

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

Thaís Moreira Abreu

**O EFEITO DO CONSUMO CRÔNICO DE BEBIDA AÇUCARADA NO EIXO
INTESTINO-CÉREBRO**

BELO HORIZONTE

2024

Thaís Moreira Abreu

**O EFEITO DO CONSUMO CRÔNICO DE BEBIDA AÇUCARADA NO EIXO
INTESTINO-CÉREBRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

Orientadora: Dra. Tatiani Uceli Maioli

Co-orientador: Dr. Renato Elias Moreira Junior

BELO HORIZONTE

2024

043

Abreu, Thaís Moreira.

O efeito do consumo crônico de bebida açucarada no eixo intestino-cérebro [manuscrito] / Thaís Moreira Abreu. – 2024.

80 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Dra. Tatiani Uceli Maioli. Co-orientador: Dr. Renato Elias Moreira Junior.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Doenças Inflamatórias Intestinais. 3. Imunidade de Mucosas. 4. Ansiedade. 5. Eixo Intestino-Cérebro. 6. Bebidas Adoçadas com Açúcar. I. Maioli, Tatiani Uceli. II. Moreira Junior, Renato Elias. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
 31270-901 – Belo Horizonte – MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE THAIS MOREIRA ABREU.
 Aos trinta dias do mês de outubro de 2024 às 09:30 horas, reuniu-se de forma “on line” utilizando a plataforma “Zoom”, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "O efeito do consumo crônico de bebida açucarada no eixo intestino-cérebro", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Imunologia. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Prof^a. Tatiani Uceli Maioli, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Elândia Aparecida dos Santos (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Luciene Bruno Vieira (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Renato Elias Moreira Junior - Coorientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Tatiani Uceli Maioli - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

- APROVADA
 REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 30 de outubro de 2024.

Dra. Elândia Aparecida dos Santos (UFMG)



Documento assinado digitalmente
 ELANDIA APARECIDA DOS SANTOS
 Data: 27/11/2024 14:47:29-0300
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Luciene Bruno Vieira (UFMG)



Documento assinado digitalmente
 LUCIENE BRUNO VIEIRA
 Data: 28/11/2024 11:04:52-0300
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>



Documento assinado digitalmente
 RENATO ELIAS MOREIRA JUNIOR
 Data: 28/11/2024 15:58:44-0300
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Renato Elias Moreira Junior - Coorientador (UFMG)



Documento assinado digitalmente
 TATIANI UCELI MAIOLI
 Data: 28/11/2024 15:43:32-0300
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Tatiani Uceli Maioli - Orientadora (UFMG)

Apoio Financeiro: Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

AGRADECIMENTOS

Impossível começar sem dizer: Obrigada, Deus, sempre me dar mais do que eu sequer posso sonhar. Por ter me sustentado e guardado meu coração até aqui.

Agradeço aos meus pais, Márcia e Fábio, por se esforçarem não só em me manter de pé e em realizar todos os meus sonhos, mas, principalmente, por me ensinarem na prática a ser uma mulher forte, com valores e de muito caráter. Por se esforçarem a ser melhores a cada dia. Eu tenho o maior orgulho de vocês.

Ao meu irmão, que alegra os meus dias e é tudo pra mim. Tuguinho, eu te falei que a nossa história seria diferente, né?!

Agradeço à minha avó Arlinda pelo amor, conexão e cuidado. Aos meus avós, Darcy, Cilas e Mario, que são a definição mais concreta e próxima que tenho de saudade. Eu amo vocês.

Agradeço ao Pedro por ter sido colo, ombro, amor, carinho e atenção ao longo desses anos.

Aos meus amigos e familiares, que se alegram com minhas alegrias e choram o meu choro, por deixarem a minha vida mais completa, colorida e feliz.

Agradeço à Tati por ter sido a melhor orientadora que eu poderia ter. Por ter sido atenciosa e presente. Muito além de ciência, com a Tati eu aprendi sobre acolhimento.

Ao Renato, o cara mais solícito que existe no ICB. Obrigada por toda ajuda no desenvolvimento desse trabalho, por toda troca e por todos os artigos que me enviou.

Aos meus amigos do LIB que fizeram tudo ser muito melhor.

Ao Hermes e à Ildinha por cuidarem no nosso biotério com tanto zelo e atenção.

Agradeço à minha versão mini que escolheu seguir o caminho mais difícil, mas igualmente recompensador. Isso é por você, zoi!

E agradeço a Thaís que sou, pela coragem de trilhar novos caminhos.



*O mundo é um lugar de
muitas possibilidades;
e a vida acontece no
movimento.*

RESUMO

O alto consumo de refeições ricas em gorduras e carboidratos refinados promove o desenvolvimento de alterações metabólicas e induz inflamação tanto em órgãos adiposos quanto em órgãos linfoides, denominado metainflamação. Além disso, esse padrão alimentar tem sido relacionado ao desenvolvimento de transtornos psiquiátricos e doenças inflamatórias intestinais. Bebidas açucaradas (SSBs) são a principal fonte de açúcar adicionado na dieta ocidental e contêm altos níveis de glicose e frutose. Nosso objetivo foi investigar se o consumo crônico de SSB poderia desencadear alterações intestinais e comportamentais. Para isso, utilizamos um modelo experimental com camundongos C57BL/6 alimentados com uma dieta AIN93G e tratados com SSB (composta por 30% de glicose e frutose em uma proporção de 45:55) ou água filtrada. O comportamento semelhante ao ansioso, o metabolismo e distúrbios intestinais foram avaliados após a 8ª semana de tratamento. Os animais tratados com SSB não apresentaram diferenças no ganho de peso, mas apresentaram maior glicemia em jejum. Além disso, demonstraram redução no comportamento semelhante ao ansioso e aumento em comportamentos compulsivos, conforme avaliado pelo teste Claro/Escuro e Marble Test, respectivamente. No entanto, não foram observadas diferenças nas populações celulares dos linfonodos mesentéricos usando citometria de fluxo. Após a indução de colite ulcerativa com 1% de DSS, os camundongos que consumiram SSB apresentaram desfechos da doença mais severos após o consumo crônico de açúcar. Evidenciado por escore clínicos mais alto, considerado perda de peso, diarreia e presença de sangramento, bem como escore inflamatórios mais graves com base em parâmetros histológicos e microbiota alterada. Além disso, O consumo de SSB provocou redução na frequência de células nos linfonodos mesentéricos; na análise de PCR revelou alterações na expressão de mRNA de moléculas relacionadas à renovação epitelial. Em conclusão, nossos achados sugerem que o consumo crônico de SSB afeta o comportamento, induz alterações metabólicas e exacerba a doença inflamatória intestinal em camundongos C57BL/6.

Palavras-chave: Bebida açucarada, doença inflamatória intestinal, imunologia de mucosa, ansiedade e eixo intestino-cérebro.

ABSTRACT

The increased consumption of meals rich in fat and refined carbohydrates promotes the development of metabolic changes and induces inflammation in adipose and lymphoid organs, termed as meta-inflammation. Moreover, this dietary pattern has recently been correlated with the development of psychiatric disorders and inflammatory bowel diseases. Sugar-sweetened beverages (SSBs) are highly consumed and contain high levels of glucose and fructose, making them a primary source of added sugar in Western diets. We aimed to investigate whether chronic SSB consumption could trigger intestinal and behavioral alterations. To test this hypothesis, we employed an experimental model using C57BL/6 mice fed an AIN93G diet supplemented with either a sugary drink (30% mixture of glucose and fructose in a 45:55 ratio) or filtered water. Anxiety-like behavior, metabolism, and intestinal disorders were evaluated at the 8th week. Mice receiving SSB did not exhibit differences in weight gain but showed higher fasting glycemia. Additionally, they demonstrated reduced anxiety-like behavior and increased compulsive behaviors as assessed by the light/dark test and marble test, respectively. However, no differences in mesenteric lymph node cell populations were observed using flow cytometry. After inducing colitis with 1% DSS, mice consuming SSB showed more severe disease outcomes following chronic sugar consumption. This included worse clinical scores with increased weight loss, diarrhea, and bleeding, as well as more severe inflammatory scores based on histological parameters and altered microbiota. The SSB consumption drives reduced mesenteric lymph node cell populations. Furthermore, PCR analysis revealed alterations in epithelial cell renewal molecules mRNA expression. In conclusion, our findings suggest that chronic consumption of SSB affects behavior, induces metabolic changes, and exacerbates inflammatory bowel disease in C57BL/6 mice.

Keywords: Sugar-sweetened beverage, inflammatory bowel disease, mucosal immunology, anxiety and gut-brain axis.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Formulação da dieta American Institute of Nutrition-93G (AIN-93G)	30
Tabela 2. Primers utilizados para avaliação da expressão gênica no intestino grosso.	36
Tabela 3. Anticorpos utilizados na citometria de fluxo.	37
Tabela 4. Primers utilizados para avaliação de representantes bacterianos.	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho experimental.....	29
Figura 2. Morfologia do intestino delgado (íleo) em aumento de 20x.	31
Figura 3. Morfometria do intestino grosso em aumento de 20x.	34
Figura 4. Estratégia de análise para citometria de fluxo.....	38
Figura 5. O consumo crônico de bebida açucarada alterou o consumo alimentar, mas não o peso e a composição corporal.	43
Figura 6. O consumo crônico de bebida açucarada alterou o metabolismo de carboidratos, mas não o de lipídeos.	44
Figura 7. O consumo crônico de bebida açucarada não alterou a morfologia do íleo.	45
Figura 8. O consumo crônico de bebida açucarada não alterou a morfologia do intestino grosso.	45
Figura 9. O consumo crônico de bebida açucarada não alterou a expressão de genes relacionados a função de barreira intestinal.	46
Figura 10. O consumo crônico de bebida açucarada não alterou o perfil celular de células CD3 + CD4 + no baço.	47
Figura 11. O consumo crônico de bebida açucarada não alterou o perfil celular de células CD3 + CD4 + no linfonodo mesentérico ilíaco.	48
Figura 12. O consumo crônico de bebida açucarada alterou a microbiota intestinal.	49
Figura 13. O consumo crônico de bebida açucarada alterou o comportamento semelhante ao compulsivo-obsessivo em camundongos.	50
Figura 14. O consumo crônico de bebida açucarada alterou o comportamento semelhante ao ansioso em camundongos.	51
Figura 15. O consumo crônico de bebida açucarada alterou o comportamento semelhante ao ansioso em camundongos.	52

Figura 16. O consumo crônico de bebida açucarada agravou o desenvolvimento da colite ulcerativa induzida por DSS.	53
Figura 17. O consumo crônico de bebida açucarada exacerbou o acometimento intestinal durante a colite ulcerativa.	55
Figura 18. O consumo crônico de bebida açucarada exacerbou o acometimento intestinal durante a colite ulcerativa.	55
Figura 19. O consumo crônico de bebida açucarada alterou a expressão de genes relacionados a função de barreira intestinal durante a colite experimental.	56
Figura 20. O consumo crônico de bebida açucarada não alterou o perfil celular de células CD3 + CD4 + no baço na colite ulcerativa.	57
Figura 21. O consumo crônico de bebida açucarada alterou o perfil celular de células CD3 + CD4 + nos linfonodos proximais na colite ulcerativa.	58
Figura 22. O consumo crônico de bebida açucarada alterou o perfil celular de células CD3 + CD4 + nos linfonodos distais na colite ulcerativa.	59
Figura 23. O consumo de bebida açucarada altera a microbiota intestinal na colite experimental.	60

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

AIN-93G - American Institute of Nutrition-93G

AMP - Adenosina monofosfato

ATP - Adenosina trifosfato.

CD - Do inglês, *chron disease*

cDNA - Do inglês, *complementary DNA*

DCNT - Doenças crônicas não transmissíveis

dL – Decilitros

°C – Graus Celsius

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

DM – Diabetes Mellitus

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DNase - Desoxirribonuclease

DSS – Do inglês, *dextran sulfate sodium*

FACS – Do inglês, *Fluorescence-activated cell sorting*

FD - Do inglês, *fiber-deprived diet*

FSC - Do inglês, *Forward Scatter*

Foxp3 – Do inglês, *fator de transcrição forkhead box P3*

g – Gramas

GALT – Do inglês, *gut associated lymphoid tissue*

GATA3 - Do inglês, *GATA-binding protein 3*

GM-CSF - Do inglês, *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*

GLUT2 - Do inglês, *Glucose transporte 2*

GLUT5 - Do inglês, *Glucose transporte 5*

h - horas

HFD - Do inglês, *High fat diet*

HFCS – Do inglês, *High Fructose Corn Syrup*

HE - Hematoxilina-eosina

HPA - Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
ICB – Instituto de Ciências Biológicas
IMC - Índice de Massa Corporal
slgA – Do inglês, *secretory Immunoglobulin A*
IL - Interleucina
IL-1 β - Interleucina-1 β
IL-6 - Interleucina-6
KD – Do inglês, *Ketogenic diet*
Kg - quilos
KHK – Do inglês, *ketohexokinase*
KO – Do inglês, *knockout*
LGR5+ - Do inglês, *Leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 5*
LNM - Linfonodos mesentéricos.
 μ L – Microlitros
 μ m - Micrômetros
MALT - Do inglês, *Mucosa-Associated Lymphoid Tissue*
Muc2 - Mucina 2
MUFA - Do inglês, *monounsaturated fatty acids*
NAFLD - Do inglês, *Non-alcoholic fatty liver disease*
nm – Nanômetros
NO – Oxido nítrico
PBS-BSA - Solução de fosfato de sódio (PBS) com albumina sérica bovina (BSA).
PFK - Fosfofrutoquinase
PUFA - Do inglês, *polyunsaturated fatty acids*
qPCR - Do inglês, *quantitative Polymerase Chain Reaction*.
rpm - rotações por minuto.
RNA - Ácido ribonucleico.
RNase – ribonuclease
ROR γ t: Do inglês, *factor retinoic acid-related orphan receptor gamma t*

SCFA - Do inglês, *Short-chain fatty acids*

SFB - Do inglês, *segmented filamentous bacteria*

SGLT1 – Do inglês, *sodium-glucose linked transporter 1*

SII - Síndrome do intestino irritável

SNC - Sistema nervoso central

SSB - Do inglês, *Sugar sweetened beverages*

SSC – Do inglês, *side scatter*

T-bet – membro da família de fatores de transcrição T-box que regula a diferenciação da linhagem Th1

TCD4+ - Células T CD4 positivas.

TCD8+ - Células T CD8 positivas.

TGF- β - Do inglês, *Transforming growth factor β*

Th1 - Do inglês, *T helper cells 1*

Th2 - Do inglês, *T helper cells 2*

Th17 - Do inglês, *T helper cells 17*

Tregs - Do inglês, *Regulatory T cells*

TJ - Do inglês, *Tight Junctions*

TNF- α - Do inglês, *Tumor necrosis factor - α*

UC - Do inglês, *Ulcerative colitis*

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

ZO-1 - Zonula Occludens 1

SUMÁRIO

1 ESTADO DA ARTE	18
1.2 OS NUTRIENTES E O SISTEMA IMUNE DE MUCOSA.....	20
1.3 O EIXO INTESTINO-MICROBIOTA-CÉREBRO	24
1.4 DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS	26
2 OBJETIVOS	28
2.1 OBJETIVO GERAL	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3 METODOLOGIA	30
3.1 ANIMAIS.....	30
3.2 DIETA EXPERIMENTAL E BEBIDA AÇUCARADA.....	30
3.2.1 <i>Indução da Colite por DSS</i>	31
3.3 PESO CORPORAL E COMPOSIÇÃO CORPORAL.....	32
3.4 OBTENÇÃO DO SORO	32
3.5 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL METABÓLICO	32
3.5.1 <i>Caracterização do perfil glicêmico</i>	33
3.5.2 <i>Caracterização do perfil lipídico</i>	33
3.6 ANÁLISES HISTOLÓGICAS.....	33
3.6.1 <i>Coleta e fixação dos tecidos</i>	33
3.6.2 <i>Análises morfológicas do intestino delgado</i>	34
3.6.3 <i>Análises morfológicas do intestino grosso</i>	34
3.6.4 <i>Análise Histológica na Colite Ulcerativa</i>	35
3.7 AVALIAÇÃO DA DOENÇA.....	35
3.7.1 <i>Avaliação macroscópica da Colite Ulcerativa - Escore Clínico</i>	35
3.7.2 <i>Escore inflamatório da Colite Ulcerativa</i>	36
3.8 RT-qPCR	36
3.9 CITOMETRIA DE FLUXO.....	38
3.9.1 <i>Estratégia de análise das populações de interesse</i>	39
3.10 qPCR DOS GRUPOS DA MICROBIOTA INTESTINAL.....	40
3.11 TESTES COMPORTAMENTAIS.....	42
3.11.1 <i>Caixa Claro x Escuro</i>	42
3.11.2 <i>Campo Aberto</i>	43
3.11.3 <i>Marble burying Test</i>	43
3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
4 RESULTADOS	44
4.1 A OFERTA DE BEBIDA AÇUCARADA ALTEROU O METABOLISMO DE GLICOSE SEM PROVOCAR ALTERAÇÕES NO PESO CORPORAL E NA MORFOLOGIA INTESTINAL.....	44
4.2 O CONSUMO CRÔNICO DE BEBIDA AÇUCARADA NÃO ALTEROU O PERFIL CELULAR NO BAÇO E LINFONODO MESENTÉRICO ILÍACO ..	48
4.3 O CONSUMO CRÔNICO DE BEBIDA AÇUCARADA ALTEROU A MICROBIOTA INTESTINAL.....	50
4.4 O CONSUMO CRÔNICO DE BEBIDA AÇUCARADA ALTEROU O COMPORTAMENTO INATO DE CAMUNDONGOS C57BL/6.....	52
4.5 O CONSUMO CRÔNICO DE BEBIDA AÇUCARADA AGRAVOU O DESENVOLVIMENTO DA COLITE ULCERATIVA INDUZIDA POR DSS	54
4.6 O CONSUMO CRÔNICO DE BEBIDA AÇUCARADA NÃO ALTEROU O PERFIL CELULAR DE CÉLULAS CD3 ⁺ CD4 NO BAÇO NA COLITE ULCERATIVA INDUZIDA POR DSS	58

4.7 O CONSUMO DE BEBIDA AÇUCARADA ALTEROU O PERFIL CELULAR DE CÉLULAS TCD4 ⁺ NOS LINFONODOS MESENTÉRICOS NA COLITE ULCERATIVA INDUZIDA POR DSS	59
4.8 AS ALTERAÇÕES NA MICROBIOTA INTESTINAL PROVOCADAS PELO CONSUMO CRÔNICO DE BEBIDA AÇUCARADA FORAM EXACERBADAS NA COLITE ULCERATIVA INDUZIDA POR DSS	61
5 DISCUSSÃO.....	63
6 CONCLUSÃO.....	71
7 PERPECTIVAS.....	72
REFERÊNCIAS.....	73

1 ESTADO DA ARTE

1.1 Bebidas açucaradas e saúde metabólica

A alta ingestão de calorias, majoritariamente provenientes de gorduras saturadas e carboidratos refinados, está associada ao consumo elevado de sódio e à baixa ingestão de fibras, vitaminas e minerais, e vêm sendo relacionada a um processo inflamatório sistêmico de baixo grau, denominado metainflamação (AGUIAR et al., 2018; BURR et al., 2023; LEE; DIXIT, 2020). Embora frequentemente vinculada a um comportamento alimentar inadequado, à prática reduzida de exercícios físicos, ao sobrepeso e à obesidade, a metainflamação também pode ocorrer em indivíduos com o peso considerado adequado segundo as classificações do índice de massa corporal (IMC), mas que apresentam um aumento significativo na adiposidade corporal, condição conhecida como obesidade de peso normal (FRANCO; MORAIS; COMINETTI, 2016). Esse conceito reforça a importância de se avaliar a composição corporal, uma vez que o aumento excessivo da adiposidade, mesmo em indivíduos com peso adequado de acordo com o IMC, predispõe ao desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), como a diabetes mellitus tipo 2 (DM2), esteatose hepática não alcoólica (NAFLD, do inglês, Non-Alcoholic Fatty Liver Disease), doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (FRANCO; MORAIS; COMINETTI, 2016; WANG et al., 2022; WILLETT; STAMPFER, 2013).

