

## **Avaliação do uso de amido resistente na prevenção de colite provocada pelo antibiótico tetraciclina**

**Evaluation of the use of resistant starch in the prevention of colitis caused by the antibiotic tetracycline**

**Evaluación del uso de almidón resistente en la prevención de la colitis causada por el antibiótico tetraciclina**

Recebido: 14/08/2022 | Revisado: 21/08/2022 | Aceito: 22/08/2022 | Publicado: 30/08/2022

### **Armindo Antonio Alves**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3091-4818>  
Centro Universitário Herminio Ometto de Araras, Brasil  
E-mail: [alvesaa@uol.com.br](mailto:alvesaa@uol.com.br)

### **Bruna Lago Tagliapietra**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3041-4768>  
Universidade Estadual de Campinas, Brasil  
E-mail: [bruna\\_tagliapietra@hotmail.com](mailto:bruna_tagliapietra@hotmail.com)

### **Grasiela Dias de Campos Severi-Aguiar**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3321-3830>  
Centro Universitário Herminio Ometto de Araras, Brasil  
E-mail: [grazielaaguiar@terra.com.br](mailto:grazielaaguiar@terra.com.br)

### **Mariana Wood Mello**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9753-5145>  
Centro Universitário Herminio Ometto de Araras, Brasil  
E-mail: [mmariana.pelissari@yahoo.com.br](mailto:mmariana.pelissari@yahoo.com.br)

### **Débora Regina Delgado**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9972-9437>  
Centro Universitário Herminio Ometto de Araras, Brasil  
E-mail: [debora.rdelgado@gmail.com](mailto:debora.rdelgado@gmail.com)

### **Acácio Antônio Pigoso**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9415-5278>  
Centro Universitário Herminio Ometto de Araras, Brasil  
E-mail: [acaciopigoso@fho.edu.br](mailto:acaciopigoso@fho.edu.br)

### **Yoon Kil Chang**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5897-1681>  
Universidade Estadual de Campinas, Brasil  
E-mail: [yoonkilch@gmail.com](mailto:yoonkilch@gmail.com)

### **Maria Teresa Pedrosa Silva Clerici**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8445-336X>  
Universidade Estadual de Campinas, Brasil  
E-mail: [mclerici@unicamp.br](mailto:mclerici@unicamp.br)

### **Resumo**

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de dietas com amidos resistentes na prevenção da ocorrência e/ou gravidade da colite pseudomembranosa de animais tratados com e sem o antibiótico tetraciclina. O experimento foi realizado com 20 ratos *wistar* fêmeas, divididos em quatro grupos que receberam diferentes dietas: amido pré-gelatinizado com 9,5% de amido resistente; amido pré-gelatinizado com 9,5% de amido resistente e tetraciclina; amido pré-gelatinizado e amido resistente com 18,1% de amido resistente e amido pré-gelatinizado e amido resistente com 18,1% de amido resistente e tetraciclina. O peso, consumo de ração e água foram monitorados durante 21 dias e realizado análise de colesterol total, triglicérides e glicogênio hepático, muscular e cardíaco. Foi realizado análise histológica de coloração pela hematoxilina-eosina e pelo ácido periódico de Schiff do intestino grosso dos animais. Os resultados demonstraram alterações na citoarquitetura do colo intestinal dos animais, que variaram de acordo com o tratamento a que foram submetidos, mostrando desde atrofia da mucosa nos animais que receberam tetraciclina, a formação de edema e congestionamento de vasos na submucosa nos animais alimentados com 18,1% de amido resistente e a presença de debris celulares na luz do órgão e perda da bordadura em escova quando este foi associado a tetraciclina, demonstrando modificações na absorção e no funcionamento intestinal dos animais, o que contribui para a perda de homeostasia do órgão.

**Palavras-chave:** Amido resistente; Dietas experimentais; Análise histológica; Triglicérides; Glicogênio; Colesterol.

### Abstract

This study aimed to evaluate the effect of diets with resistant starches in preventing the occurrence and/or severity of pseudomembranous colitis in animals treated with and without the antibiotic tetracycline. The experiment was carried out with 20 female Wistar rats, divided into four groups that received different diets: pregelatinized starch with 9.5% resistant starch; pregelatinized starch with 9.5% resistant starch and tetracycline; pregelatinized starch and resistant starch with 18.1% resistant starch and pregelatinized starch and resistant starch with 18.1% resistant starch and tetracycline. Weight, feed and water consumption were monitored for 21 days and analysis of total cholesterol, triglycerides and liver, muscle and cardiac glycogen were performed. Histological analysis of staining by hematoxylin-eosin and periodic acid Schiff of the animals' large intestine was performed. The results showed changes in the cytoarchitecture of the intestinal colon of the animals, which varied according to the treatment to which they were submitted, showing from mucosal atrophy in animals that received tetracycline, the formation of edema and congestion of vessels in the submucosa in animals fed 18.1% of resistant starch and the presence of cellular debris in the lumen of the organ and loss of brush border when it was associated with tetracycline, demonstrating changes in the absorption and intestinal functioning of the animals, which contributes to the loss of organ homeostasis.

**Keywords:** Resistant starch; Experimental diets; Histological analysis; Triglycerides; Glycogen; Cholesterol.

### Resumen

Este estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de las dietas con almidones resistentes en la prevención de la aparición y/o gravedad de la colitis pseudomembranosa en animales tratados con y sin el antibiótico tetraciclina. El experimento se realizó con 20 ratas Wistar hembra, divididas en cuatro grupos que recibieron diferentes dietas: almidón pregelatinizado con 9,5% de almidón resistente; almidón pregelatinizado con 9,5% de almidón resistente y tetraciclina; almidón pregelatinizado y almidón resistente con 18,1% de almidón resistente y almidón pregelatinizado y almidón resistente con 18,1% de almidón resistente y tetraciclina. Se controló el peso, el consumo de alimento y agua durante 21 días y se realizaron análisis de colesterol total, triglicéridos y glucógeno hepático, muscular y cardíaco. Se realizó el análisis histológico de la tinción con hematoxilina-eosina y ácido peryódico de Schiff del intestino grueso de los animales. Los resultados mostraron cambios en la citoarquitectura del colon intestinal de los animales, la cual varió de acuerdo al tratamiento al que fueron sometidos, mostrándose desde atrofia mucosa en animales que recibieron tetraciclina, formación de edema y congestión de vasos en la submucosa en animales alimentado con 18,1% de almidón resistente y la presencia de restos celulares en la luz del órgano y pérdida del borde en cepillo cuando se asoció con tetraciclina, demostrando cambios en la absorción y funcionamiento intestinal de los animales, lo que contribuye a la pérdida de homeostasis de órganos.

**Palabras clave:** Almidón resistente; Dietas experimentales; Análisis histológico; Triglicéridos; Glucógeno; Colesterol.

