fraction from pepper (*Capsicum annuum* L.) seeds on high-fat diet-induced obesity in mice. *Phytother Rev*. 2016;30(11):1848-55.
26. Pang J, Xi C, Huang X, Cui J, Gong H, Zhang T. Effects of excess energy intake on glucose and lipid metabolism in C57BL/6 mice. *PLoS One*. 2016;11(1):e0146675.
27. Hussain MM. Intestinal lipid absorption and lipoprotein formation. *Curr Opin Lipidol*. 2014;25(3):200-6. Review.
28. Rutkowski JM, Stern JH, Scherer PE. The cell biology of fat expansion. *J Cell Biol*. 2015;208(5):501-12. Review.
29. Konige M, Wang H, Sztalryd C. Role of adipose specific lipid droplet proteins in maintaining whole body energy homeostasis. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1842(3):393-401. Review.
30. Choi RY, Ham JR, Lee MK. Esculetin prevents non-alcoholic fatty liver in diabetic mice fed high-fat diet. *Chem Biol Interact*. 2016;260:13-21.
31. De Wit N, Derrien M, Bosch-Vermeulen H, Oosterink E, Keshtkar S, Duval C, et al. Saturated fat stimulates obesity and hepatic steatosis and affects gut microbiota compositions by an enhanced overflow of dietary fat to the distal intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2012;303(5):G589-99.
32. Duca FA, Sakar Y, Covasa M. The modulatory role of high fat feeding on gastrointestinal signals in obesity. *J Nutr Biochem*. 2013;24(10):1663-77. Review.
33. Vrabцова M, Mikuska L, Vazan R, Miko M, Varga I, Mravec B. Effect of chronic intake of liquid nutrition on stomach and duodenum morphology. *Acta Histochem*. 2016;118(4):435-42.
34. Beraldi EJ, Soares A, Borges SC, de Souza AC, Natali MR, Bazotte RB, et al. High-fat diet promotes neuronal loss in the myenteric plexus of the large intestine in mice. *Dig Dis Sci*. 2015;60(4):841-9.
35. Sasaki M, Yamada H, Kato N. A resistant protein, sericin improves atropine-induced constipation in rats. *Food Sci Technol Res*. 2000;6(4):280-3.
36. Zhaorigetu S, Sasaki M, Kato N. Consumption of sericin suppresses colon oxidative stress and aberrant crypt foci in 1,2-dimethylhydrazine-treated rats by colon undigested sericin. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2007;53(3):297-300.