Dietas desbalanceadas, baseadas principalmente em gorduras e açúcares, juntamente com o sedentarismo, são fatores determinantes para o aumento da adiposidade corporal. Neste contexto, as bebidas açucaradas (do inglês, sugar-sweetened beverages – SSB) representam a maior fonte de açúcares adicionados na alimentação ocidental e são definidas pelas Diretrizes Dietéticas Americanas como líquidos adoçados com açúcares que aumentam a densidade energética total da dieta (BRAY, 2008; JIN, 2016). Entre as SSBs incluem-se refrigerantes, bebidas à base de frutas, e bebidas esportivas e/ou energéticas, nas quais o adoçante mais comumente utilizado é o xarope de milho rico em frutose (do inglês, high fructose corn syrup - HFCS).

O HFCS é um adoçante composto por glicose e frutose, obtido a partir da isomerização enzimática do amido de milho. Esse processo foi desenvolvido por volta de 1970, é um processo de baixo custo e capaz de entregar como produto final um composto com alto poder adoçante com capacidade de aumentar a durabilidade dos produtos. Assim, tornou-se popular não só nos Estados Unidos, onde foi desenvolvido, mas em todo o mundo (BRAY, 2008).

As concentrações de glicose e frutose no HFCS podem variar, sendo a versão mais comumente utilizada em bebidas é o HFCS-55, que contém 55% frutose e 45% glicose (BRAY, 2008; LUBAWY; FORMANOWICZ, 2023; WANG et al., 2022). O consumo médio de frutose entre os americanos é de aproximadamente 80g por dia, resultando em uma adição de 330 a 380 calorias diárias, apenas pelo consumo de alimentos adoçados com HFCS (LUBAWY; FORMANOWICZ, 2023). De igual forma, segundo o Ministério da Saúde (2022), brasileiros consomem 50% a mais do que o recomendado pela OMS por dia. Dessa forma, o uso do HFCS em alimentos e bebidas e, conseqüentemente, sua contribuição para o aumento do consumo de frutose tornam-se evidentes, reforçando a necessidade de compreender os impactos do consumo desse adoçante na ingestão calórica, nos padrões alimentares e na fisiologia em geral, especialmente no contexto de consumo crônico.

Glicose e frutose são monossacarídeos de mesma fórmula química ($C_6H_{12}O_6$), porém são metabolizados distintamente. A frutose é absorvida na porção distal do intestino delgado via transportador independente de insulina, o GLUT5 (do inglês, glucose transporter 5) (BRAY, 2008). Dentro da célula, a frutose é fosforilada pela frutoquinase (do inglês, fructokinase – KHK) e liberada na circulação sistêmica via GLUT2 (do inglês, glucose transporter). Por sua vez, a glicose é absorvida na porção inicial do intestino delgado via SGLT-1 (do inglês, sodium glucose transporter 1) e é metabolizada pela fosfofrutoquinase (do inglês, phosphofructokinase – PFK). A expressão de SGLT-1 é regulada em resposta às concentrações de glicose no lúmen intestinal (MERINO et al, 2019).

O metabolismo de frutose envolve gasto de adenosina trifosfato (ATP) e, diferentemente da glicose, não possui mecanismos de feedback negativo.

Conseqüentemente, em situações de altas concentrações de frutose no lúmen intestinal, o ATP intracelular é rápida e transitoriamente depletado, gerando maior ativação de da AMP (adenosina monofosfato) deaminase (LUBAWY; FORMANOWICZ, 2023; STALTNER et al., 2023). No fígado, a desregulação metabólica gerada pelo excesso de frutose circulante promove aumento dos processos lipogênicos e a inibição da oxidação de lipídeos, favorecendo o acúmulo de gordura nas células hepáticas (BRAY, 2008; LUBAWY; FORMANOWICZ, 2023; STALTNER et al., 2023; WANG et al., 2022). A metabolização excessiva de frutose está associada ao aumento da inflamação, do estresse oxidativo e da hiperuricemia (LUBAWY; FORMANOWICZ, 2023).

O consumo excessivo de frutose, especialmente por meio das SSBs, também está associado ao aumento da ingestão alimentar, pois a frutose não sinaliza saciedade ao sistema nervoso central (SNC) nem estimula a liberação de insulina pelas células β pancreáticas, uma vez que o transportador de glicose responsável pela absorção de frutose, o GLUT5, não é expresso por células cerebrais ou pancreáticas. Além disso, a presença de frutose inibe a liberação de leptina pelos adipócitos, agravando ainda mais a ausência de saciedade (BRAY, 2008). Assim, por não gerar saciedade de forma eficiente, como a glicose ou outros tipos de carboidratos, e por causar distúrbios no metabolismo hepático de nutrientes, estimulando a síntese de triglicerídeos, de fosfolipídios e a diminuição da liberação de hormônios anorexígenos e citocinas reguladoras, o consumo excessivo de frutose tem sido relacionado ao aumento da adiposidade visceral, à resistência à insulina e ao aumento da síntese de leptina, levando a condições como obesidade, DM2, hipertensão, doenças cardiovasculares e síndrome metabólica (BRAY, 2008; LUBAWY; FORMANOWICZ, 2023; STALTNER et al., 2023; WANG et al., 2022).

1.2 Os nutrientes e o sistema imune de mucosa

Os nutrientes desempenham funções metabólicas e imunológicas importantes. Os aminoácidos, carboidratos, lipídeos e diversas vitaminas obtidos através da dieta

são capazes de interagir com as células do sistema imune residentes no intestino, sendo essa interação extremamente importante para a organização da resposta imune. Um exemplo clássico é o maior risco de desenvolver doenças infecciosas em indivíduos que apresentam quadros de desnutrição energético-proteica (FARIA et al., 2013). Considerando que o intestino é o maior órgão imune secundário e que representa a maior área de contato com antígenos externos, entende-se a complexidade desse sistema e a necessidade de uma regulação precisa para manutenção da integridade intestinal e a preservação de um ambiente tolerogênico, visando o equilíbrio de suas funções (FARIA et al., 2013).

Nos últimos anos, diversos estudos têm buscado entender como os nutrientes se relacionam com os processos biológicos de remodelação do epitélio intestinal e da resposta imune (CHRIST; LAUTERBACH; LATZ, 2019; SEROUSS, 2019; KINASHI; HASE, 2021; LEE; DIXIT, 2020; AGUIAR, 2004). O tecido linfoide associado ao intestino, conhecido como GALT (do inglês, Gut-Associated Lymphoid Tissue - GALT) é composto por células residentes na lâmina própria, pelos linfócitos intraepiteliais (do inglês, intraepithelial lymphocytes - IEL) e pelas células localizadas nos linfonodos mesentéricos (LNM) e nas placas de Peyer's, espalhadas ao longo de todo o intestino delgado (QI; TESTER, 2020). A homeostase intestinal é mantida pela presença de células T reguladoras (Tregs) e por mecanismos de proteção à mucosa intestinal, como: produção de muco, de IgA secretória (do inglês, secretory immunoglobulin A) e ativação de células anti-inflamatórias, como macrófagos e células dendríticas CD103+, que auxiliam na diferenciação de células TCD4 em Tregs na presença TGF- β e ácido retinóico (RA) (AGUIAR et al., 2018; MUCIDA et al., 2011);

Não apenas a ingestão de alimentos, mas principalmente a qualidade nutricional, exerce influência na diferenciação das células do sistema imune e na liberação de citocinas no microambiente intestinal (AGUIAR et al., 2018b; DARIA ESTERHÁZY; DANIEL MUCIDA, 2019; FARIA et al., 2013). Por exemplo, o estresse oxidativo gerado pelo alto consumo de bebidas contendo frutose está diretamente relacionado ao aumento nas concentrações de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β (Interleucina - 1 β), IL-6 (Interleucina - 6) e TNF- α (do inglês, tumor necrose factor - α)

(LUBAWY; FORMANOWICZ, 2023). De forma similar, o consumo excessivo de refeições ricas em gorduras saturadas, carboidratos refinados e sódio induz um processo inflamatório tanto no intestino quanto em outros tecidos (AGUIAR et al., 2018; BURR et al., 2023; CHRIST; LAUTERBACH; LATZ, 2019; DARIA ESTERHÁZY; DANIEL MUCIDA, 2019; HÉLÈNE SEROUSS, 2019; KAWANO et al., 2022; LEE; DIXIT, 2020). Em contrapartida, dietas ricas em lipídeos mono e poli-insaturados (do inglês, monounsaturated fatty acids - MUFA; do inglês, poliunsaturated fatty acids - PUFA, respectivamente) estão associadas à proteção metabólica, promovendo melhora na resistência à insulina, ao estimular a diferenciação de células pró-resolutivas/anti-inflamatórias e a liberação de adipocinas, bloqueando a liberação de citocinas inflamatórias como IL-1 α (Interleucina - 1 α), IL-1 β e IL-6 (FARIA et al., 2013).

A microbiota é um ecossistema complexo composto por bactérias, fungos, protozoários e vírus. Tais microrganismos colonizam a maior parte dos tecidos epiteliais no corpo humano, sendo o intestino grosso o local de maior concentração de microrganismos, contendo cerca de 10¹¹ microrganismos por grama de conteúdo intestinal (TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ et al., 2011). A microbiota intestinal pode ser modificada a partir dos componentes da dieta, consumo de aditivos alimentares, pré ou probióticos, por contaminação com microrganismos externos, uso de antibióticos e/ou outros medicamentos (ABIEGA-FRANYUTTI; FREYRE-FONSECA, 2021; KAWANO et al., 2022b; TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ et al., 2011).

A definição de microbiota intestinal saudável ainda é um desafio, uma vez que a composição de microrganismos pode variar expressivamente entre indivíduos além das limitações metodológicas que impedem a identificação de algumas espécies de microrganismos (WINTER; BÄUMLER, 2023). Contudo, o consumo de dietas ricas em açúcares e/ou gorduras estão relacionadas ao desenvolvimento de disbiose intestinal, uma condição caracterizada pela redução na diversidade, pela ausência de microrganismos simbióticos ou pela presença de microrganismos potencialmente prejudiciais, levando a efeitos deletérios a saúde do hospedeiro (ABIEGA-FRANYUTTI; FREYRE-FONSECA, 2021; CHEN et al., 2023; KAWANO et al., 2022b;

TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ et al., 2011; USUDA; OKAMOTO; WADA, 2021; WINTER; BÄUMLER, 2023).

A microbiota intestinal interfere na diferenciação, ativação e direcionamento da imunidade intestinal, principalmente ao que diz respeito ao metabolismo de linfócitos T e de células linfoides inatas do tipo 3 (do inglês, type 3 innate lymphoid cells – ILC3). Um perfil de microbiota saudável é caracterizado pela produção de muco e ácidos graxos de cadeia curta (do inglês, short-chain fatty acids – SCFA), que atuam de maneira anti-inflamatória e reguladora, diminuindo a diferenciação de células Th17 com fenótipo inflamatório (ABIEGA-FRANYUTTI; FREYRE-FONSECA, 2021). Por outro lado, a disbiose intestinal pode resultar na liberação aumentada de citocinas pró-inflamatórias, causar lesões na mucosa intestinal e aumentar a permeabilidade, facilitando a translocação bacteriana (CHEN et al., 2023; KAWANO et al., 2022b; USUDA; OKAMOTO; WADA, 2021).

Um estudo conduzido por Kawano (2022) mostrou que camundongos alimentados com dieta rica em gordura (do inglês, high fat diet – HFD) ou HFD com adição de 10% sacarose apresentaram quebra da homeostase imune intestinal, evidenciada pela redução de bactérias segmentadas filamentosas (do inglês, segmented filamentous bacteria - SFB), que são relacionadas a geração de células Th17 com características mais reguladoras. Esses animais também apresentaram piora nos parâmetros relacionados à síndrome metabólica, como o aumento da resistência à insulina, quando comparados com camundongos alimentados com dieta convencional. Outro estudo mostrou que animais submetidos a uma dieta com restrição em fibras (do inglês, fiber-deprived diet – FD) apresentaram redução na α -diversidade e, ao nível de filo, uma redução significativa em Bacteroidetes e aumento em Proteobacteria, em comparação com animais tratados com dieta convencional. Além disso, os animais FD apresentaram integridade da barreira epitelial prejudicada, com níveis reduzidos de proteínas de junção (do inglês, tight junctions) como occludin e zonula occludens (ZO-1), resultando em aumento da permeabilidade intestinal (SHI et al., 2021). Esse aumento na permeabilidade foi acompanhado por inflamação exacerbada, tanto local quanto sistêmica, com maiores níveis de expressão de

citocinas inflamatórias, como TNF- α , IL-6 e IL-1 β , no cólon e no plasma (SHI et al., 2021).

1.3 O eixo intestino-microbiota-cérebro

O eixo intestino-microbiota-cérebro (eIMC) é uma via de comunicação bidirecional que envolve mediadores hormonais, neurais e imunológicos, como o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), o sistema simpático-suprarrenal, nervo vago, citocinas, neuropeptídeos, SCFA e triptofano (WACHSMUTH; WENINGER; DUCA, 2022). O eIMC desempenha papel essencial na regulação do comportamento alimentar. A regulação do apetite envolve sinais originados no intestino em resposta à ingestão ou ausência de alimentos, estes sinais se comunicam com o sistema nervoso central (SNC), através do nervo vago e de peptídeos intestinais como GLP-1, PYY, grelina e colecistoquinina (CCK) (MORAN; THAPALIYA, 2021). Em resposta, o cérebro coordena as percepções de fome e saciedade, controlando a ingestão alimentar, o gasto energético e a homeostase da glicose (ABIEGA-FRANYUTTI; FREYRE-FONSECA, 2021; WACHSMUTH; WENINGER; DUCA, 2022).

Além da sua função no controle alimentar e na ingestão energética, o eIMC desempenha um papel importante nos processos de regulação comportamental. A serotonina, ou 5-hidroxitriptamina (5-HT) é um neurotransmissor muito conhecido por sua ação no sistema nervoso central (SNC), onde regula o sono, o humor e também o apetite. Curiosamente, cerca de 95% da 5-HT é produzida pelas células enterocromafins (EC) no trato gastrointestinal (TGI), em resposta à microbiota intestinal e seus metabólitos. E, além de sua função no SNC, a 5-HT age no intestino influenciando processos de mobilidade intestinal, resposta imune e neurogênese, participando como um mensageiro parácrino na interação entre células imunes e neurônios entéricos, com papel importante nos processos de inflamação intestinal (GRONDIN; KHAN, 2024; NAJJAR; HUNG; MARGOLIS, 2023; YU et al., 2022).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define saúde como um conceito mais abrangente, considerando-a como o completo bem-estar físico, mental e social, e não

apenas como ausência de doença ou enfermidade física (Ministério da Saúde, 2020). Neste contexto, a ansiedade é uma reação natural do corpo que ajuda a manter o foco e o estado de alerta a partir da ativação do eixo HPA. Porém, quando percebida de maneira persistente e exacerbada, a ansiedade se torna patológica, reduzindo consideravelmente a qualidade de vida do indivíduo, que passa a apresentar preocupação, apreensão e nervosismo excessivos, além de manifestações clínicas como sudorese excessiva, insônia, alteração no apetite e taquicardia (AUCOIN et al., 2021). Segundo a OMS, em 2019, 970 milhões de pessoas conviviam com algum tipo de transtorno psiquiátrico em todo o mundo, dessas 31% diagnosticadas com transtorno de ansiedade (WHO, 2022). Entre brasileiros, a ansiedade atingia no mesmo ano 27,4% da população, sendo as mulheres a parcela mais afetada (32,5%) (DA COSTA et al., 2019). Embora a etiologia dos distúrbios psiquiátricos ainda não esteja completamente elucidada, evidências recentes têm apontado para a relação entre o padrão alimentar ocidental e o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos, como distúrbios do humor, do sono, transtorno de ansiedade generalizada e depressão (AUCOIN et al., 2021; GOMES et al., 2020).