## 1. Introdução

O amido desempenha um papel importante na nutrição humana fornecendo energia metabólica que permite ao corpo desempenhar suas diferentes funções (Liu et al., 2005). Nutricionalmente, o amido pode ser agrupado com base em sua taxa e extensão da digestão em amido de digestão rápida (ADR), amido de digestão lenta (ADL) e amido resistente (AR) (Englyst et al., 1992). Recentemente, o consumo de AR tem ganhado cada vez mais atenção devido aos seus benefícios promotores da saúde e as suas propriedades funcionais, pois ele resiste a ação das enzimas digestivas humanas e pode ser fermentado no intestino grosso pela microbiota (González-Soto et al., 2004; Fuentes-Zaragoza et al., 2011).

A incorporação de AR na dieta é uma das formas de diminuir o índice glicêmico dos alimentos (Agama-Acevedo et al., 2012; Odenigbo et al., 2013). Como uma porção do AR pode ser lentamente decomposto em todo o intestino delgado, pode haver liberação lenta de glicose, levando a redução da resposta pós-prandial, promoção da regulação da glicose no diabetes e controle do peso corporal dos obesos, reduzindo as respostas glicêmicas e insulinêmicas aos alimentos (Jideani et al., 2011). Apesar de ser considerado fibra alimentar, ainda não está bem estabelecido se ele pode ser usado nas mesmas concentrações que a fibra, incluindo o fato de que ele pode estar em cinco diferentes formas (AR tipo 1, AR tipo 2, AR tipo 3, AR tipo 4 e AR tipo5) (Englyst et al., 1992; Liu, 2005).

A capacidade do AR de prevenir doenças como diabetes, obesidade, câncer e inflamação no cólon vem sendo investigadas. Sun et al. (2018) relataram que uma dieta com AR2 (amido cru fisicamente inacessível) produziu efeitos antidiabéticos ao melhorar a disfunção pancreática em ratos diabéticos tipo 2. Haenen et al. (2013) descobriram que uma dieta rica em AR pode modular a composição da microbiota e as concentrações de ácidos graxos de cadeia curta. Já Alves et al.

(2021) demonstraram que a dieta com 20% de AR3 induziu modificações tanto no metabolismo de lipídios quanto no de carboidratos, sendo que a dieta com maior quantidade de AR3 demonstrou manter os níveis de glicogênio hepático, diminuir o glicogênio muscular e os lipídeos circulantes e aumentar a oxidação muscular dos ácidos graxos levando à diminuição na síntese e aumento do catabolismo destes substratos pelo organismo.

Os efeitos das fibras tanto solúveis quanto insolúveis no sistema digestório já estão bem estabelecidos (Bernaud & Rodrigues, 2013), que vão desde aumento da saciedade, com digestão mais lenta de nutrientes, aumento da motilidade intestinal, necessidade de aumento de consumo de água e em alguns casos, ocorre a interferência da fibra na absorção de medicamentos. O uso de antibióticos é a causa mais comum de mudanças na microbiota intestinal normal, podendo ocasionar doenças como a colite pseudomembranosa (CPM). A colite pseudomembranosa se caracteriza pela presença, na mucosa do cólon com severa inflamação, de placas amarelas/esbranquiçadas ou pseudomembranas formadas por exsudado inflamatório, constituído por fibrina, muco, neutrófilos e células epiteliais necrosadas (Rodríguez-Pardo et al, 2013). Antes da era dos antibióticos, a colite pseudomembranosa era considerada basicamente uma complicação da cirurgia intestinal. Após a introdução de antibióticos, no início da década de 1950, reconheceu-se que a administração dessas drogas, principalmente de tetraciclina e cloranfenicol, predispõe à colite pseudomembranosa (Rubin & Farber, 2002). Os antibióticos têm desempenhado um papel fundamental no controle de doenças infecciosas em humanos, no entanto o uso indiscriminado tem aumentado ao longo do tempo, sendo que há muitos riscos quanto aos efeitos adversos, que devem ser monitorados durante todo o tratamento.

Considerando esses fatores e a importância que o amido resistente tem demonstrado em intervenções dietéticas, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito de dietas com amidos resistentes na prevenção da ocorrência e/ou gravidade da colite pseudomembranosa de animais tratados com e sem antibiótico tetraciclina.

## 2. Metodologia

### 2.1 Matéria-prima e animais

O amido de milho natural foi doado pela CornProducts®. O amido de milho resistente (HI-MAIZE® 260, amido R2) foi doado pela National Starch Food Innovation®. A mistura de vitaminas e de sais minerais foi doada pela Agrocere® e todos os outros ingredientes utilizados foram de pureza analítica.

Foram usados 20 ratos *Wistar* fêmeas, recém desmamadas, com 21 dias, adquiridos do Biotério Central da Unicamp/CEMIB. Durante todo o experimento os animais foram mantidos em gaiolas individuais em ambiente controlado (temperatura  $21 \pm 1$  °C e ciclo claro/escuro de 12 horas com acesso *ad libitum* a dieta e água durante 15 dias). Os animais foram divididos em quatro grupos e submetidos a diferentes dietas. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da Uniararas, Brasil, sob o protocolo nº 109/2006, e os animais manuseados de acordo com os Princípios Éticos para Pesquisa Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

### 2.2 Composição química e produção das dietas

A composição dos amidos utilizados nesse estudo foi realizada anteriormente pelos mesmos pesquisadores (Alves et al., 2021). O amido pré-gelatinizado para uso nas dietas foi cozido em autoclave a uma temperatura de 121°C, por 30 minutos na proporção 1:8 (amido:água). Após o preparo, a mistura foi seca em estufa de circulação de ar a 60°C, por 24 horas, após secagem, o amido pré-gelatinizado foi moído e determinado o teor de amido resistente (Goñi et al., 1996).

Foram elaboradas 4 dietas (Figura 1) segundo normas do AIN-93 (Reeves et al., 1993). Nas dietas APG e APG+T foi usado o amido pré-gelatinizado, contendo 9,5% de amido resistente que junto com a celulose, corresponde a um teor de fibras totais de 17,5%. Nas dietas AR e AR+T foi usado amido pré-gelatinizado e amido resistente, para atingir 18,1% de AR, com

um total de 26,1% de fibras totais. Todas as dietas estão dentro das recomendações da *American Diabetes Association* (ADA, 1993), que varia de 15 a 30% de fibras.

As dietas foram preparadas pela mistura dos ingredientes em batedeira não industrial com adição de água até formar uma liga, da qual se prepararam pequenos bolos que foram secos a 50°C por 36 horas. Após a preparação, a ração foi mantida refrigerada até ao momento de ser oferecida aos animais.

**Figura 1.** Grupo dos animais e composição de macronutrientes das respectivas dietas.

Nutrientes (g/1000g)	DIETAAPG Amido pré-gelatinizado	DIETAARP Amido resistente e amido pré-gelatinizado	DIETAAPG+T Amido pré-gelatinizado + Tetraciclina	DIETAARP+T Amido resistente e amido pré-gelatinizado + Tetraciclina
Amido pré-gelatinizado	600	400	600	400
Amido resistente	0	200	0	200
Celulose	80	80	80	80
Caseína	200	200	200	200
Sais minerais	35	35	35	35
Vitaminas	15	15	15	15
Óleo de Milho	70	70	70	70
% de AR	9,5	18,1	9,5	18,1
Antibiótico Tetraciclina**	não	não	20 mg/Kg	20 mg/Kg

\*\* Dose diária

Fonte: Autores.