A microbiota humana é uma comunidade complexa que se relaciona simbioticamente com o hospedeiro, estando associada a manutenção da saúde, metabolismo de fibras e outros nutrientes não digeríveis no trato gastrointestinal, síntese de vitamina K, ácidos biliares e maturação do sistema imune (MAGNE et al., 2020). A composição da microbiota intestinal é modulada pela dieta e conta com, aproximadamente, 100 trilhões de microrganismos e mais de 5.000 espécies distintas (BEAM; CLINGER; HAO, 2021), sendo que mais de 90% da comunidade total é representada pelos filos Firmicutes e Bacteroidetes (MAGNE et al., 2020). Os filos bacterianos Firmicutes, Bacteroidetes e Proteobacteria são os mais predominantes no intestino, sendo que maior abundância de Bacteroidetes e menor abundância relativa de Firmicutes e Proteobacteria estão associadas a perfis de microbiota intestinal saudável (CHEN et al., 2023; TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ et al., 2011; USUDA; OKAMOTO; WADA, 2021; WINTER; BÄUMLER, 2023).

Para além da relação entre maus hábitos alimentares e desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis, tem sido crescente o número de estudos que relacionam a nutrição e saúde mental, principalmente pela compreensão do papel desempenhado pelo eIMC. Um estudo observou que o tratamento com dieta rica em fibras, além de melhorar o metabolismo de glicose e lipídeos, aumentou a abundância relativa de bactérias da microbiota intestinal produtoras de SCFAs e atenuou os sintomas associados à depressão e ansiedade em indivíduos adultos portadores de DM2 tratados com a dieta (CHEN et al., 2023). A exposição a alimentos ricos em açúcares prejudica a função hipocampal e pré-frontal do cérebro e intensifica os processos neuroinflamatórios (GOMES et al., 2020). Perfis saudáveis de microbiota intestinal desempenham funções neuroprotetivas, por outro lado, alterações negativas na microbiota intestinal podem levar ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e provocar neurodegeneração (SHANDILYA et al., 2022).

Estudos mostram que transtornos psíquicos são bastantes prevalentes entre pacientes com doenças crônicas (AUCOIN et al., 2021; WANG et al., 2024), estima-se que 1/3 dos pacientes afetados com DII apresentem ansiedade e 1/4 apresentem depressão (BARBERIO et al., 2021). A inflamação intestinal associada à disbiose pode favorecer o desenvolvimento de doenças inflamatórias intestinais (DIIs) crônicas, que por sua vez pode contribuir para o desenvolvimento de distúrbios psiquiátricos, como a ansiedade e depressão (SERRA; ALMEIDA; DINIS, 2019). Embora nos últimos anos a literatura tenha sido enriquecida com discussões sobre o eIMC, a relação entre intestino e cérebro ainda não está totalmente compreendida.

1.4 Doenças inflamatórias intestinais

As DIIs são desordens idiopáticas crônicas e recorrentes (SERRA; ALMEIDA; DINIS, 2019). Uma revisão sistemática apontou para o crescente aumento da incidência e a prevalência de DIIs no século XXI em todo o mundo, principalmente entre países que apresentam consumo elevado de produtos industrializados, ricos em

gorduras e açúcares, associados a altas taxas de sedentarismo (NG et al., 2017), colocando as DIIs como um grave problema de saúde global.

Entre as DIIs mais comuns estão a Colite Ulcerativa (do inglês, *ulcerativa colitis* – UC) e a Doença de Chron (do inglês, *Chron Disease* - CD), que se diferem no que diz respeito à extensão das lesões inflamatórias (GUAN, 2019). A inflamação característica da UC acomete toda extensão do intestino grosso e reto, envolvendo especificamente mucosa e submucosa, sem áreas livres de inflamação. Já na CD, todo o trato gastrointestinal pode ser afetado, sendo mais prevalente na porção distal do intestino delgado - o íleo, intestino grosso e reto, e todas as camadas intestinais (mucosa, submucosa, muscular e serosa) podem ser afetadas pela inflamação, porém na CD pode haver áreas livres de inflamação. As manifestações clínicas de ambas as doenças incluem períodos de exacerbação e remissão, diarreia muco-sanguinolenta, urgência evacuatória, dor abdominal, febre, inapetência, fraqueza e perda de peso. O diagnóstico é realizado por meio de colonoscopia, retossigmoidoscopia, biopsia e exames laboratoriais (GUAN, 2019).

Diversos estudos discutem o papel dos nutrientes no desfecho das DIIs. Por exemplo, um estudo mostrou que dietas ricas em sal aumentam a inflamação intestinal, ao estimular a ativação de células Th17, exacerbando a UC induzida por DSS (do inglês, *Dextran Sulfate Sodium*) (AGUIAR et al., 2018). Animais tratados com diferentes concentrações de sacarose, seja na dieta ou na bebida, apresentavam piores respostas quando desafiados com DSS para indução de UC (BURR et al., 2023).

Embora a patogênese das DIIs ainda não seja completamente compreendida, sabe-se que os mecanismos envolvidos no desenvolvimento das desordens incluem a quebra da homeostase imunológica intestinal (MUCIDA et. al., 2011; GUAN et. al., 2019). A presença de Tregs é um importante marcador para homeostase intestinal, e alguns estudos sugerem que a presença de Tregs no intestino suprime o desenvolvimento de colite ulcerativa (MUCIDA, et. al, 2011). Em contrapartida, alguns estudos têm levantado hipóteses sobre um possível papel protetor das células Treg (T reguladoras) no desenvolvimento da UC (VAN, 2023). Por exemplo, as citocinas IL-22

(interleucina 22), IL-17A, IL-17F e GM-CSF (do inglês, *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) desempenham uma duplicidade de funções, pois embora sejam importantes na proteção do indivíduo contra patógenos extracelulares, também estão associadas às respostas inflamatórias observadas nas doenças inflamatórias, como é o caso das DIIs por levar à diferenciação de células Th17 com perfil mais pró-inflamatório (MUCIDA, 2011).

O contexto do microambiente intestinal define como ocorrerá a diferenciação de células Th17, determinando se essas células apresentarão fenótipo mais regulatório ou pró-inflamatório. Por exemplo, células Th17 podem ter sua diferenciação iniciada a partir da presença de IL-6 ou por TGF- β (do inglês, *transforming growth factor*). Na colite experimental, um dos modelos mais bem caracterizados é a transferência de células T *naive* em camundongos RAG $^{-/-}$. O ambiente linfopênico do camundongo *knockout* (KO) favorece a proliferação e diferenciação das células TCD4 *naive* do doador no hospedeiro. Na presença de IFN- γ e IL-17, as células TCD4 $^{+}$, expressando T-bet e ROR γ t, diferenciam-se em células Th1 ou Th17, respectivamente, e migram como células efectoras para o intestino e outros tecidos, desencadeando o processo inflamatório envolvido no desenvolvimento das DIIs (MUCIDA, 2011).

A literatura científica apresenta resultados inconclusivos sobre os efeitos do consumo crônico de SSB no desenvolvimento da resposta inflamatória intestinal e na regulação do comportamento. O eixo intestino-microbiota-cérebro surge como um possível ponto de convergência entre saúde física e mental. Sabendo da importância da dieta na modulação da resposta imunológica e da microbiota intestinal, é fundamental investigar a possível relação entre o consumo excessivo de SSB com frutose e o desenvolvimento de distúrbios comportamentais, bem como a susceptibilidade a doenças inflamatórias intestinais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar o impacto do consumo crônico de bebida açucarada no eixo intestino-cérebro no contexto fisiológico e durante um processo inflamatório em camundongos C57BL/6.

2.2 Objetivos específicos

- Investigar se o consumo crônico de bebida adoçada tem influência na morfologia intestinal;
- Analisar a frequência de células TCD4+ nos linfonodos mesentéricos e no baço após consumo crônico de bebida açucarada;
- Avaliar a microbiota intestinal após o consumo crônico de bebida açucarada.
- Avaliar se o consumo crônico de bebida açucarada é capaz de alterar o comportamento inato dos roedores;
- Determinar se o consumo crônico da bebida açucarada agrava o desenvolvimento da colite experimental;

3 METODOLOGIA

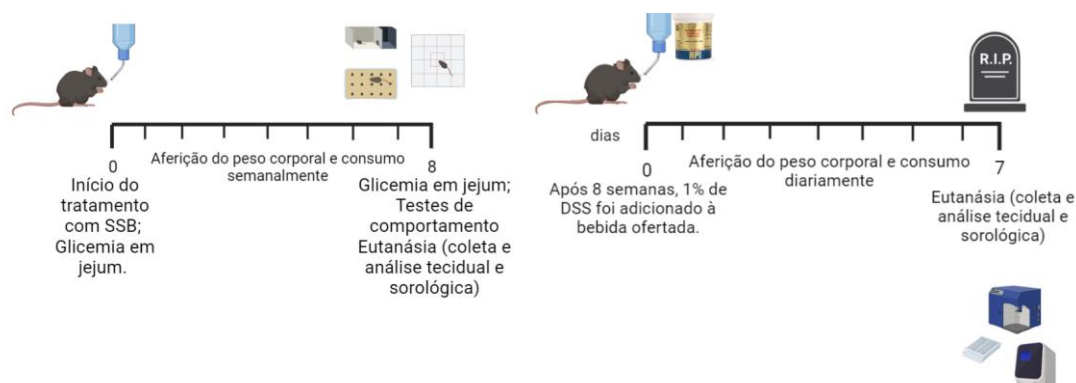


Figura 1. Desenho experimental.

3.1 Animais

Camundongos machos C57BL/6, entre 6 a 8 semanas de idade, foram mantidos no biotério do Laboratório de Imunobiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais em gaiolas coletivas com no máximo 5 animais. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), protocolo 126/2020.

3.2 Dieta experimental e bebida açucarada

Os experimentos tiveram duração de 8 semanas, onde os animais foram tratados com dieta *American Institute of Nutrition-93G* (AIN-93G) (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993) (Tabela 1) e água ou SSB *ad libitum*. Dessa forma, foram formados dois grupos: a) AIN93G + água (controle); b) AIN93G + SSB (experimental).

AIN-93G	
INGREDIENTES	g/Kg
AMIDO DE MILHO	397,48
CASEÍNA	200
AMIDO DEXTRINIZADO	132
AÇÚCAR CRISTAL	100
ÓLEO DE SOJA	70
CELULOSE	50
MIX MINERAL	35
MIX VITAMÍNICO	10
L-CISTINA	3
BITARTARATO DE COLINA	2,5
BHT	0,014

Tabela 1. Formulação da dieta *American Institute of Nutrition-93G* (AIN-93G) (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993).

A SSB é composta por água filtrada adicionada de glicose e frutose na proporção de 45:55, respectivamente (GONCALVES et al., 2019). Em uma concentração de 30% para mimetizar o consumo de SSB contendo xarope de milho rico em frutose (do inglês, *High Fructose Corn Syrup*, HFCS-55).

3.2.1 Indução da Colite por DSS

Após 8 semanas, a colite ulcerativa foi induzida pela adição de DSS a 1% na água por um período de 7 dias. Para isso, os 2 grupos iniciais foram subdivididos da seguinte forma:

- a) Grupo Água
- b) Grupo Água + DSS
- c) SSB
- d) SSB + DSS

O peso corporal dos animais foi aferido diariamente juntamente com a presença de diarreia e/ou sangramento. O consumo de SSB e água foi medido a cada dois dias.

3.3 Peso corporal e composição corporal

O peso corporal dos animais foi aferido no mesmo dia da semana e horário durante todas as 8 semanas de experimento. A temperatura do biotério foi controlada em aproximadamente 27°C para garantir que a temperatura corporal dos animais se mantivesse constante.

O ganho de peso médio de cada grupo foi avaliado e expresso pela comparação entre o peso final de cada animal e o peso inicial.

$$\Delta \text{peso} = \text{peso final} - \text{peso inicial}$$

Para que fosse possível avaliar a composição corporal, os animais foram pesados no momento da eutanásia e, após, o tecido adiposo epididimal foi retirado e pesado para cálculo do índice de adiposidade a partir da seguinte fórmula:

$$\% \text{ adiposidade} = \frac{\text{tecido adiposo epididimal (g)}}{\text{peso corporal (g)}}$$

3.4 Obtenção do Soro

Os animais foram anestesiados intraperitonealmente utilizando 100-150µL de uma solução contendo 25% de Cloridrato de Quetamina 10% e 25% Xilazina 2% e 50% de salina fisiológica. O sangue foi coletado através de pulsão cardíaca, transferido para microtubos e centrifugado a 12000 rpm por 10 minutos para separação do soro, seguido da coleta e armazenamento a -25°C para análises posteriores. uL

3.5 Caracterização do perfil metabólico

3.5.1 Caracterização do perfil glicêmico

A glicemia basal dos animais foi avaliada com a medida da glicemia após 6 horas de jejum na semana inicial e na final do experimento utilizando glicômetro *On Call Plus* (ACON Laboratories, Inc. San Diego, USA). A glicemia pós-prandial foi caracterizada por meio da análise do soro obtido e com a utilização do Kit Bioclin (referência K082-2), seguindo as orientações do fabricante. Após o período de incubação, a absorbância das soluções foi lida em 490nm e com os valores obtidos realizou-se as seguintes equações:

$$\text{Glicemia} \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right) = \frac{(\text{absorbância da amostra})}{(\text{absorbância do padrão})} * 100$$

A glicosúria foi mensurada pela medida da glicemia presente na urina dos animais utilizando glicômetro *On Call Plus* (ACON Laboratories, Inc. San Diego, USA) no momento da eutanásia.

3.5.2 Caracterização do perfil lipídico

O perfil lipídico foi caracterizado pelos níveis de triglicerídeos e colesterol total sérico, avaliados no soro obtido e pela utilização do Kit Bioclin (referência K117 e K083, respectivamente), seguindo as orientações do fabricante. Após o período de incubação, a absorbância das soluções foi lida em 490nm e com os valores obtidos realizou-se as seguintes equações:

$$\text{Triglicérides} \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right) = \frac{(\text{absorbância da amostra})}{(\text{absorbância do padrão})} * 100$$

$$\text{Colesterol Total} \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right) = \frac{(\text{absorbância da amostra})}{(\text{absorbância do padrão})} * 200$$

3.6 Análises Histológicas

3.6.1 Coleta e fixação dos tecidos

Após eutanásia, as porções distais do íleo e do intestino grosso foram retiradas e fixadas em solução de formol 10% por 24h. Após esse período, foram imersas em álcool 70% até a data do processamento. Durante o processamento, foram imersos em xilol e incluídos em parafina para formação de blocos com os seus fragmentos. Os cortes histológicos foram realizados com 4 μ m de espessura. A parafina foi retirada em estufa a 96°C por 15 minutos para coloração. As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) e escaneadas para análise das vilosidades intestinais e criptas. O software *Case Viewer* foi utilizado para análise da morfometria intestinal.

3.6.2 Análises morfológicas do intestino delgado.

As imagens foram obtidas em aumento de 20x para avaliação da morfometria dos vilos e profundidade das criptas do intestino delgado, especificamente da porção distal do íleo.

Para morfometria das vilosidades, foram consideradas cinco vilos íntegros por secção histológica de 500 μ m, descontando-se as criptas, de 5 campos diferentes por animal. O resultado foi expresso pela média de 25 vilosidades de cada amostra. Para a profundidade das criptas, foram consideradas 5 criptas íntegras à esquerda dos vilos medidos, medidas desde o seu ápice até o final da glândula (Figura 1).

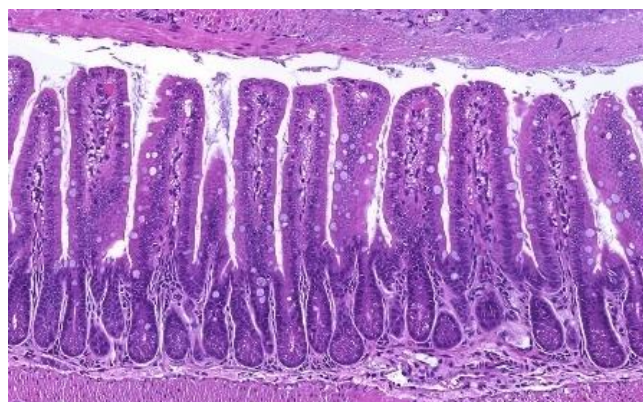


Figura 2. Morfologia do intestino delgado (íleo) em aumento de 20x.

3.6.3 Análises morfológicas do intestino grosso.

As imagens foram obtidas em aumento de 20x para avaliação da profundidade das criptas do intestino grosso. Para isso, foram selecionadas 5 criptas íntegras por secção histológica de 500µm de 5 campos diferentes por animal. O resultado foi expresso pela média de 25 vilosidades de cada amostra (Figura 2).

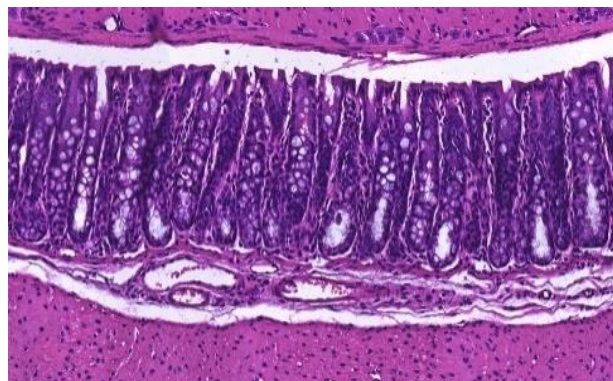


Figura 3. Morfometria do intestino grosso em aumento de 20x.

3.6.4 Análise Histológica na Colite Ulcerativa

A análise da estrutura morfológica das criptas intestinais foi realizada avaliando o estado de conservação do epitélio intestinal e verificando a presença ou ausência de degradação tecidual. Com base nessa avaliação, foi calculada a área lesada decorrente do desenvolvimento da colite ulcerativa.

A área lesada foi obtida pela extensão total de tecido histológico por animal e a extensão total das áreas comprometidas pela colite (quando presente), isto é, áreas com ausência de tecido epitelial. Para normalizar os resultados, os valores percentuais das áreas lesadas foram calculados utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ área lesada} = \frac{\text{lesão } (\mu\text{m}) * 100}{\text{intestino grosso } (\mu\text{m})}$$

3.7 Avaliação da doença

3.7.1 Avaliação macroscópica da Colite Ulcerativa - Escore Clínico

Para avaliação macroscópica da doença foram avaliados três parâmetros no sétimo dia de oferta do DSS: perda de peso total, presença de diarreia e sangramento

retal. Os parâmetros foram classificados como descrito por Cooper e colaboradores (1993).

A perda de peso foi calculada como a diferença percentual entre o peso inicial e o peso final. A diarreia foi definida como a ausência de formação de *pellets* fecais e a presença de material fecal fluido no cólon. O sangramento por sua vez foi definido a partir da observação visível de sangue nas fezes e/ou no reto. Os três parâmetros foram avaliados separadamente, sendo pontuados da seguinte forma: 1) perda de peso (0: normal; 1,2,3 e 4: 1-5%, 6-10%, 11-15%, >15%, respectivamente); 2) diarreia (0: normal; 2: moderada; 4: severa); 3) sangramento (0: ausente; 2: moderado; 3: severo). Para o escore clínico, somou-se a pontuação de cada item podendo totalizar o máximo de 12 pontos.

3.7.2 Escore inflamatório da Colite Ulcerativa

O escore inflamatório foi realizado em método semiquantitativo de acordo com o descrito por McCafferty e colaboradores (2000), onde as características teciduais foram classificadas em: 1) destruição da arquitetura da mucosa (0: normal; 1,2 e 3: dano leve, moderado e severo, respectivamente); 2) presença ou ausência de infiltrado celular (0: normal; 1,2 e 3: infiltração leve, moderada e intensa); 3) espessura do tecido muscular (0: normal; 1,2 e 3: espessamento leve, moderado e extenso); 4) presença ou ausência de abscessos na cripta (0: ausente; 1: presente). O escore de cada item foram somados e a pontuação máxima era de 12 pontos.

3.8 RT-qPCR

Para a RT-qPCR (do inglês, *real time quantitative Polymerase Chain Reaction*) foram utilizados primers específicos para os genes alvo desenhados a partir do banco de dados qPrimerDepot (CUI; TAUB; GARDNER, 2007) e genes de expressão endógena, ou controles, como Hprt e Gapdh (SIKAND et al., 2012). Para visualização e análise preliminar dos dados obtidos, foi utilizado o equipamento 7900HT System da Applied Biosystems utilizando o software SDSv2.4 da Applied Biosystems; em

sequência aplicou-se a metodologia de Quantificação Relativa ($\Delta\Delta CT$). As sequências dos primers utilizados encontram-se na Tabela 2.

As orientações do fabricante para extração do RNA das células foram, de forma simplificada:

- a) Homogeneização do tecido com adição de *TRIzol Reagent* (Invitrogen) para provocar a lise das células.
- b) Separação do RNA do fenol a partir da adição de clorofórmio.
- c) Adição de isopropanol para isolar o RNA.
- d) Ressuspensão do RNA em Água DNA/RNAse free.
- e) Análise da qualidade do RNA extraído utilizando *NanoDrop*.

Posteriormente, o RNA extraído foi convertido em cDNA (DNA complementar, do inglês *complementary DNA*) a partir da *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit* (Thermo Fisher), a partir do cDNA obtido foram realizadas as RT-qPCR.

Foram utilizados o *PowerUp SYBR Green Master Mix* (Thermo Fisher) e os primers descritos na Tabela 2 para formação do mix seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. O mix e as amostras foram plaqueados em *MicroAmp Optical 96-Well* DNA complementar, do inglês *complementary DNA Reaction Plate* (Applied Biosystems) que foi posteriormente selada usando *MicroAmp Optical Adhesive Film* (Applied Biosystems). Utilizando o aparelho *7900HT System* (Applied Biosystems) realizou-se a RT-qPCR.

Gene	Sequência (5' – 3')
GAPDH	GGTGAAGGTCGGTGTGAACT CTCGCTCCTGGAAGATGGTG
HPRT	GTTAAGCAGTACAGCCCCAAA AGGGCATATCCAACAACAACTT
ZO-1	CCAGCTTATGAAAGGGTTGTTC TCCTCTCTTGCCAACTTTTCTC
Muc2	TGTGGAACCGGGAAGATG GACCACAGGTATGGTTCTGGA
Htr1a	TTATCGCCCTGGATGTGCT GCGTCCTCTTGTTACGTAGTC
Htr1b	TCACATGGCCATTTTTGACT CAGTTTGTGGAACGCTTGTT

Tabela 2: Primers utilizados para avaliação da expressão gênica no intestino grosso.

3.9 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo foi utilizada para avaliação do fenótipo celular e da expressão de determinadas moléculas em células extraídas dos linfonodos mesentéricos (LMNs) e do baço. Essas células foram marcadas e avaliadas para análise da frequência de células TCD4⁺.

As células foram lavadas com PBS-BSA (0,5% BSA, do inglês, *bovine serum albumin*) e incubadas em placa de poliestireno por 20 minutos com Fc-block (anti-CD16/CD3 – BD *Biosciences*) a 4°C. Em seguida, lavadas e centrifugadas para então serem adicionadas com 20µl do mix de anticorpos conjugados com fluorocromos reativos para as moléculas de superfície de interesse. A placa foi incubada por mais 30 minutos a 4°C. Para marcação intracelular dos fatores de transcrição Foxp3, GATA3, ROR γ t e T-bet utilizou-se o kit comercial de fixação/permeabilização (e-*Bioscience*) e subsequente incubação por 30 minutos a 4°C, ao abrigo de luz. Em sequência, a placa foi lavada e centrifugada e as células foram fixadas com 200µl de solução contendo 1% paraformaldeído por 30 minutos, lavadas novamente e armazenadas em PBS a 4°C até o momento da leitura no citômetro de fluxo.

A aquisição das amostras foi realizada no FACS Fortessa (BD *Biosciences*) acoplado a um computador com o software Diva (BD *Biosciences*). As populações de interesse foram delimitadas por tamanho e granulosidade (*Forward Scatter* – FSC x

Side Scatter – SSC) e 50.000 ou 100.000 eventos foram adquiridos para análise subsequente utilizando o *softwareFlowJo*, versão 10.10.0. Na Tabela 3, estão indicados os marcadores utilizados na citometria, bem como os respectivos fluorocromos e marcas.

Marcador	Fluorocromo	Marca
L/D	Amcyan	Invitrogen
CD45	APC	eBioscience
CD3	PerCP-Cy5.5	BioLegend
CD4	APC-Cy7	BD Biosciences
T-bet	Pacific blue	BD Biosciences
RORgt	PE	BD Biosciences
FoxP3	FITC	Invitrogen
Fc-block	-	BD Biosciences

Tabela 3: Anticorpos utilizados na citometria de fluxo.

3.9.1 Estratégia de análise das populações de interesse

As populações de interesse foram identificadas a partir da seleção padrão para leucócitos (FSC-A) e granulocidade (SSC-A) e a partir dessa identificação as populações positivas e negativas foram separadas de acordo com os marcadores utilizados (Figura 3).

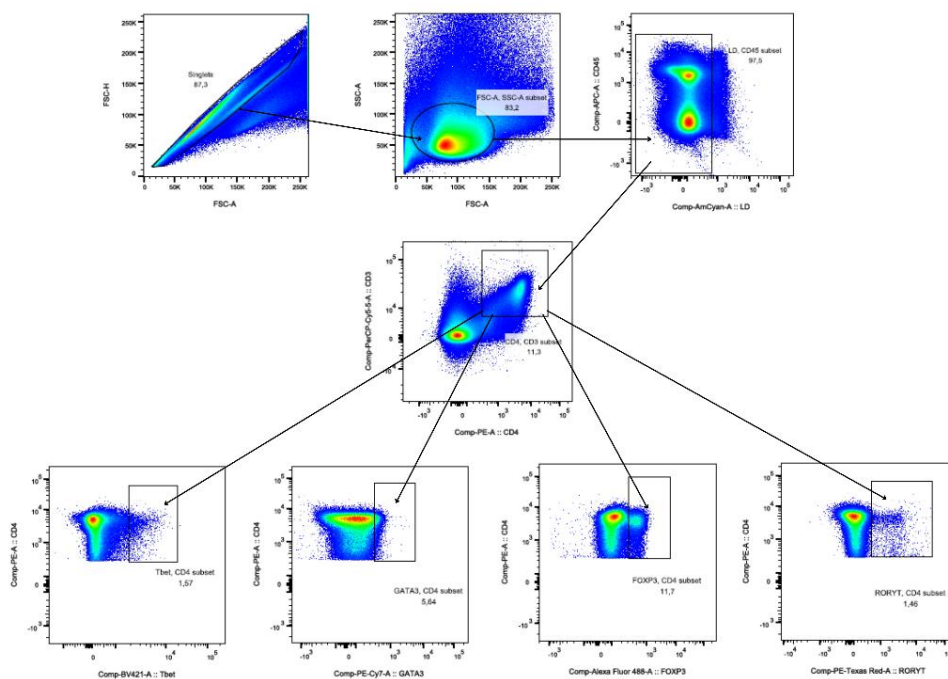


Figura 4. Estratégia de análise para citometria de fluxo. Singlets foram selecionados por *forward scatter height* (FSC-H) versus *forward scatter area* (FSC-A). Em seguida, as células totais foram então selecionadas por *side scatter area* (SSC-A) e FSC-A. Selecionamos as células vivas CD45+ e identificamos as populações linfóides a partir da expressão de CD3+ e CD4+. As subpopulações de linfócitos foram identificadas pela expressão de Tbet+ (Th1), GATA3+ (Th2), RORyt+ (Th17) e Foxp3+ (Tregs).

3.10 qPCR dos grupos da microbiota intestinal

Para mensuração dos grupos bacterianos presentes no conteúdo intestinal dos animais foi performada a quantificação absoluta por qPCR (do inglês, *quantitative Polymerase Chain Reaction*) (MACKAY, 2004). Foi extraído o DNA total de 0,15 gramas do conteúdo intestinal utilizando-se o QIAamp® DNA Stool Mini Kit (QIAGEN®, São Paulo, Brasil) de acordo com o descrito pelo fabricante. As reações, realizadas em duplicata, usando 10µL do agente intercalante SYBR® Green (Kapa Biosystems, São Paulo, Brasil), 1µL de DNA (12,5 ng), 8,2µL de água e 0,4µL da solução primers (10µM) que tiveram como alvo regiões do gene rRNA 16S, região que confere as assinaturas específicas aos grupos de interesse (Tabela 4). Para o

controle negativo, foi adicionado 1 µL de água em substituição ao DNA. As condições de ciclagem foram: 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, sendo a captação da fluorescência feita na temperatura de 60°C. Todas as reações foram realizadas em duplicata no aparelho CFX 96TM Real time system (BioRad).

Alvo	Sequência (5' – 3')	RRN	Amplicon	TM	Referência
Eubacteria	AAACTCAAANKGAATTGACGG CTCACRRCACGAGCTGAC	5,2	180	60	Bacchetti De Gregoris et al., 2011
Filo Firmicutes	GGAGYATGTGGTTTAATTCGAAGCA AGCTGACGACAACCATGCAC	6,8	126	60	Guo et al., 2008
Filo Bacteroidetes	CRAACAGGATTAGATACCCT GGTAAGGTTCCCTCGCGTAT	4	240	60	Bacchetti De Gregoris et al., 2011
Filo Proteobacteria	TCGTCAGCTCGTGTGTGA CGTAAGGGCCATGATG	5,4	170	60	KLASE ET AL, 2015
Filo Actinobacteria	TACGGCCGCAAGGCTA TCRTCCCCACCTTCTCCG	3,2	170	60	Bacchetti De Gregoris et al., 2011
Gênero Lactobacillus	AGCAGTAGGGAATCTTCCA CACCGCTACACATGGAG	5,7	144	59	(García-Albiach et al., 2008)
Gênero Bacteroides	GAGAGGAAGGTCCCCCAC CGCTACTTGGCTGGTTCAG	5,2	106	60	Layton et al., 2006
Gênero Clostridium	AAATGACGGTACCTGACTAA CTTTGAGTTTCATTCTTGCGAA	9,4	438	60	Dias et al, 2014
Gênero Blautia	GTGAAGGAAGAAGTATCTGG TTGGTAAGGTTCTTCGCGTT	5,2	559	55	KURAKAWA ET AL., 2015

Tabela 4: Primers utilizados para avaliação de representantes bacterianos.

A quantificação de células bacterianas presentes nas amostras foi realizada a partir da comparação do ct de uma curva padrão com amostras de DNA conhecido dos representantes de grupos bacterianos com o ct das amostras de DNA bacterianos em diluição em série com fator 10 (KIM; LIM; LEE, 2013; MOREIRA JÚNIOR et al., 2019). Na comparação é determinado o número de cópias do gene rRNA 16S em cada amostra. Para a quantificação, o número de células bacterianas é dividido pela quantidade de cópias do gene rRNA 16S presentes especificamente em cada grupo analisado. Esse número foi obtido no banco de dados rrnDB versão 5.7

(<https://rrndb.umms.med.umich.edu/>) (LEE; BUSSEMA; SCHMIDT, 2009; STODDARD et al., 2015). Os dados utilizados para a análise estatística representam a porcentagem em relação ao total de bactérias. Os primers e os números de rrn utilizados estão representados na tabela 1.

3.11 Testes comportamentais

Para investigar os efeitos do consumo crônico de SSB no comportamento dos animais, estes foram submetidos a três diferentes testes: Caixa Claro/Escuro, Campo Aberto e *Marble Burying Test*.

3.11.1 Caixa Claro x Escuro

O teste da caixa claro/escuro foi realizado conforme descrito por Magalhães e colaboradores (2018). Esse teste é baseado na aversão natural do camundongo a locais abertos e iluminados e no comportamento exploratório espontâneo de roedores em resposta a estressores leves e tem como função avaliar o comportamento semelhante à ansiedade (BOURIN; HASCOËT, 2003). No último dia de experimento, cada animal foi alocado individualmente no compartimento escuro da caixa, que conta com passagens para possibilitar o trânsito livre entre esta área e a clara. Os camundongos foram filmados durante os 5 minutos em que exploraram essas seções e os vídeos foram avaliados no software EthoVision® XT versão 12 (Noldus Information Technology, Utrecht, The Netherlands) (NOLDUS, 2001). Foram registrados o tempo gasto no compartimento claro, a latência, o número de transições e a distância percorrida na parte clara. Nesse cenário, menor tempo no compartimento claro e maior latência associam-se ao comportamento semelhante à ansiedade nos animais, assim como a menor distância percorrida e um menor número de transições entre os compartimentos claro e escuro (BOURIN; HASCOËT, 2003; COSTALL et al., 1989).

3.11.2 Campo Aberto

O teste de campo aberto é frequentemente utilizado para investigar o comportamento exploratório, o comportamento semelhante ao ansioso e a atividade locomotora geral. Para aplicação do teste, os animais foram avaliados individualmente. Eles foram colocados no centro de um aparato constituído por uma caixa de madeira (câmara quadrada de 30 cm² e altura de 18,5 cm). A área central foi definida como a região de 10 × 10 cm no centro do campo. Os animais foram filmados durante um período de 5 (cinco) minutos de exploração e os vídeos foram analisados utilizando o software EthoVision® XT versão 12 (Noldus Information Technology, Utrecht, The Netherlands) (LIM et al., 2001; NOLDUS, 2001). Foram analisados o tempo na área central, o número de entradas na área central, número de rotações, velocidade, imobilidade e distância percorrida. Foram geradas figuras correspondentes à trajetória percorrida de cada animal dentro da caixa durante os 5 (cinco) minutos de teste.

3.11.3 Marble burying Test

Ao final de 8 (oito) semanas de experimento, os animais foram submetidos ao teste Marble Burying, que tem como objetivo investigar impulsividade e comportamento obsessivo-compulsivo (ANGOIA-PÉREZ et al., 2013; JOEL, 2006). A realização do teste seguiu o descrito em trabalhos anteriores. (MARTINS DE CARVALHO et al., 2019; WICKE; GROSS, 2005).

Cada animal foi avaliado individualmente em uma gaiola padrão forrada com 5cm de serragem, onde foram dispostas 18 (dezoito) bolas de vidro em 3 fileiras com seis unidades distribuídas uniformemente. O teste teve duração de 10 (dez) minutos, após esse período foi contado o número de bolas de vidro com, pelo menos, 2/3 do seu tamanho encobertos por serragem. Essa contagem foi conduzida por dois pesquisadores independentes, de maneira a obter-se uma média de bolas enterradas e assim foi possível mensurar o comportamento compulsivo de cada animal (JOEL, 2006).

3.12 Análise Estatística

Para as análises estatísticas entre as variáveis utilizou-se o *software GraphPad Prism 8*. O teste de normalidade Shapiro-Wilk foi utilizado para determinar a distribuição das amostras e, em seguida, foram executados os testes t de *Student, One-way ANOVA* ou *Two-way ANOVA* considerando-se o nível de significância $p < 0,05$. Os dados foram representados pela média \pm desvio padrão. As linhas tracejadas presentes nos gráficos referentes aos experimentos com colite indicam os valores médios dos determinados marcados em animais saudáveis tratados com água filtrada.

4 RESULTADOS

4.1 A oferta de bebida açucarada alterou o metabolismo de glicose sem provocar alterações no peso corporal e na morfologia intestinal

O grupo experimental apresentou alterações no padrão alimentar, os animais desse grupo comeram menos ($p = < 0,0001$) (Figura 5A) e beberam mais ($p = < 0,0001$) (Figura 5B) em comparação ao grupo controle. Esse achado resultou em maior consumo calórico cumulativo no grupo experimental ($p = 0,0071$) (Figura 5C). Contudo, o consumo calórico aumentado no grupo experimental não resultou em diferenças em relação ao peso corporal e índice de adiposidade entre os grupos (Figura 5D e E).