Todas as dietas continham as mesmas concentrações de sais minerais e vitaminas, conforme descrito na Tabela 1.

**Tabela 1.** Composição de micronutrientes das dietas.

Micronutriente	Quantidade/kg de ração	Micronutriente	Quantidade/kg de ração
Vitamina A	12.000 UI	Ácido Fólico	1 mg
Vitamina D	3.180 UI	Biotina	0,05 mg
Vitamina E	30 mg	Ferro	50 mg
Vitamina K	3 mg	Zinco	60 mg
Vitamina B1	5 mg	Cobre	10 mg
Vitamina B2	6 mg	Iodo	2 mg
Vitamina B6	7 mg	Manganês	60 mg
Vitamina B12	20 µg	Selênio	0,05 mg
Niacina	60 mg	Cobalto	1,5 mg
Ácido Pantotênico	20 mg		

\* Conforme descrito por Reeves et al. (1993). Fonte: Autores.

### 2.3 Protocolo experimental

Os quatro grupos de animais foram submetidos a uma fase de adaptação de quatro dias, onde foi oferecido aos animais as dietas descritas (Figura 1), com exceção do antibiótico tetraciclina. Após esse período, foi iniciada a fase de experimentação, com duração de 10 dias.

Os animais foram pesados diariamente e também houve monitoramento do consumo de ração e água. Os animais dos grupos APG+T e ARP+T receberam pelo método de gavagem, uma vez ao dia durante 9 dias, uma alíquota (0,1 mL/10g p.c) (Ribeiro et al., 2003) de água potável, contendo a tetraciclina na concentração desejada para uso veterinário em animais de

pequeno porte de 20 mg/Kg (Vieira & Pinheiro, 2004). Os animais dos grupos APG e ARP receberam apenas água, para que os animais fossem expostos às mesmas condições de estresse. No final do experimento, os animais foram anestesiados com tiopental (1 mL de uma solução 2%) e o sangue extraído por punção cardíaca. Em seguida foram extraídos o músculo gastrocnêmico, o fígado, o coração, e parte do intestino grosso. Com o sangue foi preparado soro por coagulação a 37° C por 30 minutos.

#### **2.4 Bioquímica**

O colesterol total e os triglicerídeos foram determinados por espectrofotometria através de kits comerciais da Laborlab®. Os resultados foram expressos em mg.dL<sup>-1</sup> de plasma. A concentração de glicogênio muscular, hepático e cardíaco foi determinada utilizando o método proposto por Lo et al. (1970). Utilizou-se 200 mg de tecido tratado com 1 mL de KOH 30% saturado com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, por alguns minutos em banho-maria fervente até a dissolução total do tecido. Após extração com 2 mL de etanol, esperou-se 10 minutos para precipitar o carboidrato, ficando apenas o glicogênio. Posteriormente, o sobrenadante foi retirado por centrifugação a 3000rpm por 15 minutos, ficando apenas o glicogênio no fundo do tubo. Após adição de 4 mL de água a amostra foi agitada e 100mL transferido para um tubo de ensaio e acrescentado 500 µL de fenol a 0,1% e 2 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. A concentração de glicose foi determinada no espectrofotômetro em comprimento de onda de 420 nm.

#### **2.5 Histologia**

Ao término do tratamento, todos os animais foram anestesiados via intraperitoneal com xilasina (1mg/kg) e ketamina (8mg/kg) e foi realizada laparotomia medial, rebatendo-se a arcada dorsal e amostras de porções do intestino foram coletadas. Após a dissecação, os fragmentos foram banhados na solução fixadora de formol a 10% em tampão Millonig pH 7,4 durante 24h à temperatura ambiente. Em seguida, os fragmentos foram desidratados, diafanizados e embebidos em Paraplast<sup>®</sup> (Merck). Cortes transversais com 6 µm de espessura foram tratados pelas técnicas de Hematoxilina/Eosina (HE) para histologia de rotina e Periódico Acido-Schiff (PAS) para evidenciação dos glicoconjugados (Beçak & Paultete, 1976; Behmer et al., 2003). Os preparados foram observados e documentados em Fotomicroscópio Leica DM2000.

#### **2.6 Estatística**

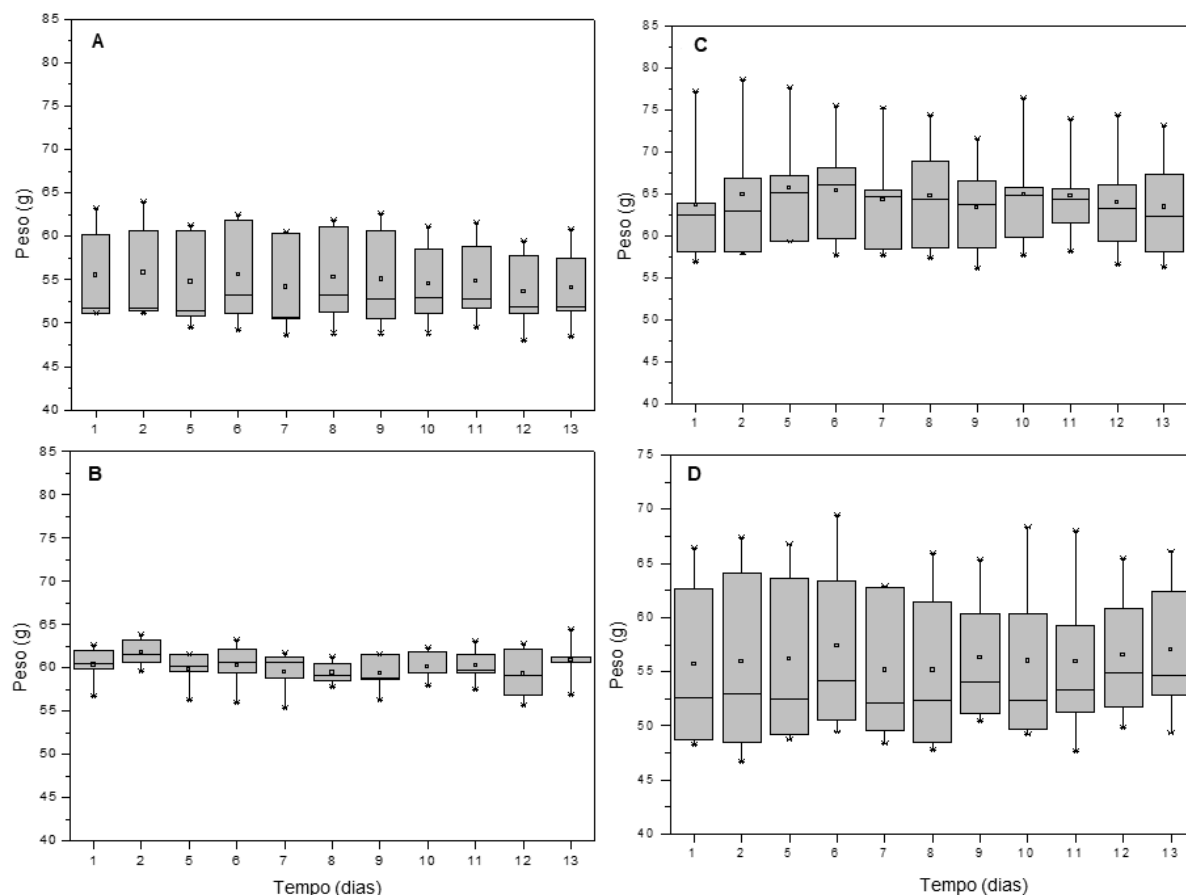
Os resultados apresentados do consumo da ração e água foram analisados por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey (p<0,05). Os resultados das demais análises foram apresentadas em gráficos do tipo “Box-Plot”.