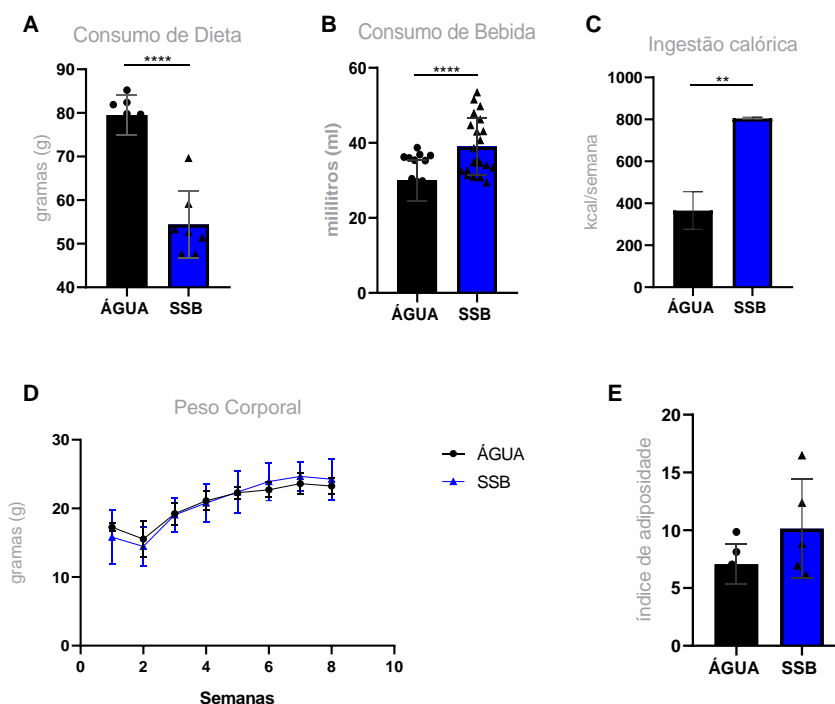


Figura 5. O consumo crônico de bebida açucarada alterou o consumo alimentar, mas não o peso e a composição corporal. (A) O consumo de dieta foi representado pela média do consumo semanal de dieta AIN93G de cada grupo. (B) O consumo de bebida foi representado pela média do consumo de bebida ofertada a cada dois dias por grupo. (C) A ingestão calórica total foi representada pela média de consumo durante as oito semanas de cada grupo. (D) O ganho de peso foi monitorado semanalmente e expresso pela média de cada grupo. (E) Após sacrifício, o tecido adiposo epididimal foi coletado para realização do cálculo do índice de adiposidade, expresso por: *tecido epididimal/peso corporal final* de cada animal por grupo; grupo controle (n=6), grupo experimental (n=5). Barras representam valores de média \pm desvio padrão de um grupo; **p=0,0071; ****p= <0,0001, teste t de *Student*.

A glicemia de cada animal foi utilizada para análise do perfil glicêmico, uma vez que o consumo de carboidratos refinados está relacionado à piora no metabolismo de carboidratos (PATKAR et al., 2021). Os animais tratados com SSB apresentaram glicose sérica aumentada em comparação aos animais do grupo controle (p= 0.0331) (Figura 6A). Entretanto análises da glicemia pós-prandial em teste enzimático e também da glicosúria não indicaram alterações entre os grupos (Figura 6B e C). Não foram encontradas diferenças no perfil lipídico entre os grupos (Figura 6D e E).

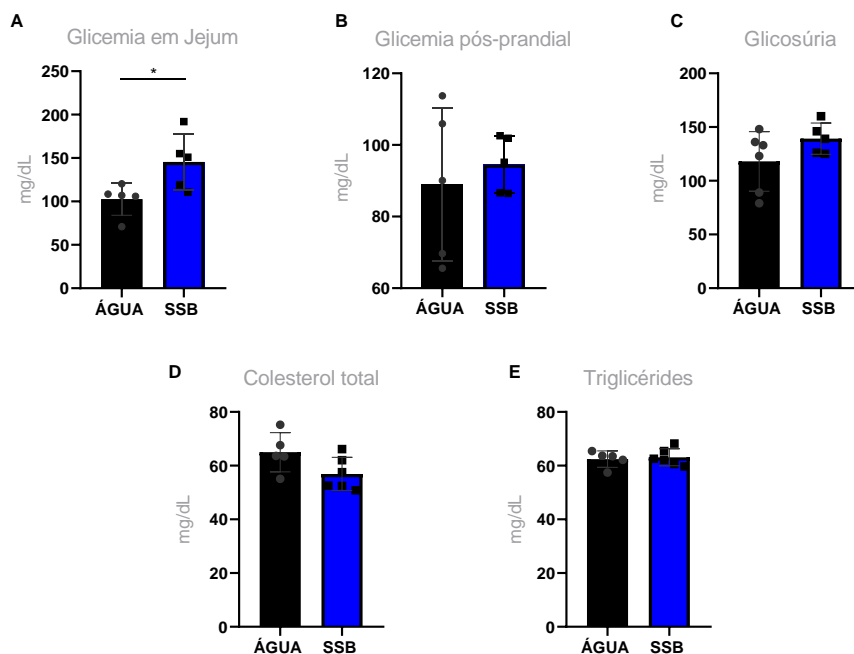


Figura 6. O consumo crônico de bebida açucarada alterou o metabolismo de carboidratos, mas não o de lipídeos. (A) A glicemia basal foi aferida após jejum ao final das 8 semanas de experimento utilizando glicosímetro de tiras ACCU CHECK, o sangue coletado foi obtido da ponta da cauda de cada animal. (B) A glicemia pós-prandial foi avaliada por reação enzimática a partir do soro coletado por pulsão cardíaca de cada animal e expressa pela média de cada grupo. (C) A glicosúria foi avaliada a partir da medição da glicose presente na urina de cada animal utilizando glicosímetro de tiras ACCU CHECK. (D) O colesterol total foi analisado a partir do soro utilizando kit para reação enzimática. (E) O triglicérides foi analisado a partir do soro utilizando kit para reação enzimática; (n=6). Barras representam valores de média \pm desvio padrão de um grupo; * $p=0,0331$, teste t de *Student*.

O intestino delgado representa a maior superfície de contato entre o meio externo e interno do indivíduo, estando exposto constantemente a mudanças. Por isso, é um órgão extremamente complexo. O intestino delgado precisa, então, equilibrar suas funções, se dividindo entre absorção de nutrientes e proteção do hospedeiro contra patógenos e toxinas. Diversos estudos buscam entender como os nutrientes se relacionam com os processos biológicos de remodelação do epitélio intestinal (CHRIST; LAUTERBACH; LATZ, 2019; SEROUSS, 2019; KINASHI; HASE, 2021; LEE; DIXIT, 2020; AGUIAR, 2004). Frente a isso, buscou-se avaliar se o consumo crônico de SSB seria capaz de interferir na morfologia do intestino delgado e grosso; e também nas populações de células TCD4⁺ nos linfonodos mesentéricos e baço.

Não foram observadas diferenças na porção distal do intestino delgado no que diz respeito ao comprimento das vilosidades intestinais nem à profundidade das criptas entre os grupos controle e experimental na avaliação das secções histológicas (Figura 7A e B).

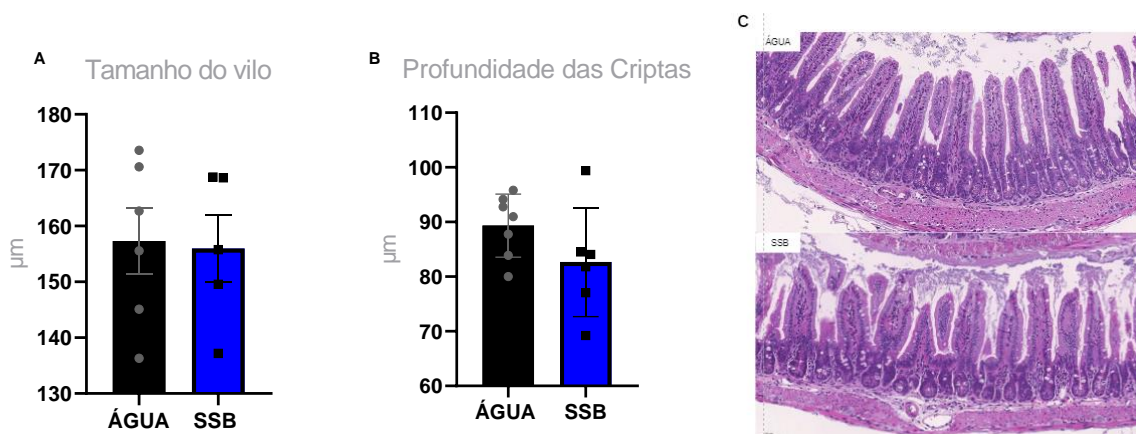


Figura 7. O consumo crônico de bebida açucarada não alterou a morfologia do íleo. (A) A profundidade da cripta de cada animal foi obtida a partir da média de 25 criptas medidas em 5 campos diferentes e representada como a média de cada grupo. (B) O comprimento das vilosidades intestinais de cada animal foi obtido pela média de 25 vilosidades, desprezando-se as criptas, em 5 campos diferentes e representada como a média de cada grupo; grupo controle (n=6); grupo experimental (n=5). (C) Imagens representativas de secções histológicas do intestino grosso em aumento de 20x. Barras representam valores de média \pm desvio padrão de um grupo; teste t de *Student*.

Na avaliação das secções histológicas do intestino grosso não foram observadas diferenças na profundidade das criptas entre os grupos controle e experimental (Figura 8A e B).

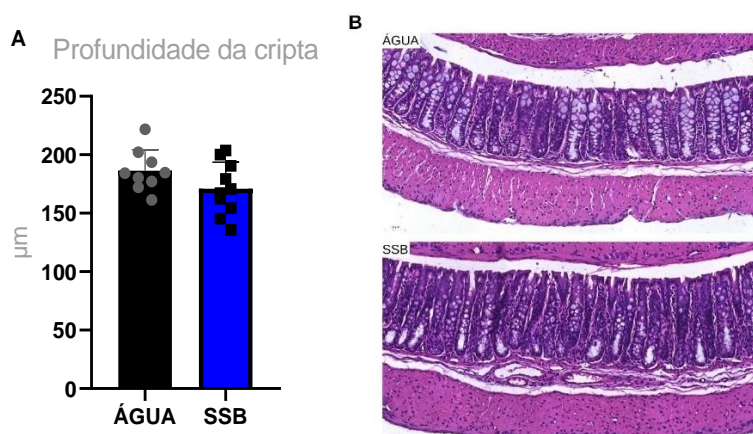


Figura 8. O consumo crônico de bebida açucarada não alterou a morfologia do intestino grosso. (A) A profundidade da cripta de cada animal foi obtida a partir da média de 25 criptas medidas em 5 campos diferentes e representada pela média de cada grupo; grupo controle (n=9), grupo experimental (n=10). (B) Imagens representativas de seções histológicas do intestino grosso em aumento de 20x. Barras representam valores de média \pm desvio padrão de um grupo; teste t de *Student*.

A homeostase intestinal depende da integridade da barreira epitelial, entendendo a importância dos componentes dietéticos na manutenção ou desordem dessa estrutura tecidual, a expressão de genes relacionados a manutenção da função de barreira no intestino grosso foi avaliada por RT-qPCR, são eles: *Mucin 2* (*Muc2*), *Zonula Occludens-1* (*Zo-1*) e *Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5* (*Lgr5+*) (SHAM et al., 2018). Nas análises, não foram observadas diferenças na expressão relativa dos genes acima citados (Figura 9).

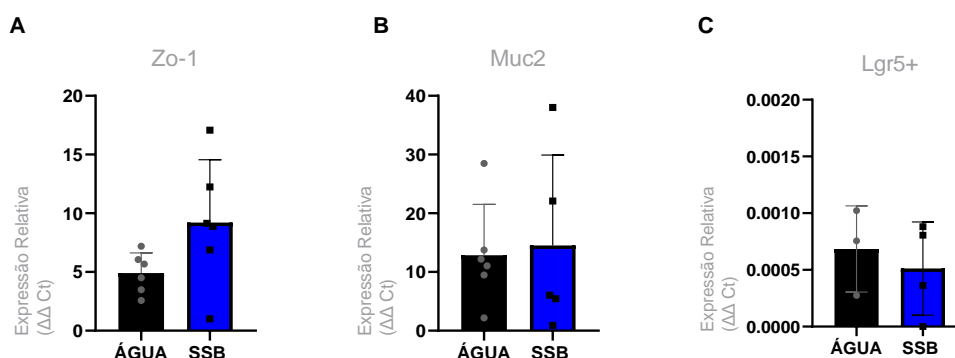


Figura 9. O consumo crônico de bebida açucarada não alterou a expressão de genes relacionados a função de barreira intestinal. Expressão relativa dos genes (A) *Muc2*; (B) *Zo-1*; e (C) *Lgr5+* no intestino grosso foi avaliado por RT-qPCR e representada pela média de cada grupo (n=6); Barras representam valores de média \pm desvio padrão de um grupo; teste t de *Student*.

4.2 O consumo crônico de bebida açucarada não alterou o perfil celular no baço e linfonodo mesentérico ilíaco

Como citado anteriormente, os nutrientes interagem com as células do sistema imune e são capazes de modular a resposta imunológica, por isso com o objetivo de investigar se o consumo crônico de SSB é capaz de alterar o perfil de células TCD4⁺ no linfonodo mesentérico distal e baço utilizamos a citometria de fluxo. Não foram

observadas diferenças na frequência no perfil de células TCD4⁺Th1, Th2, Th17 e/ou Treg no baço entre os grupos controle e experimental (Figura 10).

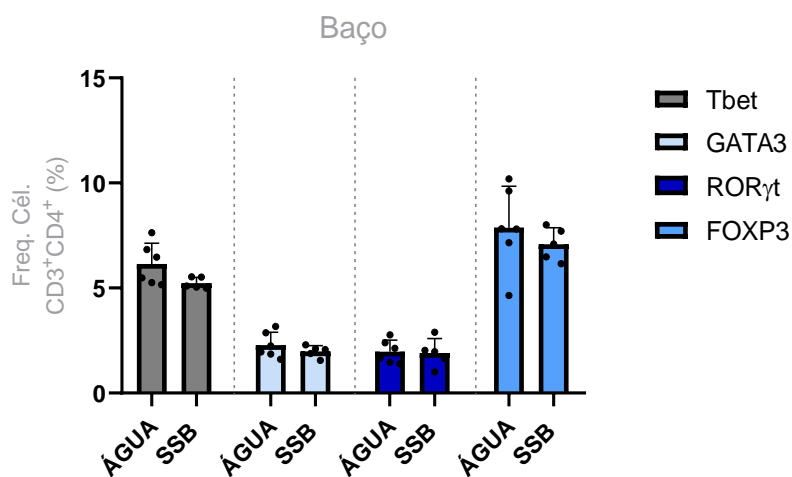


Figura 10. O consumo crônico de bebida açucarada não alterou o perfil celular de células CD3⁺CD4⁺ no baço. Representação da média da frequência de populações de células TCD4⁺ Th1, Th2, Th17 e Treg definidas pela expressão de Tbet, GATA3⁺, RORγT, FoxP3, no baço de camundongos C57BL/6 que consumiram água (n=6) ou bebida açucarada (n=5) por 8 semanas. Barras representam valores de média ± desvio padrão de um grupo; teste t de Student.

Na análise dos linfonodos mesentéricos ilíacos não foram observadas diferenças entre os grupos no que diz respeito às populações de células TCD4 Th1, Th2, Th17 e Treg (Figura 11).

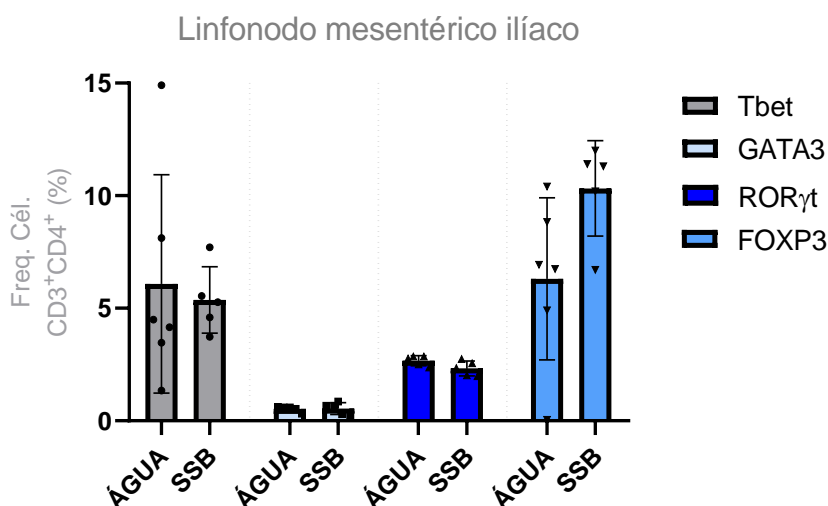


Figura 11. O consumo crônico de bebida açucarada não alterou o perfil celular de células CD3⁺CD4⁺ no linfonodo mesentérico ilíaco. Representação da média da frequência de populações de células TCD4⁺ Th1, Th2, Th17 e Treg definidas pela expressão de Tbet, GATA3⁺, RORγT, FoxP3,

no baço de camundongos C57BL/6 que consumiram água (n=6) ou bebida açucarada (n=5) por 8 semanas. Barras representam valores de média \pm desvio padrão de um grupo; teste t de *Student*.

4.3 O consumo crônico de bebida açucarada alterou a microbiota intestinal

A dieta é uma importante ferramenta de modulação da microbiota intestinal e a alimentação rica em carboidratos refinados e gorduras saturadas é uma das principais causas de desordens na composição da microbiota intestinal, conhecidas como disbiose intestinal (BURR et al., 2023; KAWANO et al., 2022; MOREIRA JÚNIOR et al., 2019).

A análise da microbiota a partir do DNA fecal dos animais tratados com SSB mostrou aumento na razão *Firmicutes:Bacteroidetes* (**0,0008) (Figura 12B), com redução na abundância relativa de *Bacteroidetes* (**** $p < 0,0001$) (Figura 12C) sem levar a alterações na abundância relativa de *Firmicutes* (Figura 12D) em comparação aos animais tratados com água. A abundância relativa de *Proteobacteria* (** $p = 0,0024$) (Figura 12E) foi elevada no grupo SSB, enquanto a abundância de *Actinobacteria* não apresentou alteração (Figura 12F) entre os grupos.

Ademais, a nível de gênero, a abundância relativa de *Lactobacillus* reduziu (* $p = 0,0189$) após o consumo crônico de SSB em comparação aos animais do grupo controle (Figura 12H). Não foram observadas diferenças entre os grupos na análise para *Blautia ssp* e *Clostridium ssp* (Figura 12G e I). Pode-se inferir a partir desses resultados que o consumo crônico de SSB por si só foi capaz de provocar alterações na microbiota intestinal.

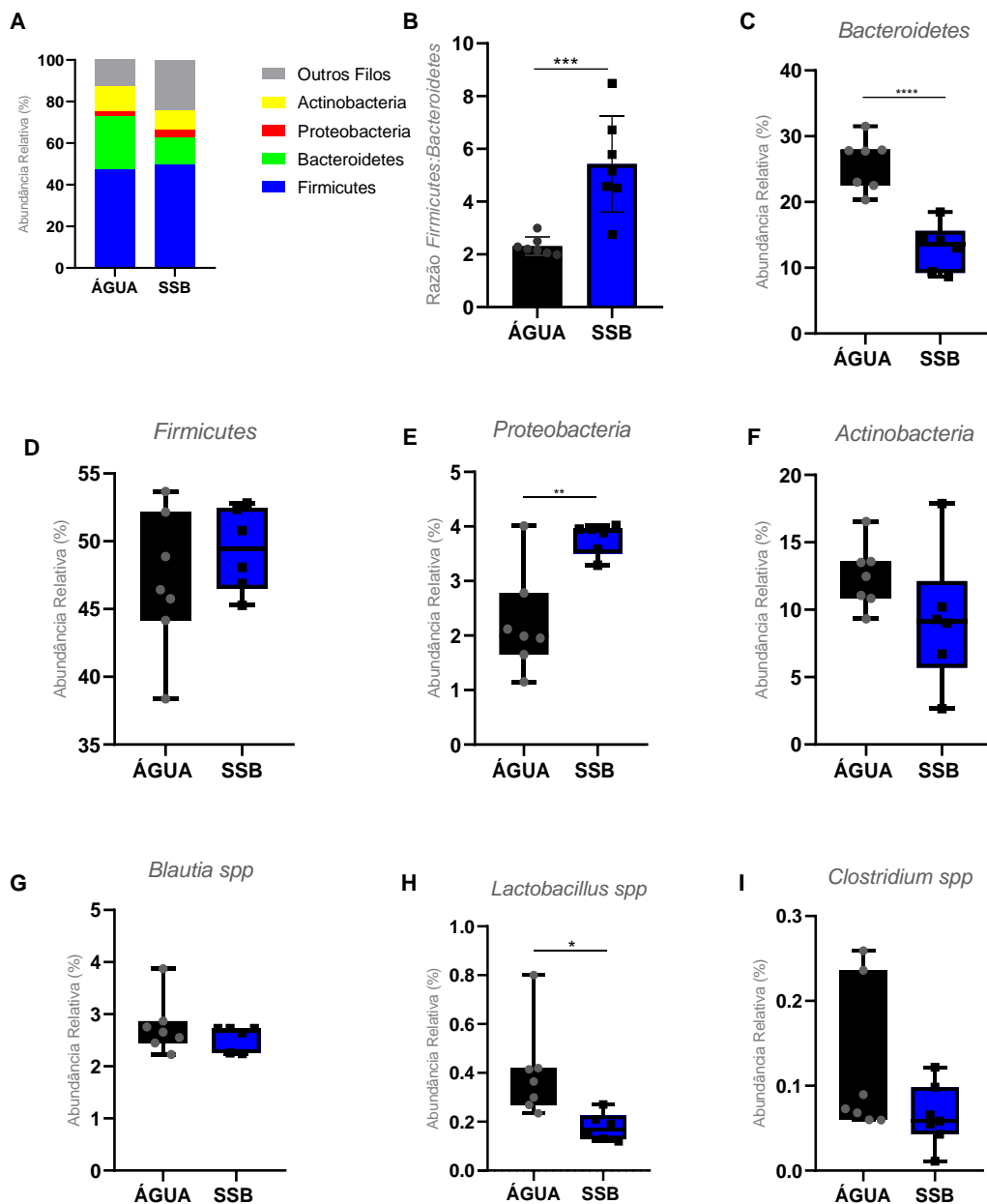


Figura 12. O consumo crônico de bebida açucarada alterou a microbiota intestinal. A visualização sumarizada da distribuição percentual dos filos por gráfico de barras (A); a razão *Firmicutes:Bacteroidetes* (B), a abundância relativa dos filos *Bacteroidetes* (C), *Firmicutes* (D), *Proteobacteria* (E) e *Actinobacteria*; e gêneros *Blautia spp* (G), *Lactobacillus spp* (H) e *Clostridium spp* (I) foram analisadas por RT-qPCR do DNA bacteriano extraído das fezes de cada animal no dia do sacrifício e representadas pela média de cada grupo. As caixas representam valores de média \pm desvio padrão de um grupo; * $p=0,0189$; ** $p=0,0024$; *** $p=0,0008$, **** $p<0,0001$; teste t de Student.

4.4 O consumo crônico de bebida açucarada alterou o comportamento inato de camundongos C57BL/6

Os animais foram individualmente submetidos ao *Marble Test* para avaliação do comportamento semelhante ao obsessivo-compulsivo após 8 semanas de experimento. Nesse teste, os animais do grupo experimental enterraram um número significativamente maior de bolas de vidro quando comparados com animais tratados com água ($p=0,0265$) (Figura 13A e B). Esse resultado indica um aumento do comportamento obsessivo-compulsivo em roedores.

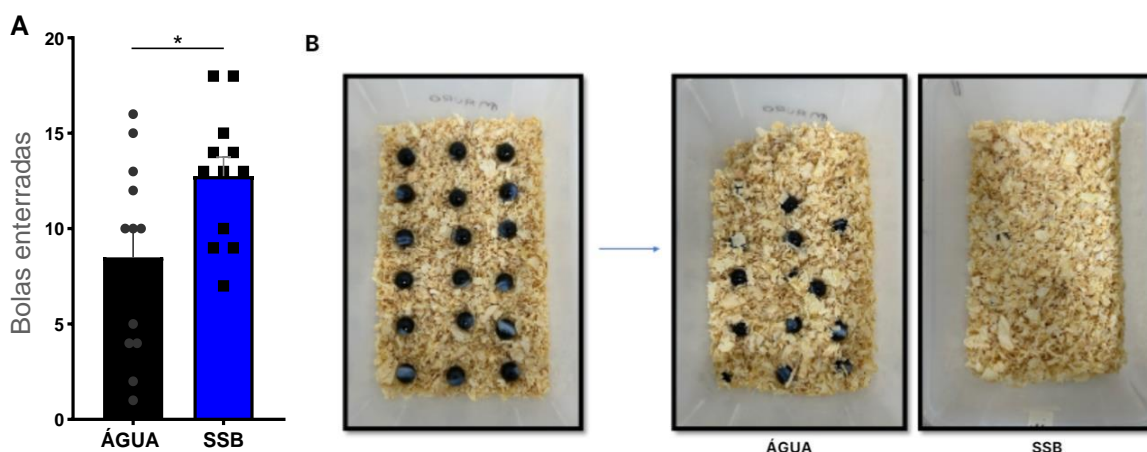


Figura 13. O consumo crônico de bebida açucarada alterou o comportamento semelhante ao compulsivo-obsessivo em camundongos. (A) Representação da média de bolas de vidro completamente enterradas após 5 minutos de teste por cada animal (B) Imagem representativa do início e do final do teste de cada grupo; ($n=12$). Barras representam valores de média \pm desvio padrão de um grupo; $p= 0,0265$; teste t de *Student*.

Os animais foram individualmente submetidos ao Teste da caixa Claro/Escuro para avaliação do comportamento semelhante ao ansioso após 8 semanas de experimento. Os animais tratados com SSB dispenderam mais tempo no compartimento claro ($p= 0,0326$) (Figura 14A) e realizaram mais transições entre os compartimentos claro e escuro ($p= 0,0225$) (Figura 14C) o que indica aumento do comportamento exploratório em roedores, comportamento este contrário ao esperado desses animais que têm dentre suas características a ansiedade inata, marcada por aversão a áreas iluminadas e interação social (YU et al., 2022).

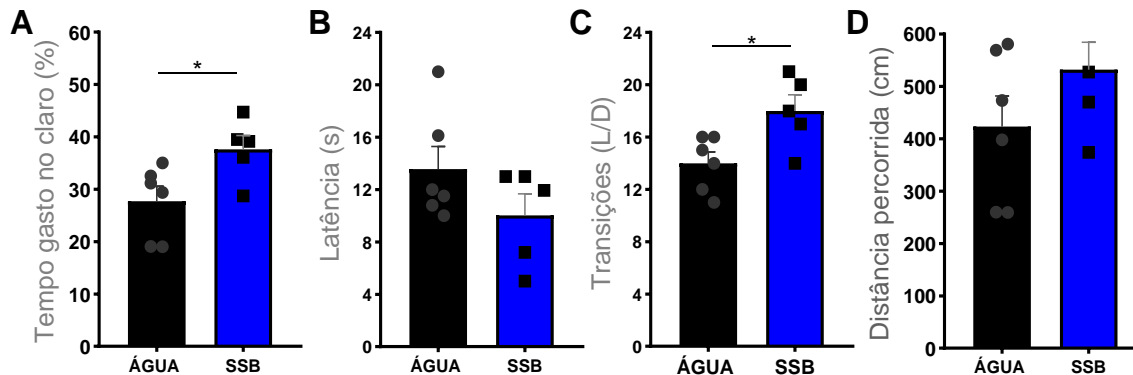


Figura 14. O consumo crônico de bebida açucarada alterou o comportamento semelhante ao ansioso em camundongos. (A) O tempo gasto no compartimento claro foi representado pelo tempo médio de cada animal durante 5 minutos de teste ($p=0,0326$) (B) O início da exploração da caixa, ou seja, o momento em que o animal realiza a primeira transição entre os compartimentos, de cada animal foi avaliado e representado pela média de cada grupo. (C) Representação média da quantidade de transições entre os compartimentos realizadas por cada animal durante os 5 minutos de teste ($p=0,0225$). (D) Representação média da distância percorrida em centímetros por cada animal durante os 5 minutos de teste; grupo controle ($n=6$), grupo experimental ($n=5$). Barras representam valores de média \pm desvio padrão de um grupo; teste t de *Student*.

Os animais foram individualmente submetidos ao Teste Open Field para avaliação do comportamento semelhante ao ansioso após 8 semanas de experimento. Os animais do grupo experimental passaram mais tempo na área central do campo ($p= 0, 0,0466$) (Figura 15A), apresentaram menor tempo de imobilidade durante os 30 minutos de teste ($p=0,0089$) (Figura 15E), exploraram mais a caixa ($p=0,0071$) (Figura 15F) em uma velocidade maior ($p= 0,0141$) (Figura 15D) quando comparados aos animais do grupo controle, com isso observou-se maior o comportamento exploratório nos animais que tiveram consumo crônico de SSB.

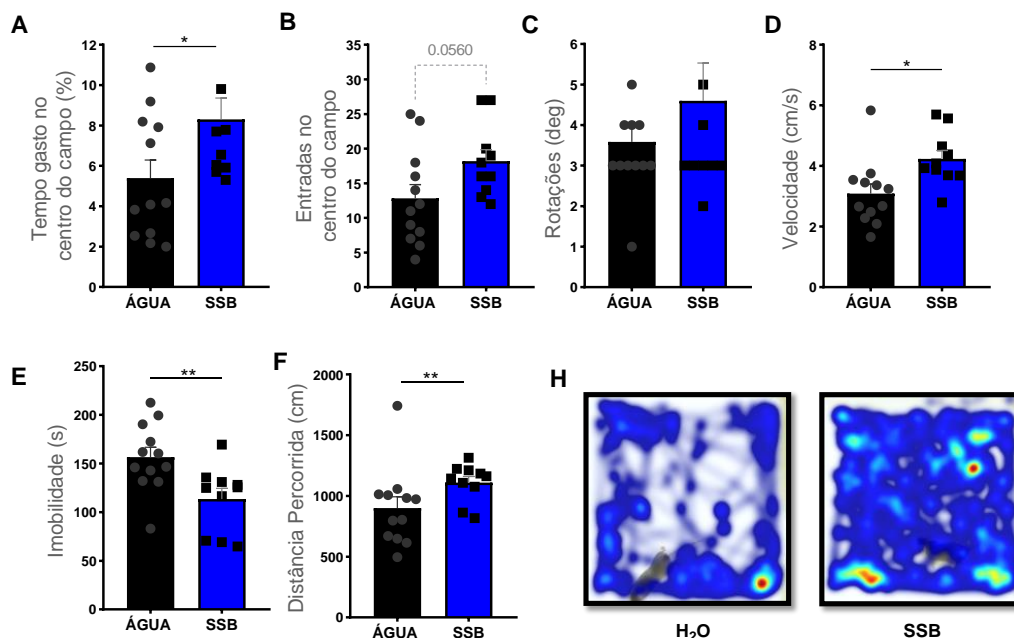


Figura 15. O consumo crônico de bebida açucarada alterou o comportamento semelhante ao ansioso em camundongos. (A) Representação média do percentual do tempo gasto no centro do campo por animal durante os 30 minutos de teste (*p=0,0466); (B) Representação média do número total de exploração da área centro do campo por animal durante os 30 minutos de teste; (C) Representação média do número de rotações em torno de si mesmo por animal durante os 30 minutos de teste; (D) Representação média da velocidade percorrida por animal durante os 30 minutos de teste em centímetros por segundos (*p=0,0141); (E) Representação média do tempo gasto imóvel por animal em segundos durante os 30 minutos de teste (**p=0,0089); (F) Representação da distância percorrida média por animal em centímetros (**p=0,0071); (H) Heatmap demonstrando a área explorada pelo animal no campo aberto. Barras representam valores de média \pm desvio padrão de um grupo; teste t de *Student*.

Mediante os resultados expostos até o presente momento, observa-se, em estado basal, embora o consumo crônico de SSB não altere o perfil de células TCD4⁺ nos linfonodos mesentéricos distais e baço, o metabolismo de carboidratos, a microbiota intestinal e o comportamento inato dos camundongos tratados com bebida contendo 30% de glicose e frutose por 8 semanas sofrem alterações.

O CONSUMO CRÔNICO DE BEBIDA AÇUCARADA AGRAVA O DESENVOLVIMENTO DA COLITE ULCERATIVA INDUZIDA POR DSS

4.5 O consumo crônico de bebida açucarada agravou o desenvolvimento da colite ulcerativa induzida por DSS

Após 8 semanas de experimento, os animais foram desafiados com 1% DSS (do inglês, *Dextran Sodium Salt*) na bebida por 7 dias para investigar se o consumo crônico e simultâneo de uma bebida contendo 30% de glicose e frutose poderia agravar o desenvolvimento da colite ulcerativa experimental. O peso corporal de cada animal, assim como a presença de diarreia e sangramento, foi avaliado diariamente conforme descrito por CHASSAING e colaboradores (2014). A perda de peso foi mensurada através do delta peso, subtraindo o peso corporal de cada animal do momento do sacrifício com o peso corporal do dia 01 antes da primeira oferta da bebida contendo DSS.

A perda de peso observada ao longo do desenvolvimento da colite ulcerativa foi exacerbada em animais tratados com SSB por 8 semanas quando comparados com os animais doentes tratados com água (** $p=0,0010$) (Figura 16A, B). Para definição do escore clínico, considerou-se a gravidade da perda de peso, a presença de diarreia e sangramento nas fezes. CHASSAING e colaboradores (2014) apontam para o fato de que os sinais e sintomas da doença serão notados a partir do terceiro dia de desafio. O tratamento com SSB agravou o escore clínico dos animais desafiados com DSS quando comparados com os animais também desafiados com DSS, mas tratados com água filtrada (* $p= 0,0135$) (Figura 16C). Não foram observadas diferenças no consumo de bebida entre os grupos ao longo dos 7 dias de desafio nem quanto ao consumo de DSS entre os grupos (Figura 16D). Assim, pode-se inferir que o desenvolvimento da colite nos animais do grupo SSB foi agravado devido ao consumo excessivo e crônico de açúcar.

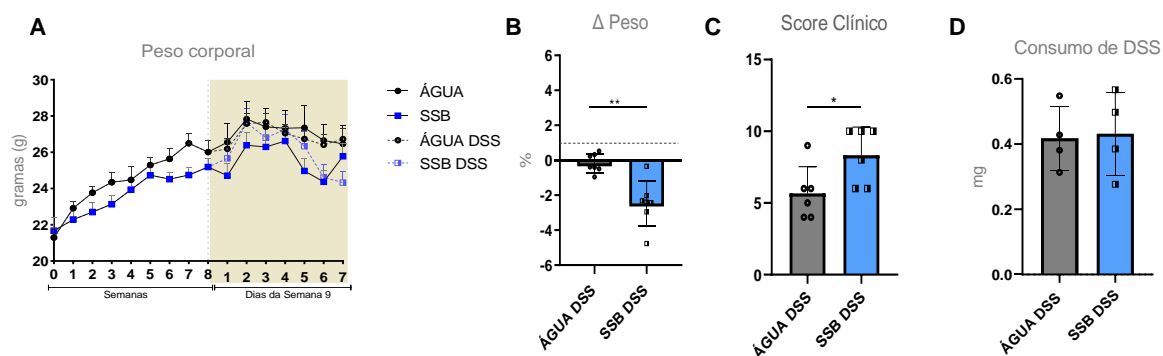


Figura 16. O consumo crônico de bebida açucarada agravou o desenvolvimento da colite

ulcerativa induzida por DSS. (A) O peso corporal foi avaliado individualmente semanalmente durante 8 semanas e, após a indução da colite pela adição de 1% de DSS na bebida de cada grupo, diariamente na semana 9. O resultado foi expresso pela da média do peso corporal de cada grupo. (B) Representação da perda de peso média por grupo, a partir da expressão: *peso final – peso inicial* de cada animal. A linha tracejada indica o comportamento médio do peso corporal de animais saudáveis tratados com água. (C) Representação da pontuação média do escore clínico, considerando presença de diarreia e/ou sangramento e perda de peso corporal total de cada animal por grupo (D) O consumo de DSS adicionado à bebida de cada grupo foi mensurado a partir da expressão: *Consumo de bebida total*1/100* e representado como a média consumida durante os 7 dias de desafio. (n=6). Barras representam valores de média \pm desvio padrão de um grupo; *p=0,0135; **p= 0,0010; teste t de Student.