### **3. Resultados e Discussão**

#### **3.1 Peso dos animais, consumo de ração e consumo de água**

Em relação ao peso dos animais (Figura 2), foi observado que os animais que receberam a dieta APG (9,5% AR), apresentaram menor ganho de peso, tendo um ligeiro aumento quando se administrou tetraciclina (dieta APG+T), já nas dietas com 18,1% de AR (grupos ARP e ARP+T) a tetraciclina levou a uma diminuição no ganho de peso.

**Figura 2.** Variação no peso dos animais tratados com as dietas APG (A), ARP (B), APG+T (C), ARP+T (D) no período de adaptação (4 dias) e experimentação (10 dias).



Fonte: Autores.

A Tabela 2 apresenta o consumo de ração e água dos animais em um período de 14 dias. Na fase de experimentação, os animais com dieta APG (menor teor de AR), tiveram menor consumo de ração em relação ao grupo ARP (maior concentração AR), porém o uso da tetraciclina na dieta APG+T, levou ao aumento do consumo de ração, sendo que este consumo é semelhante aos animais das dietas ARP e ARP+T. Isto pode ser relacionado as tetraciclina, visto que são usadas como ativadores do crescimento de gado, ou seja, estimulam o aumento do consumo de ração (Pereira-Maia et al., 2010). Quanto ao consumo de água não houve diferença significativa entre nenhum dos grupos. A oscilação do comportamento dos dados deve estar relacionada à maior ou menor atividade dos animais, o que não foi controlado. Além disso, o consumo real depende de vários fatores, como variação da temperatura diária, umidade relativa, horário do dia e estado de saúde (Prado-Silva et al., 2014).

**Tabela 2.** Consumo de ração e água dos animais durante o experimento.

Consumo	Dietas			
	APG	ARP	APG+T	ARP+T
Ração (g/dia)	28,63 ± 9,25 <sup>b</sup>	42,13 ± 15,09 <sup>a</sup>	31,43 ± 7,93 <sup>ab</sup>	37,87 ± 12,52 <sup>ab</sup>
Água (mL/dia)	72,69 ± 25,63 <sup>ns</sup>	82,69 ± 28,18 <sup>ns</sup>	81,54 ± 26,41 <sup>ns</sup>	82,69 ± 25,63 <sup>ns</sup>

Médias seguidas de letras diferentes nas linhas, diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05), ns = não significativo. Fonte: Autores.

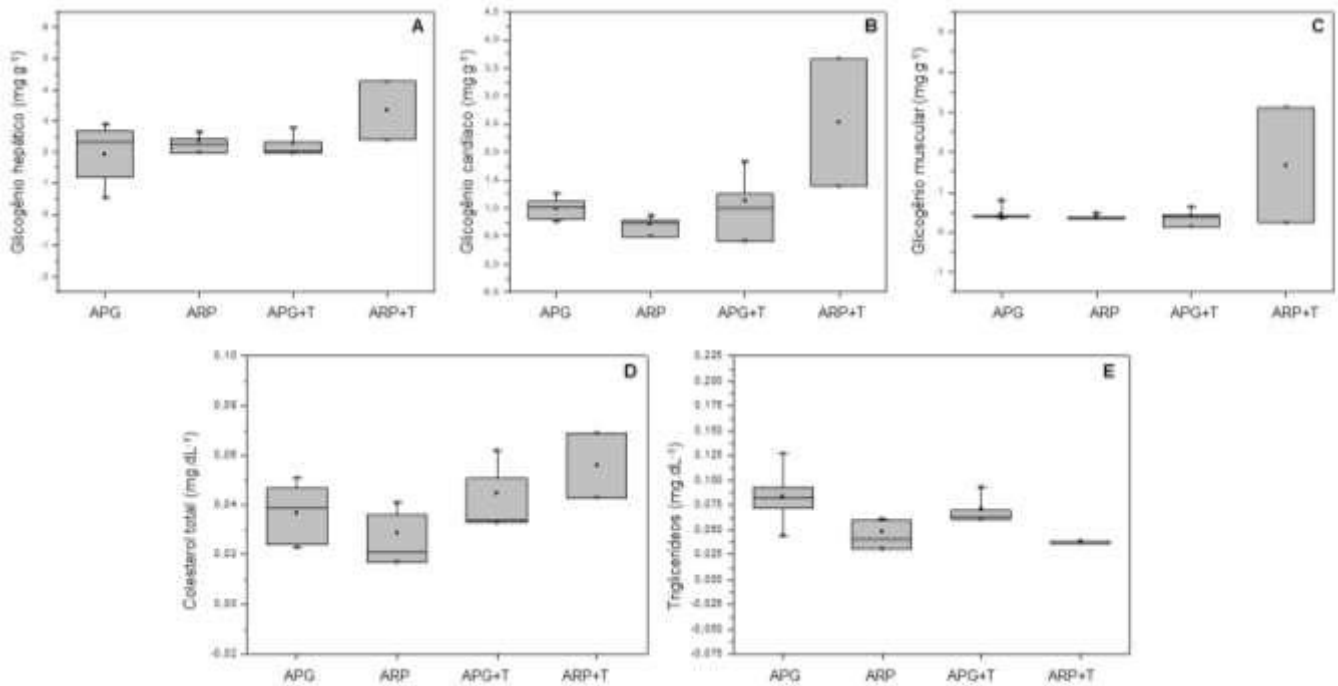
### 3.2 Análises bioquímicas

Na Figura 3, foi apresentado as dosagens de glicogênio hepático, cardíaco e muscular. O glicogênio hepático das dietas APG+T e ARP+T em que os animais fizeram uso de tetraciclina foram maiores que os seus respectivos controles (APG e ARP), indicando que a tetraciclina influencia no aumento de glicogênio hepático. Para o glicogênio cardíaco (Figura 3B), os dados mostraram que a dieta ARP levou a diminuição na sua concentração. Já na presença de tetraciclina (APG+T), houve um ligeiro aumento em relação a APG, indicando efeito da tetraciclina no aumento do glicogênio cardíaco. Os resultados referentes ao glicogênio muscular (Figura 3C) demonstram que os grupos tratados com tetraciclina apresentaram maior variação nos dados, com uma tendência a aumento no glicogênio muscular, confirmando os resultados em relação ao efeito da tetraciclina no aumento do glicogênio hepático e cardíaco. Os efeitos da tetraciclina sobre o metabolismo do glicogênio podem estar relacionados com alterações no metabolismo hepático (Hardamam & Limbird, 2001), o que pode ocasionar perda e/ou diminuição da atividade da enzima glicogênio fosforilase.