A colite ulcerativa acomete principalmente o cólon e reto, podendo se apresentar de formas leves até mais graves (Chassing et al, 2014). O acometimento do cólon dos animais tratados com SSB apresentou-se de forma mais grave após o desafio com DSS quando comparado com os animais tratados com água filtrada.

Análises histológicas são essenciais para avaliação da integridade estrutural do epitélio intestinal, permitindo detecção de alterações morfológicas, inflamações e comprometimentos na arquitetura tecidual que podem indicar estados patológicos subjacentes. A integridade do epitélio intestinal dos animais doentes que consumiram SSB por 8 semanas foi significativamente afetada, sendo encontradas perdas expressivas na estrutura epitelial quando comparados com os animais doentes que receberam água (p=0,0492) (Figura 17B; Figura 18).

O escore inflamatório é utilizado como instrumento de medida do estado clínico podendo predizer desfechos (CHASSAING et al., 2014). Para obtenção do escore inflamatório a conservação da arquitetura da mucosa, a presença de infiltrado inflamatório, espessamento da musculatura intestinal e presença de abscessos na cripta foram pontuados como descrito anteriormente. O escore inflamatório dos animais doentes tratados com SSB foi superior ao dos animais doentes tratados com água (p=<0,0001) (Figura 17C). Em concordância com os resultados apresentados anteriormente, o consumo crônico de SSB possivelmente agravou os sinais e sintomas gastrointestinais relacionados à colite.

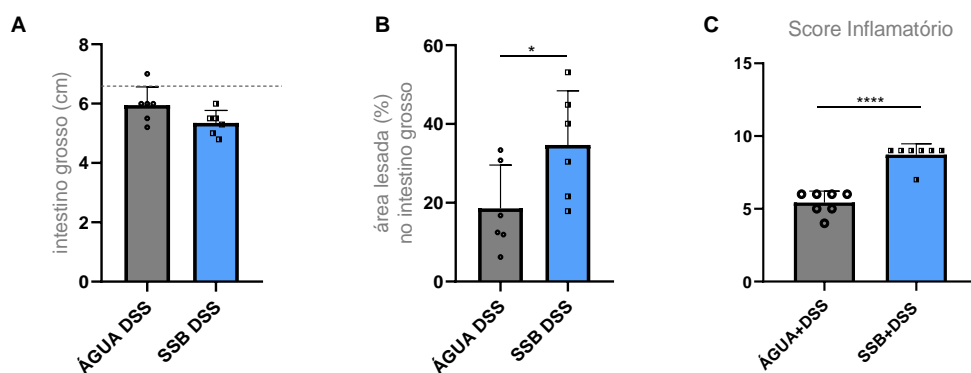


Figura 17. O consumo crônico de bebida açucarada exacerbou o acometimento intestinal durante a colite ulcerativa. (A) O comprimento do intestino grosso de cada animal foi representado como a média de cada grupo. A linha tracejada indica o comprimento médio do intestino grosso de animais saudáveis tratados com água filtrada. (B) A área lesada foi expressa a partir da fórmula: $\% \text{ área lesada} = (\text{lesão } (\mu\text{m}) * 100) / \text{intestino grosso } (\mu\text{m})$ e representada como a média de cada grupo. (C) O escore inflamatório foi avaliado individualmente, considerando presença de infiltrado inflamatório, espessamento da musculatura intestinal, presença de abscessos na cripta e conservação da arquitetura da mucosa e expresso como a média de cada grupo; (n=6). *p=0,0492; ****<0,0001; Barras representam valores de média \pm desvio padrão de um grupo; teste t de Student.

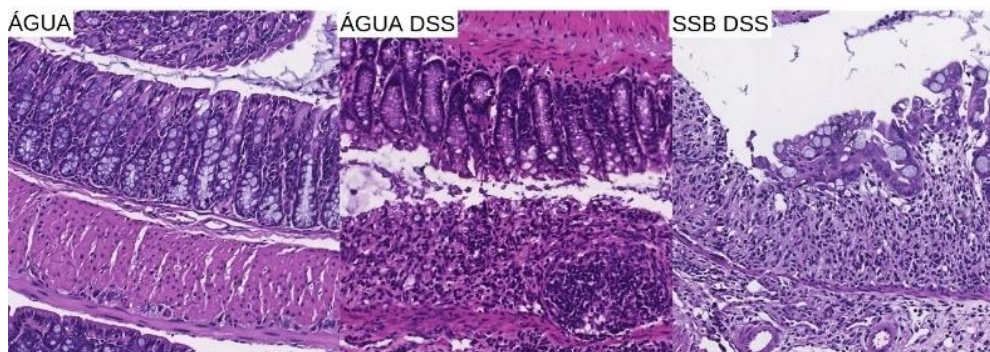


Figura 18. O consumo crônico de bebida açucarada exacerbou o acometimento intestinal durante a colite ulcerativa. Imagens histológicas do cólon de animais tratados com bebida açucarada com ou sem desafio com DSS em aumento de 20x.

Considerando que a fisiopatologia da colite ulcerativa está associada à deterioração da função de barreira intestinal, resultando em ao aumento da permeabilidade intestinal, diminuição da camada de muco e a maior risco de translocação bacteriana (ABIEGA-FRANYUTTI; FREYRE-FONSECA, 2021; AGUIAR et al., 2018; CHASSAING et al., 2014). Para avaliar o impacto do consumo crônico de SSB nessa condição, foi analisada a expressão de genes no intestino grosso

relacionados a manutenção da função de barreira intestinal, incluindo: *Mucin 2* (*Muc2*), *Zonula Occludens-1* (*Zo-1*) e *Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5* (*Lgr5+*)(SHAM et al., 2018).

O consumo crônico de SSB reduziu significativamente a expressão de *Muc2* (** $p=0,011$) e *Zo-1* (* $p=0,0262$) no intestino grosso de animais com colite ulcerativa quando em comparação com os animais doentes tratados com água filtrada (Figura 19A e B). Não foram observadas diferenças na expressão de *Lgr5+* (Figura 19C). Esses achados sugerem que o consumo crônico de SSB alterou a expressão de genes fundamentais para a homeostase intestinal, exacerbando a disfunção da barreira intestinal e, conseqüentemente, agravando a colite ulcerativa.

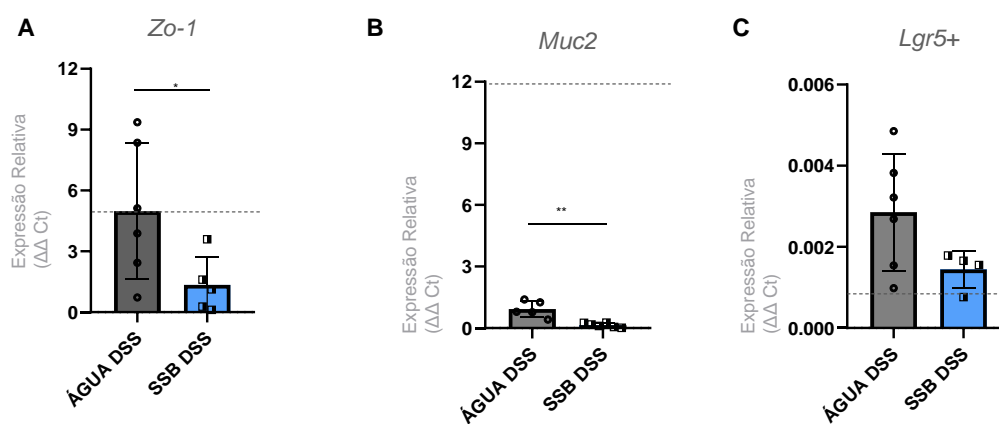


Figura 19. O consumo crônico de bebida açucarada alterou a expressão de genes relacionados a função de barreira intestinal durante a colite experimental. A expressão relativa dos genes (A) *Muc2*, (B) *Zo-1* e (C) *Lgr5+* no intestino foi avaliada por RT-qPCR e representada pela média de cada grupo. As linhas tracejadas indicam a expressão relativa média de animais saudáveis tratados com água; (n=6); * $p=0,0262$; ** $p=0,011$; Barras representam valores de média \pm desvio padrão de um grupo; teste t de *Student*.

4.6 O consumo crônico de bebida açucarada não alterou o perfil celular de células CD3⁺CD4 no baço na colite ulcerativa induzida por DSS

Considerando a relevância da UC como uma das principais DIIs e a íntima relação entre os componentes da dieta e a resposta imunológica de mucosa, este estudo investigou se o desenvolvimento de UC em animais tratados com SSB estaria associado a alterações no perfil celular TCD4⁺ nos linfonodos mesentéricos e baço.

Após 8 semanas de consumo, não foram observadas diferenças nas populações de células TCD4⁺ Th1, Th2, Th17 e/ou Treg do baço entre os grupos experimentais (Figura 20).

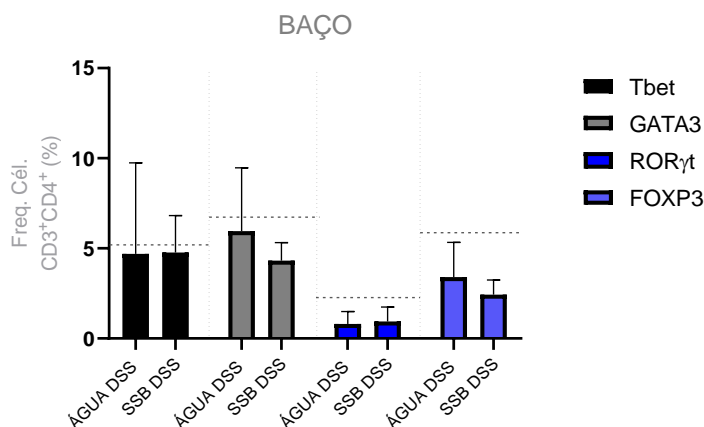


Figura 20. O consumo crônico de bebida açucarada não alterou o perfil celular de células CD3⁺CD4⁺ no baço na colite ulcerativa. Representação da média da frequência de populações de células TCD4⁺ Th1, Th2, Th17 e Treg definidas pela expressão de T-bet, GATA3+, RORγT, FoxP3, respectivamente, no baço de camundongos C57BL/6 desafiados com 1%DSS que consumiram água ou bebida açucarada. As linhas tracejadas indicam a frequência celular de cada população em animais saudáveis tratados com água filtrada. Barras representam valores de média ± desvio padrão de um grupo; teste t de *Student*.

4.7 O consumo de bebida açucarada alterou o perfil celular de células TCD4⁺ nos linfonodos mesentéricos na colite ulcerativa induzida por DSS

O consumo crônico de SSB alterou as populações de células TCD4⁺ nos linfonodos mesentéricos proximais, que drenam o duodeno e o jejuno. Não foram observadas diferenças entre os grupos que receberam bebida contendo 1% de DSS (Figura 21).

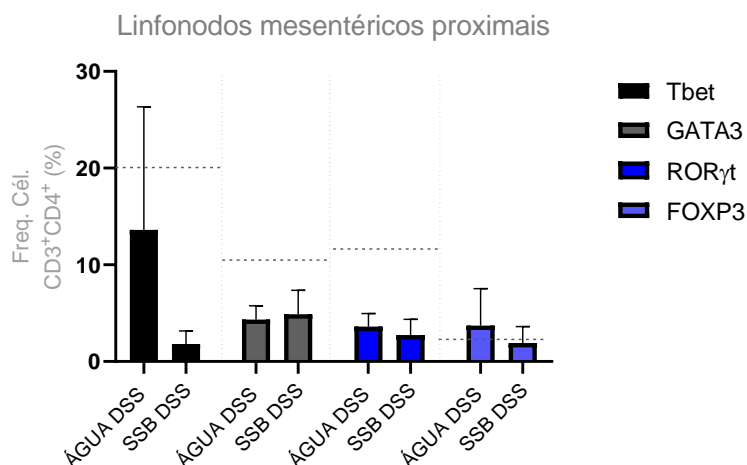


Figura 21. O consumo crônico de bebida açucarada alterou o perfil celular de células CD3⁺CD4⁺ nos linfonodos proximais na colite ulcerativa. Representação da média da frequência de populações de células TCD4⁺ Th1, Th2, Th17 e Treg definidas pela expressão de T-bet, GATA3⁺, RORγT, FoxP3, respectivamente, nos linfonodos mesentéricos proximais de camundongos C57BL/6 desafiados com 1%DSS que consumiram água ou bebida açucarada. As linhas tracejadas indicam a frequência celular de cada população em animais saudáveis tratados com água filtrada. Barras representam valores de média ± desvio padrão de um grupo; teste t de *Student*.

Nos linfonodos mesentéricos distais, que drenam o íleo e o cólon, o desafio com 1%DSS foi capaz de causar redução nas populações de células TCD4⁺. O consumo crônico de SSB reduziu significativamente as populações de células Th1 (**p=0,0068), Th17 (**p=0,0018) e Treg (*p=0,0124) nos animais desafiados com 1%DSS quando comparados com animais também desafiados, porém tratados com água filtrada (Figura 22).

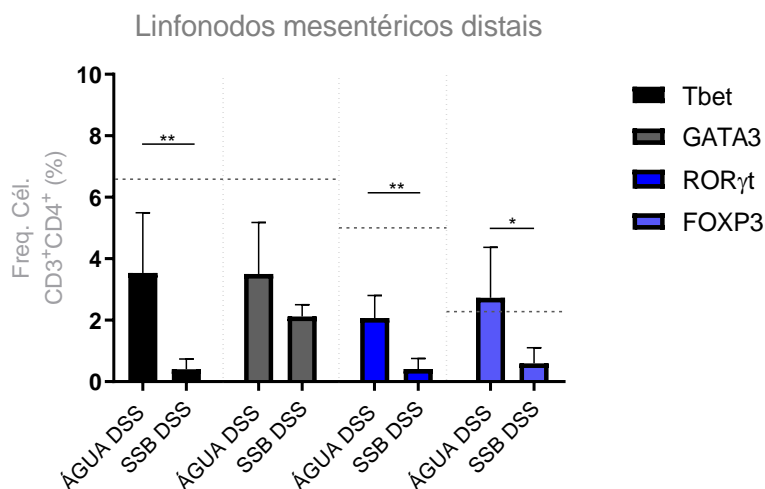


Figura 22. O consumo crônico de bebida açucarada alterou o perfil celular de células CD3⁺CD4⁺ nos linfonodos distais na colite ulcerativa. Representação da média da frequência de populações de células TCD4⁺ Th1, Th2, Th17 e Treg definidas pela expressão de T-bet, GATA3⁺, ROR γ T, FoxP3, respectivamente, nos linfonodos mesentéricos distais de camundongos C57BL/6 desafiados com 1%DSS que consumiram água ou bebida açucarada. As linhas tracejadas indicam a frequência celular de cada população em animais saudáveis tratados com água filtrada. Barras representam valores de média \pm desvio padrão de um grupo; * $p=0,0124$ ** $p=0,0018$; ** $0,0068$; teste t de Student.

4.8 As alterações na microbiota intestinal provocadas pelo consumo crônico de bebida açucarada foram exacerbadas na colite ulcerativa induzida por DSS

A análise da microbiota intestinal revelou que animais tratados com SSB e desafiados com 1%DSS apresentaram significativo aumento na razão *Firmicutes:Bacteroidetes* (Figura 23B), ocasionado principalmente pela redução da abundância relativa de *Bacteroidetes* (**** $p<0,0001$) (Figura 23C), enquanto a abundância relativa de *Proteobacteria* aumentou significativamente (** $p=0,0009$) (Figura 23E) em comparação aos com os animais com colite, porém tratados com água.

A nível de gênero, foram observadas redução importante na abundância relativa de *Blautia* spp (** $p=0,0027$) (Figura 23G), *Lactobacillus* spp. (** $p=0,0003$) (Figura 23H) nos animais doentes tratados com SSB quando comparados com animais tratados com água. A abundância de *Clostridium* spp não sofreu alterações (Figura 23I).