Os resultados do colesterol total mostrados na Figura 2D indicam que a dieta ARP ocasionou diminuição nos níveis plasmáticos de colesterol em relação a dieta APG, porém foi verificado que os dois grupos de animais tratados com tetraciclina apresentam tendência a aumento no colesterol total. Alves et al. (2021) avaliaram o efeito do amido resistente no metabolismo de lipídeos e de carboidratos em ratos machos *Wistar* e demonstraram que a dieta com maior quantidade de AR levou a diminuição dos lipídeos circulantes. A concentração de triglicérides no plasma diminuiu com o aumento da concentração de AR na dieta e o uso da tetraciclina também levou a diminuição dos níveis de triglicérides no plasma em ambas as dietas (APG+T e ARP+T).

A diminuição do colesterol total e triglicérides plasmáticos na dieta ARP (18,1% de AR), possivelmente está relacionada a absorção mais lenta da dieta pelo organismo, a presença de AR, que não é digerido pelo intestino, causa redução da glicemia e da concentração de ácidos graxos livres e dos níveis de colesterol plasmático (Ribeiro et al., 2019). Além disso, mantém baixa a razão insulina/glucagon e como consequência diminuiu a atividade das enzimas chaves do metabolismo de síntese do colesterol (HMG-CoA redutase) e dos ácidos graxos (Acetil-CoA carboxilase) (Prabhakar et al., 2015).

**Figura 3.** Concentração de glicogênio hepático (3A), cardíaco (3B) e muscular (3C), colesterol total (3D) e triglicerídeos (3E) dos animais tratados com as dietas APG, ARP, APG+T e ARP+T ao final de 10 dias de experimento.



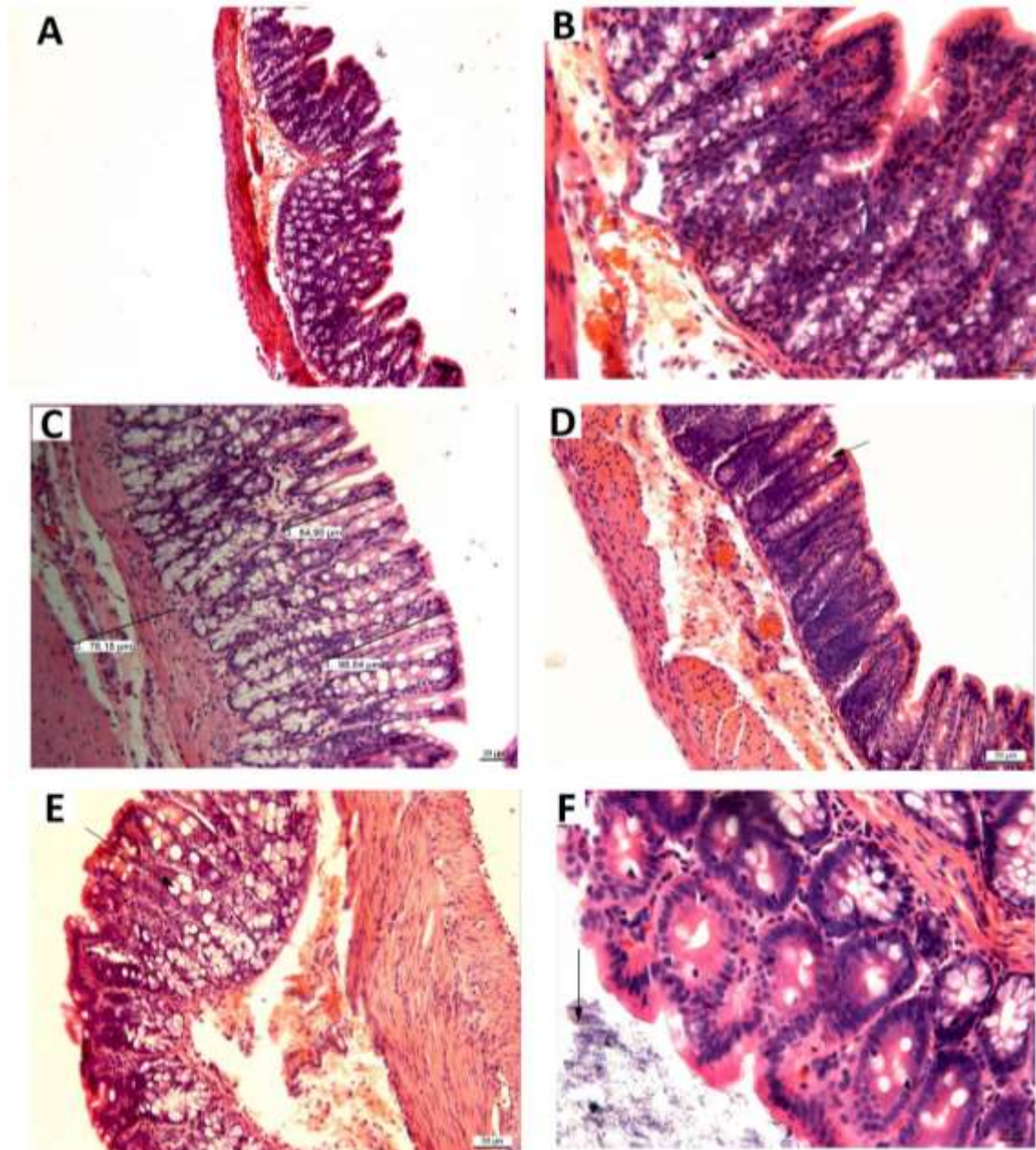
Fonte: Autores.

### 3.3 Análises histológicas

Após coloração com hematoxilina-eosina (Figura 4), as seções histológicas de intestino grosso dos animais tratados com ração rica em amido pré-gelatinizado (APG) mostraram mucosa com aspecto normal, apresentando criptas de Liberkuhn, compostas de células colunares absorptivas e abundantes células caliciformes, bastante longas. A lâmina própria se apresentou rica em células e a camada submucosa formada por tecido conjuntivo frouxo, seguido da camada muscular e da serosa (Figura 4A e B). Nos animais que receberam a mesma ração, porém, submetidos a tratamento com tetraciclina (APG+T) (Figura 4C), pode ser observado que a lâmina própria se mostrou reduzida e a camada submucosa mostrou regiões com fibroplasia, com tendência a tecido conjuntivo denso (seta). No grupo em que os animais foram tratados com ração com amido resistente (ARP) pode ser observada tendência a atrofia da mucosa e na camada submucosa a presença de vasos congestionados, denotando processo inflamatório agudo (Figura 4D). Quando os animais foram tratados com amido resistente e tetraciclina (ARP+T) (Figura 4E e F) foi verificada nítida atrofia da mucosa, presença de edema e vasos congestionados na submucosa, além da presença de debris celulares na luz do órgão (seta).



**Figura 4.** Secções histológicas de intestino grosso coradas com hematoxilina/eosina de animais tratados com a dieta APG (A e B – seta nas células caliciformes), com APG+T (C), com ARP (D – seta nos vasos congestos) e ARP+T (E – seta nas células caliciformes e F – seta nos restos de material celular). As medidas refletem a altura das criptas, do espaço entre elas e da espessura da camada submucosa para comparação.

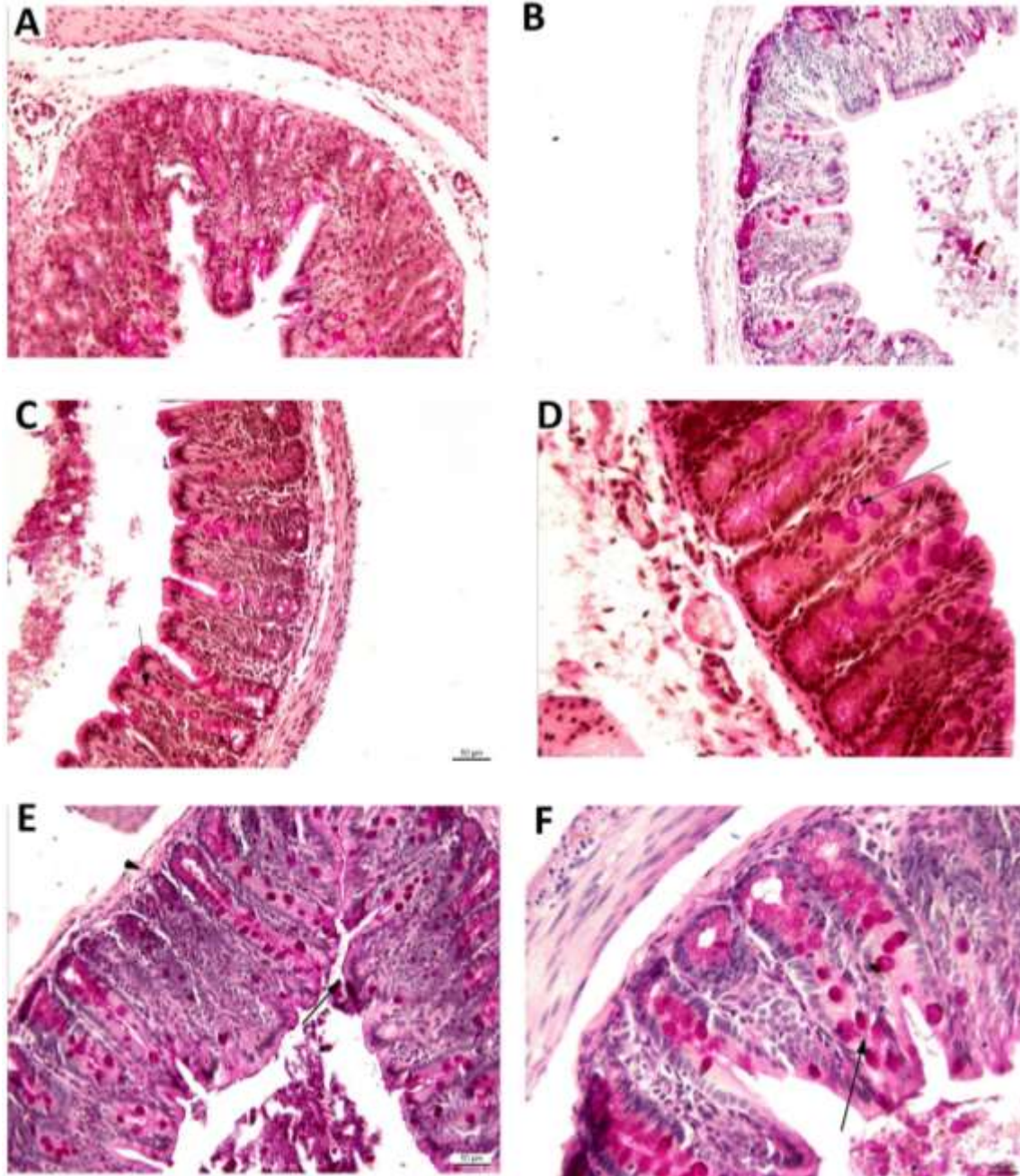


Fonte: Autores.

Após a técnica de P.A.S. (Figura 5), observou-se, nas secções dos animais que receberam apenas a ração com amido pré-gelatinizado (APG), a presença evidente células caliciformes, mostrando citiarquitetura normal (Figura 5A). Quando submetidos a tratamento com tetraciclina (APG+T), o colo dos animais apresentou a mucosa com algumas áreas lesadas (seta) e a perda de material celular no lúmen do órgão (Figura 5B). Após a administração da ração com amido resistente (ARP), pode ser notada atrofia da lâmina própria (Figura 5C) e, aumento na submucosa devido a formação de edema (Figura 5D) (setas – células caliciformes). Com a administração da tetraciclina (ARP+T) (Figura 5E) foi possível verificar que o quadro anterior se

mantém e que apareceu na luz do tubo intestinal restos de material celular proveniente da perda de integridade do epitélio, assim como da bordadura em escova e fibroplasia da submucosa (Figura 5F– ponta de seta).

**Figura 5.** Secções histológicas de intestino grosso submetidas a técnica de P.A.S. de animais tratados com a dieta APG (A), com APG+T (B – seta onde houve perda do epitélio e C) com ARP (D) e com ARP+T (E e F - seta nas células caliciformes no lúmen).



Fonte: Autores.

A alimentação e o modo de vida dos indivíduos, correlaciona-se com as patologias que podem desenvolver, e muitas são as pesquisas que minimizam esses efeitos e melhoram a qualidade de vida. A utilização de amido resistente na dieta visa minimizar os efeitos deletérios da ingestão de alimentos ricos em proteínas e outros tipos de carboidratos e um dos maiores alvos é combater a carcinogênese (Prado-Silva et al., 2014). Os mecanismos que contribuem para o aumento de risco de

desenvolvimento de câncer colorretal são incertos, mas devem estar relacionados à atuação de agentes genotóxicos no cólon (Toden et al., 2006). Tramonte et al. (2004), avaliaram as alterações da mucosa intestinal, por métodos histomorfométricos, após indução de sepse abdominal aguda em ratas e relataram, que a mucosa do intestino grosso é menos responsiva a alterações tanto experimentais quanto clínicas, quando comparada a mucosa do intestino delgado.

Pacientes com colite ulcerativa parecem ter um risco aumentado para câncer colorretal e hepático, assim como de leucemia (Hemminki et al., 2008). Drogas anti-inflamatórias são efetivas na prevenção de câncer colorretal, todavia, devido aos efeitos colaterais, o uso prolongado dessas drogas não é recomendado. Promover o aumento no conteúdo de ácidos graxos polinsaturados, tipo ômega-3, no cólon, induz redução na inflamação em animais e humanos, prevenindo o câncer colorretal, pois é capaz de diminuir a atividade do fator nuclear Kappa B (NF-KappaB), aumentar a expressão de fator de crescimento beta no cólon e diminuir a expressão de óxido-nítrico-sintetase em tumores dos animais (Nowak et al. 2007). Foi demonstrado que a sinvastatina inibe o fator NF-kappaB em células epiteliais intestinais humanas, minimizando quadro de colite, induzindo à apoptose e suprimindo a angiogênese, de forma que inibe o desenvolvimento de câncer de cólon (Cho et al., 2008).

Mudanças no ambiente luminal em resposta a presença de amido e/ou proteína no cólon são bastante complexas e podem estar relacionadas ao risco de câncer (Le Leu et al. 2007). O AR influencia favoravelmente o ambiente luminal colônico promovendo o aumento na produção de butirato e redução de enzimas bacterianas prejudiciais e produtos de fermentação protéica, reduzindo, assim, o risco de câncer de cólon. Já um conteúdo protéico aumentado no cólon, aumenta o acúmulo de produtos potencialmente prejudiciais como aminoácidos aromáticos, o que está associado ao aumento de risco para a carcinogênese. Todavia, a associação de amido resistente reduz esses acúmulos e protege contra a tumorigênese, aumentando a concentração de ácidos graxos de cadeias curtas (AGCC), incluindo butirato, e diminuindo a produção de produtos de fermentação protéica, potencialmente tóxicos (Le Leu et al., 2007).

Essas observações são corroboradas por Toden et al. (2007) que demonstraram a reversão, promovida por alimentação rica em AR, dos danos no DNA de colonócitos de ratos causados por dieta rica em caseína e soja. Bauer-Marinovic et al. (2006) concluíram que o tratamento com amido resistente R3 preveniu a carcinogênese de cólon por induzir aumento na apoptose de células danificadas e mudanças no parâmetro de desdiferenciação da mucosa colônica. Esses eventos se devem, principalmente, a formação de ácidos graxos de cadeias curtas (AGCC), especialmente o butirato, considerado como um protetor contra o câncer de cólon por induzir apoptose e controlar a expressão de proteínas envolvidas na desdiferenciação de células tumorais em cultura.

Há descrições de que ratos que sofreram indução de colite por ácido sulfônico trinitrobenzênico (TNBS) e que foram alimentados com amido resistente mostraram maior produção de AGCC, aumento no conteúdo de mucina fecal e cecal e no conteúdo de ácido nucléico e proteína na mucosa do cólon, reduzindo a permeabilidade da mesma (Morita et al., 2004). A perda da integridade da mucosa, com consequente liberação de células na luz do órgão, pode refletir a resposta do órgão pelo aumento de apoptose das células danificadas e, se o tratamento tivesse sido um pouco mais prolongado, talvez fosse possível observar áreas de regeneração tecidual nos animais tratados com amido resistente. Além disso, é provável que modificações morfo-fisiológicas não tenham sido percebidas pelos métodos empregados, sendo assim, estudos posteriores, que avaliem outros parâmetros como a produção de AGCC ou a expressão de fatores como o NF-kappaB sejam necessários para evidenciar alterações celulares que precedem as teciduais.

Quando tratados com tetraciclina, mesmo com a dieta APG composta de 9,5% de AR, pode ser observada que as criptas pareceram mais curtas e que a lâmina própria se mostrou reduzida como que se essa mucosa estivesse respondendo a uma agressão, na tentativa de se reconstituir. Após serem submetidos a uma dieta com alto teor de AR (18,1%), houve formação de um quadro de edema e o congestionamento de vasos na submucosa, caracterizando processo inflamatório agudo, que favorece o recrutamento de células de defesa imunológica para a região afetada. Quando receberam a dieta ARP+T, foi

observado presença de debris celulares na luz do órgão, talvez relacionadas com a perda da integridade tecidual da mucosa intestinal que, em algumas regiões, apresentou perda da bordadura em escova, de células caliciformes e absortivas, o que provavelmente comprometeu a absorção e o funcionamento do órgão. Esses achados podem ser indicativos de colite pseudomenranosa, no entanto, a duração do experimento foi relativamente curta de forma que pode não ter havido tempo para que outras respostas teciduais pudessem ser observadas.

#### 4. Conclusão

Através dos métodos histológicos empregados neste estudo foi possível identificar uma série de alterações na citoarquitetura do colo intestinal dos animais, de acordo com o tratamento a que foram submetidos. essas alterações variaram desde atrofia da mucosa, nos animais que receberam tetraciclina, formação de edema e congestionamento de vasos na submucosa nos animais alimentados com 18,1% de AR até a presença de debris celulares na luz do órgão e perda da bordadura em escova quando associado a tetraciclina. O amido resistente teve efeito protetor na mucosa do cólon quando administrado na concentração de 9,5%. Esses achados são indicativos de modificação na absorção e no funcionamento intestinal o que contribui para a perda de homeostasia do órgão. Torna-se necessário estabelecer as concentrações de consumo para melhor aproveitamento dos efeitos benéficos do amido resistente na dieta.

#### Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (código 001), e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro para B. L. Tagliapietra e M.T.P. Clerici (Processo 140805/2020-6 e 312786/2020-4, respectivamente).

#### Referências

- Agama-Acevedo, E., Islas-Hernández, J. J., Pacheco-Vargas, G., Osorio-Díaz, P., & Bello-Pérez, L. A. (2012). Starch digestibility and glycemic index of cookies partially substituted with unripe banana flour. *LWT-Food Science and Technology*, 46, 177-182. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.10.010>
- Alves, A. A., Pigoso, A. A., Chang, Y. K., Tagliapietra, B. L., Schmiele, M., Campelo, P. H., & Clerici, M. T. P. S. (2021). Changes induced by diet with different concentrations of resistant starch in the metabolism of carbohydrates and lipids in Wistar rats. *Research, Society and Development*, 10, e18110716448. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i7.16448>
- Bauer-Marinovic, M., Florian, S., Müller-Schmehl, K., Glatt, H., & Jacobasch, G. (2006). Dietary resistant starch type 3 prevents tumor induction by 1,2-dimethylhydrazine and alters proliferation, apoptosis and dedifferentiation in rat colon. *Carcinogenesis*, 27, 1849-59. <https://doi.org/10.1093/carcin/bg1025>
- Beçak, W., & Paulete, J. (1976). *Técnicas de citologia e histologia*: Editora S. A., 55.
- Behmer, O. A. (1976). Coloração de grânulos intracelulares. In: \_\_\_\_\_. *Manual de técnicas para histologia normal e patológica*. São paulo: Edart, 98.
- Bernard, F. S. R., & Rodrigues, T. C. Dietary fiber – Adequate intake and effects on metabolism health. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 57, 397-405, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0004-27302013000600001>
- Cho, S. J., Kim, J. S., Kim, J. M., Lee, J. Y., Jung, H. C., & Song, I. S. (2008). Simvastatin induces apoptosis in human colon cancer cells an in tumor xenografts, and attenuates colitis-associated colon cancer in mice. *International Journal of Cancer*, 123, 951-957. <https://doi.org/10.1002/ijc.23593>
- Englyst, H., Wiggins, H. S., & Cummings, J. H. (1982). Determination of the non-starch polysaccharides in plant foods by gas-liquid chromatography of constituent sugars as alditol acetates. *Analyst*, 107, 307-318.
- Fuentes-Zaragoza, E., Sánchez-Zapata, E., Sendra, E., Sayas, E., Navarro, C., Fernández-López, J., & Pérez-Alvarez, J.A. (2011), Resistant starch as prebiotic: A review. *Starch/Stärke*, 63, 406-415. <https://doi.org/10.1002/star.201000099>.
- González-Soto, R. A., Agama-Acevedo, E., Solorza-Feria, J., Rendón-Villalobos, R., & Bello-Pérez, L. A. (2004). Resistant starch made from banana starch by autoclaving and debranching. *Starch/Stärke*, 56, 495-499. <https://doi.org/10.1002/star.200400283>
- Goñi, I., Garcia-Diz, L., Mañas, E., & Saura-Calixto, F. (1996). Analysis of resistant starch: a method for foods and food products. *Food chemistry*, 56, 445-449.

- Haenen, D., Zhang, J., Souza da Silva, C., Bosch, G., Van der Meer, I. M., Van Arkel, J., Van den Borne, J. J., Pérez Gutiérrez, O., Smidt, H., Kemp, B., Müller, M., & Hooiveld, G. J. (2013). A diet high in resistant starch modulates microbiota composition, SCFA concentrations, and gene expression in pig intestine. *The Journal of Nutrition*, *143*, 274-283. <https://doi.org/10.3945/jn.112.169672>
- Hemminki, K., Li, X., & Sundquist, K. (2008). Câncer risks in ulcerative colitis patients. *International Journal of Cancer*, *123*, 1417-1421. <https://doi.org/10.1002/ijc.23666>
- Jideani, I. A., & Jideani, V. A. (2011). Developments on the cereals grains *Digitaria exilis* (acha) and *Digitaria iburua* (iburu). *Journal of Food Science and Technology*, *48*, 251-259. <https://doi.org/10.1007/s13197-010-0208-9>
- Junqueira, L. C. U., & Junqueira, L. M. M. S. (1983). Coloração de uso geral. In: \_\_\_\_\_. *Técnicas básicas de citologia e histologia*. São paulo: Santos, 49-50.
- Le Leu, R. K., Brown, I., Hu, Y., Morita, Tt., Esterman, A., & Young, G. P. (2007). Effect of dietary resistant starch and protein on colonic fermentation and intestinal tumorigenesis in rats. *Carcinogenesis*, *28*, 240-245. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgl245>
- Liu, Q. (2005). Understanding starches and their role in food. In: Cui S, editor. *Food Carbohydrates: Chemistry, Physical Properties, and Applications*. (1st ed.): CRC Press; 309-349. <https://doi.org/10.1201/9780203485286.ch7>
- Lo, S., Russell, J. C., & Taylor, A. W. (1970) Determination of glycogen in small tissue samples. *Journal of Applied Physiology*, *28*, 234-6.
- Morita, T., Tanabe, H., Sugiyama, K., Kasaoka, S., & Kiriya, S. (2004). Dietary resistant starch alters the characteristics of colonic mucosa and exerts a protective effect on trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *68*, 2155-2164. <https://doi.org/10.1271/bbb.68.2155>
- Nowak, J., Weylandt, K. H., Habel, P., Wang, J., Dignass, A., Glickman, J. N., & Kang, J.X. (2007). Colitis-associated colon tumorigenesis is suppressed in transgenic mice rich in endogenous n-3 fatty acids. *Carcinogenesis*, *28*, 1991-1995. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgm166>
- Odenigbo, A. M., Asumugha, V. U., Ubbor, S., Nwauzor, C., Otuonye, A. C., & Offia-Olua BI, (2013). Proximate composition and consumption pattern of plantain and cooking-banana. (2013). *Current Journal of Applied Science and Technology*, *16*, 1035-1043. <https://doi.org/10.9734/BJAST/2014/4943>
- Prado-Silva, L., Azevedo, L., Oliveira, J. A. C., Moreira, A. P. M., Schmiele, M., Chang, Y. K., Paula, F. B. A., & Clerici, M. T. P. S. (2014). Sesame and resistant starch reduce the colon carcinogenesis and oxidative stress in 1,2-dimethylhydrazine-induced cancer in Wistar rats. *Food Research International*, *62*, 609-617. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.04.027>
- Reeves, P. G., Nielsen, F. H., & Fahey, Jr. G. C. (1993). Committee Report AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent. *The Journal of Nutrition*, *123*, 1939-1951. <https://doi.org/10.1093/jn/123.11.1939>
- Rodríguez-Pardo, D., Mirelis, B., & Navarro, F. (2013). Infecciones producidas por *Clostridium difficile*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *31*, 254-263. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2012.12.010>
- Rubin, E., & Farber, J. L. (2002). O trato gastrointestinal. In: Hamilton, S. R., Faber, J. L. & Rubin, E. *Patologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 701-702.
- Ribeiro, L. R., Slavadori, D. M. F., & Marques, E. K. (2003). *Mutagênese ambiental*. Canoas: Editora da ULBRA, 356.
- Sun, H., Ma, X., Zhang, S., Zhao, D., & Liu, X. (2018). Resistant starch produces antidiabetic effects by enhancing glucose metabolism and ameliorating pancreatic dysfunction in type 2 diabetic rats. *International Journal of Biological Macromolecules*, *110*, 276-284. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.162>
- Toden, S., Bird, A. R., Topping, D. L., & Conlon, M. A. (2006). Resistant starch prevents colonic DNA damage induced by high dietary cooked red meat or casein in rats. *Cancer Biology & Therapy*, *5*, 267-272. <https://doi.org/10.4161/cbt.5.3.2382>
- Toden, S., Bird, A. R., Topping, D. L., & Conlon, M. A. (2007). Differential effects of dietary whey, casein and soya on colonic DNA damage and large bowel SCFA in rats fed diets low and high in resistant starch. *British Journal of Nutrition*, *97*, 535-43. <https://doi.org/10.1017/S0007114507336817>
- Tramonte, R., Carvalho, R. O. M., Farias, D. C., Serafim, J. D. M., Ortellado, D. K., & D'acampora, A. J. (2004). Alterações da mucosa intestinal em ratos: estudo morfométrico em três diferentes tratamentos após indução experimental de sepse abdominal aguda. *Acta Cirúrgica Brasileira*, *19*, 120-25. <https://doi.org/10.1590/S0102-86502004000200007>
- Vieira, F. A., & Pinheiro, V. A. (2004). Monografias Farmacêuticas. In: \_\_\_\_\_. *Formulário Veterinário Farmacêutico*. São Paulo: Pharmabooks, 228-229.