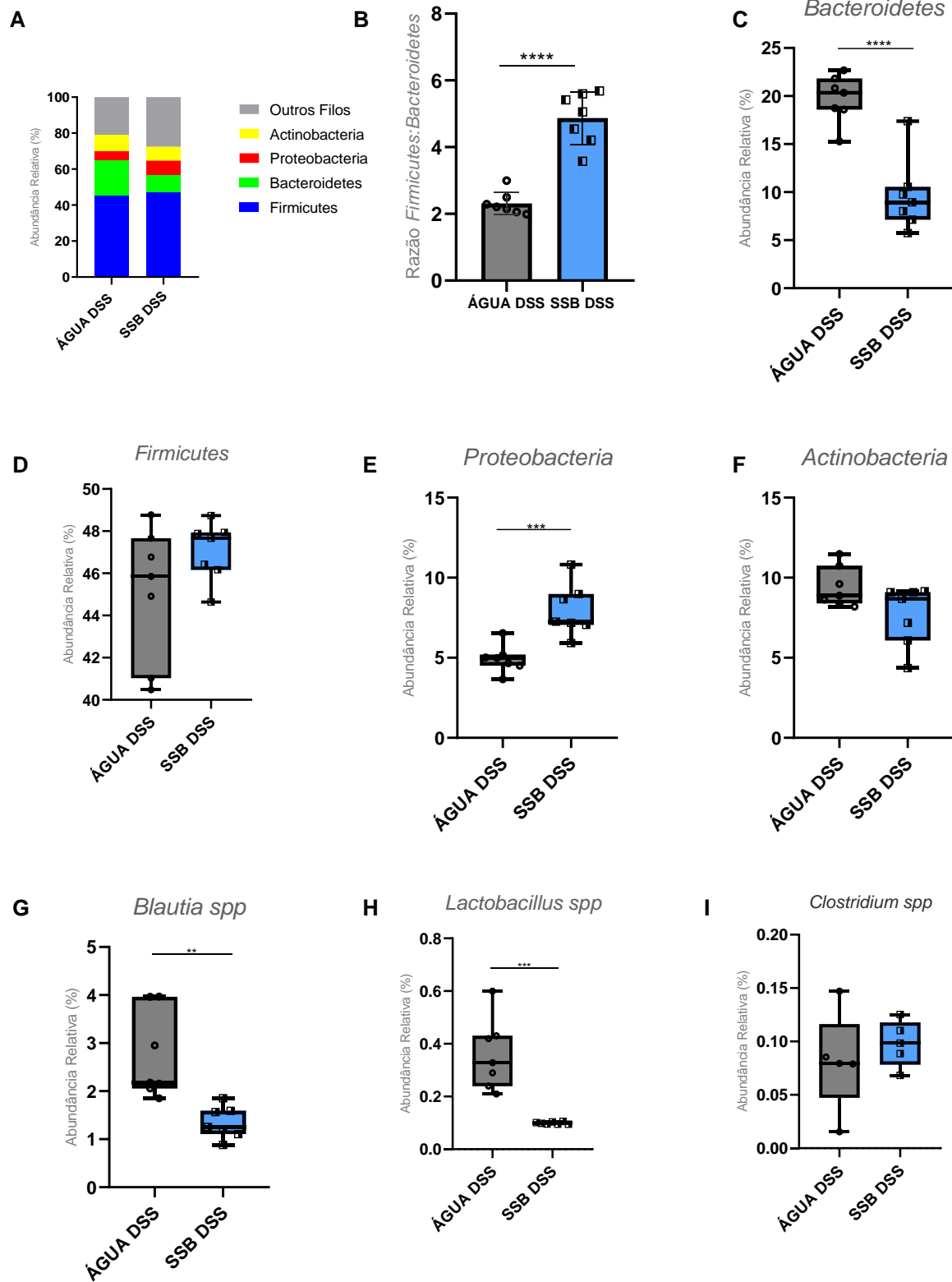


Figura 23. O consumo de bebida açucarada altera a microbiota intestinal na colite experimental. A visualização sumarizada da distribuição percentual dos filos por gráfico de barras (A); a razão *Firmicutes:Bacteroides* (B), a abundância relativa dos filos *Bacteroidetes* (C), *Firmicutes* (D), *Proteobacteria* (E) e *Actinobacteria*; e gêneros *Blautia spp* (G), *Lactobacillus spp* (H) e *Clostridium spp* (I) foram analisadas por RT-qPCR do DNA bacteriano extraído das fezes de cada animal no dia do sacrifício e representadas pela média de cada grupo. As caixas representam valores de média \pm desvio padrão de um grupo; ** $p=0,0027$; *** $p=0,0003$, *** $p=0,0009$; **** $p<0,0001$; teste t de Student.

5 DISCUSSÃO

As bebidas adoçadas representam a maior fonte de açúcares adicionados à dieta nos países ocidentais (BRAY, 2008). Em nosso estudo, camundongos C57BL/6 apresentaram redução na ingestão da dieta e aumento da ingestão de bebida adicionada de glicose e frutose, essa alteração no comportamento alimentar resultou em aumento da ingestão calórica total. Contudo, não observamos alterações no peso e a composição corporal dos animais. Outros autores também observaram que a oferta de bebida adoçada altera o comportamento alimentar de roedores, que passam a apresentar preferência pela bebida à dieta, sem alterar o peso corporal dos animais (PATKAR et al., 2021; VOLYNETS et al., 2017). Um estudo realizado com camundongos SPF (do inglês, *specific pathogen-free*) C57BL/6 ofertou 30% de HFCS por 16 semanas e observou, porém, ganho de peso excessivo e maiores índices de adiposidade nos animais (WANG et al., 2022). Com isso, os efeitos do consumo de bebidas adoçadas contendo frutose sobre o comportamento alimentar ainda não estão totalmente esclarecidos.

Embora nem sempre provoque ganho de peso corporal, o consumo excessivo de frutose está associado a alterações características da síndrome metabólica, como resistência à leptina, estresse oxidativo, hiperuricemia, inflamação do tecido adiposo e sistêmica, disfunção endotelial e alterações no lipidograma (LUBAWY; FORMANOWICZ, 2023). As funções desempenhadas pelo intestino são distintas ao longo de sua extensão. As vilosidades são estruturas que aumentam o contato do epitélio com o conteúdo presente no lúmen intestinal sendo mais intensamente observada nas regiões do intestino delgado especializadas na digestão e absorção de

nutrientes (CANESSO; MOREIRA; FARIA, 2022). Diferentemente da glicose, a absorção intestinal de frutose acontece, principalmente, nas porções distais do intestino delgado, o jejuno e íleo, e a expressão de seu transportador, o GLUT5, é regulada pelas concentrações luminiais de frutose (STALTNER et al., 2023; SUZUKI et al., 2011).

Um estudo observou que camundongos *Glut5*^{-/-} apresentaram 75% menos absorção jejunal de frutose e níveis plasmáticos do açúcar reduzidos em 90% comparados com camundongos *wide type*. A ausência do transportador específico de frutose e a conseqüente menor absorção e metabolização protegeu os camundongos *Glut5*^{-/-} da hipertensão (BARONE et al., 2009). Em nosso estudo, o consumo crônico de SSB provocou aumento da glicemia em jejum, mas não em colesterol total e triglicérides. Costa e colaboradores (2023) observaram que o consumo de carboidratos refinados por 8 semanas alterou as concentrações plasmáticas de glicose em jejum, contudo os pesquisadores encontraram concentrações de colesterol total e triglicérides aumentadas em camundongos C57BL/6. Essa discrepância pode ser explicada pelo alimento sólido sinalizar metabolicamente de maneira distinta às bebidas, mas principalmente ao fato de que Costa e colaboradores ofertaram dosagem de carboidratos superior ao que ofertado na bebida em nosso trabalho.

Por desempenhar diferentes papéis ao longo de toda a sua extensão, a permeabilidade intestinal varia de uma região para outra em resposta à função desenvolvida naquele local (TURNER, 2009). O tecido epitelial é o principal mediador entre o ambiente externo e os tecidos linfóides associado a mucosa (do inglês, *mucosa-associated lymphoid tissue* – MALT) e desempenha importante papel na conservação da função de barreira no intestino (COSTA et al., 2023; TURNER, 2009). A manutenção da integridade e, conseqüentemente, da permeabilidade intestinal é principalmente determinada pelas TJ, que controlam seletivamente o transporte transepitelial a partir do tamanho molecular (COSTA et al., 2023; TURNER, 2009).

Estudos apontam para a ZO-1 como importante TJ devido a sua capacidade de

interação com diversas proteínas de aderência, como claudinas, ocludinas e actina (FANNING et al., 1998; TURNER, 2009).

O consumo crônico de SSB não provocou modificações na estrutura dos vilos ou das criptas do intestino delgado ou grosso. E a expressão relativa de ZO-1 foi similar entre os grupos. De igual forma, Costa e colaboradores (2023) não observaram alterações no tamanho das vilosidades jejunais e ílicas nem alterações na expressão de ZO-1 em camundongos C57BL/6 tratados com dieta contendo 37,6% de sacarose.

As mucinas são glicoproteínas responsáveis por proteger as mucosas do contato direto entre epitélio e agentes microbianos produzidas e secretadas por células caliciformes, sendo MUC2 a principal mucina formadora de gel no cólon (HEAZLEWOOD et al., 2017). A secreção de mucinas acontece após estímulo, que pode ser a chegada de nutrientes no lúmen intestinal ou a ação de bactérias comensais mucolíticas, como a *Akkermansia muciniphila* (MACCHIONE et al., 2019). O consumo de SSB não alterou a expressão gênica de *Muc2* no intestino grosso dos camundongos, diferente do observado em um estudo conduzido em camundongos tratados com dieta controle ou rica em gordura associada com adição de frutose na bebida, nesse estudo a ingestão crônica de frutose por 12 semanas provocou redução na camada de muco e da expressão relativa de *Muc2* no cólon, além do aumento da permeabilidade intestinal e da expressão de ZO-1 (VOLYNETS et al., 2017). Tal discrepância entre os estudos que avaliaram o efeito da frutose na secreção de MUC2 pode ser explicada pelo tempo de exposição dos roedores a bebida adoçada ou à associação da bebida adoçada com intervenções nutricionais na dieta.

As respostas imunes orquestradas no microambiente intestinal e as suas repercussões sistêmicas são influenciadas pelos nutrientes vindos da dieta, pelo estado energético do indivíduo e pela microbiota intestinal (FARIA et al., 2013; LEE; DIXIT, 2020). A modulação da resposta imunológica e a composição das células imunes variam ao longo do intestino, sendo a região proximal do intestino marcada pela alta presença de IELs e células Th17, e caracterizada como uma região

extremamente estimulada pelos antígenos dietéticos; por outro lado, as regiões distais do órgão são predominantemente marcadas por um células de perfil regulatório e tolerogênico, com alta presença de Tregs, principalmente no cólon, a região distal é fortemente estimulada pela microbiota e seus metabólitos (CANESSO; MOREIRA; FARIA, 2022).

Macrófagos de camundongos C57BL/6 obesos tratados com dieta rica em gorduras e açúcares (do inglês, *high sugar butter* – HSB) apresentaram ineficiência no controle da infecção por *Leishmania major*, resultando em maiores cargas parasitárias e feridas cutâneas mais graves na orelha dos animais (MARTINS et al., 2020, 2024). Além dos macronutrientes, a resposta imune também sofre influência da concentração de micronutrientes. Por exemplo, o consumo excessivo de sódio por 3 semanas provocou inflamação intestinal, evidenciada pela depleção de células caliciformes, maior presença de infiltrado celular e danos teciduais, como erosão e ulcerações na camada muscular da mucosa em camundongos. A nível celular, a dieta rica em sódio levou ao aumento da produção de IL-23, da expressão de IL-23R⁺ nas células TCD4⁺ e de ILC3 no cólon (AGUIAR et al., 2018).

Embora sejam considerados tolerogênicos em resposta aos antígenos dietéticos, os linfonodos mesentéricos drenam diferentes regiões intestinais e apresentam respostas imunes distintas, por exemplo, linfonodos proximais têm características imunológicas mais tolerogênicas quando comparados com os linfonodos distais, que tendem a apresentar características mais pró-inflamatórias (BROWN; ESTERHÁZY, 2021). Avaliamos o perfil celular nos linfonodos mesentéricos que drenam a porção distais do intestino e observamos que o consumo de SSB não provocou alterações nas populações de células TCD4⁺ nos linfonodos mesentéricos distais após 8 semanas. De igual forma, o perfil celular no baço também não foi influenciado pelo consumo crônico de SSB.

Assim como a resposta imune, a microbiota intestinal é modulada pelos componentes da dieta (MAGNE et al., 2020), portanto, é possível afirmar que existe uma interação entre esses três componentes (KAWANO et al., 2022). Embora a

extensão de suas propriedades imunorreguladoras ainda não esteja totalmente compreendida (CANESSO; MOREIRA; FARIA, 2022), as alterações na composição da microbiota podem levar a quebra da homeostase intestinal (BEAM; CLINGER; HAO, 2021). A diferenciação de células T no intestino sofre influência da microbiota residente, Kawano e colaboradores (2022) mostraram que o consumo de dietas ricas em gorduras (do inglês, *high-fat diet* - HFD) prejudicou a funcionalidade de células Th17 comensais produzidas pela microbiota simbiótica. Por outro lado, dietas com restrição calórica parecem preservar a função das células T de memória (COLLINS et al., 2019).

Estudos em humanos e em modelo animal confirmam que dietas ricas em gorduras e pobres em fibras influenciam o aumento da abundância relativa de *Firmicutes* e redução de *Bacteroidetes* (BEAM; CLINGER; HAO, 2021; SHI et al., 2021). Embora por muitos anos alterações na razão *Firmicutes:Bacteroidetes* tenham sido utilizadas como marcadores para disbiose intestinal, recentes estudos vêm questionando a relevância dessa relação, considerando que em indivíduos obesos é comum que seja observada a redução na diversidade microbiana (MAGNE et al., 2020). Em nosso estudo, o consumo crônico de SSB provocou alterações na razão *Firmicutes:Bacteroidetes*. O consumo de bebida contendo 30% de glicose e frutose foi capaz de reduzir a abundância relativa de *Bacteroidetes*, sem perturbar a abundância de *Firmicutes*, além de provocar o aumento na abundância relativa de *Proteobacteria*. Em contrapartida, um estudo realizado com camundongos C57BL/6 a partir de 4 semanas de idade, observou que o consumo de 30% de HFCS resultou em redução na abundância relativa de *Firmicutes* e aumento em *Bacteroidetes* (HAN et al., 2022).

Alterações na microbiota intestinal podem perturbar a sinalização entre intestino e cérebro, modificando a produção de neurotransmissores e hormônios, por exemplo (SOCALA et al., 2021), a partir desse conhecimento novas hipóteses podem ser levantadas para compreender melhor a fisiopatologia de diversas doenças, entre elas as psiquiátricas e as DIIs (SOCALA et al., 2021). Burokas e colaboradores (2017) mostraram que a suplementação de uma combinação de frutoligosacarídeos (FOS) e

galactoligosacarídeos (GOS) resultou em efeitos antidepressivos e ansiolíticos em camundongos C57BL/6, evidenciado pela redução da liberação de corticosterona e citocinas pró-inflamatórias induzidos pelo estresse, aumento da produção de SCFA no ceco, manutenção do comportamento inato dos animais nos testes de comportamento e redução dos efeitos do estresse sobre a microbiota intestinal.

O consumo de dieta adicionada de sacarose por 12 semanas não provocou ganho de peso, mas resultou em neuroinflamação em ratos Wistar (PATKAR et al., 2021). Uma dieta contendo 74,2% de carboidratos totais, sendo 30% de carboidratos refinados induziu comportamento semelhante ao ansioso em camundongos BALB/c submetidos ao *Elevated Plus Maze test*, evidenciado por maiores concentrações de óxido nítrico (NO), IL-6, TNF e leptina, e maior ativação microglial no hipocampo e córtex pré-frontal após 12 semanas (GOMES et al., 2020). Em concordância com nosso trabalho, o consumo de dieta contendo, pelo menos, 30% de carboidratos refinados provocou aumento do comportamento semelhante ao compulsivo durante o *Marble test* após 12 semanas de tratamento (GOMES et al., 2018). Após indução de estresse, camundongos BALB/c tratados com dieta rica em carboidratos refinados por 12 semanas mostraram predisposição aumentada a comportamentos semelhantes à ansiedade e depressão no *Elevated Plus Maze test* e *Tail Suspension test* (SANTOS et al., 2018).

Em nosso trabalho, o consumo de SSB levou a alterações na microbiota intestinal e redução do comportamento semelhante ao ansioso nos camundongos nos testes de comportamento. Em contrapartida, um estudo avaliou o consumo de HFCS associado a dieta rica em gorduras por 16 semanas e encontrou aumento da abundância relativa de *Firmicutes*, do comportamento semelhante ao ansioso e depressivo e redução sérica de triptofano e metabólitos associados ao metabolismo de serotonina em camundongos C57BL/6 (CHAKRABORTI et al., 2021). As diferenças entre os resultados encontrados podem ser explicadas pela duração dos experimentos, forma em que o HFCS foi ofertado – na bebida ou na dieta, e pela adição de HFCS em dieta rica em gordura realizada por Chakraborti e colaboradores

(2021). Uma vez que roedores são animais naturalmente ansiosos, como forma de se manterem protegidos de potenciais perigos, o nosso resultado indica alteração no comportamento inato de camundongos e outros roedores.

Considerando a relevância dos nutrientes no eixo intestino-microbiota-cérebro e o aumento da incidência tanto de doenças inflamatórias intestinais quanto das psiquiátricas, principalmente em países onde o consumo de carboidratos refinados é alto (GOMES et al., 2020; NG et al., 2017), o modelo de colite ulcerativa foi escolhido como forma de avaliar os efeitos do consumo crônico de SSB no desenvolvimento de uma doença inflamatória.

O consumo crônico de SSB provocou exacerbação dos sinais clínicos e histológicos da UC. Em nosso trabalho, não houve diferença na quantidade de DSS consumida entre os grupos, por isso é possível inferir que o açúcar agravou o desenvolvimento da doença nos animais. Burr e colaboradores (2023) encontraram piora no desfecho da colite induzida por DSS em camundongos C57BL/6 tratadas com dieta rica em carboidratos ou SSB. A resposta foi dependente da dose de sacarose independentemente do consumo prévio de açúcares. Além disso, nesse estudo, os autores observaram que o agravamento da doença foi independente das alterações na microbiota intestinal observada nos animais, após realização de transferência fecal em animais *germ-free* também desafiados com DSS (BURR et al., 2023). Outro estudo induziu colite ulcerativa utilizando 2,5% de DSS na bebida e encontrou maior perda de peso, encurtamento intestinal, redução na expressão relativa de TJ, em especial ZO-1, e acometimento da mucosa intestinal mais severo, alterações na microbiota intestinal e no perfil de células intestinais de camundongos C57BL/6 tratados com bebida contendo 15% de HFCS por 4 semanas (ZHOU et al., 2023), embora a dosagem de DSS usada tenha sido maior e o tempo de exposição ao SSB menor, é possível associar a exacerbação da UC ao consumo de SSB em camundongos C57BL/6.

A destruição epitelial observada na UC é marcada por redução na contagem de células caliciformes e, conseqüentemente, da espessura da camada de muco

intestinal (HEAZLEWOOD et al., 2017). O consumo de SSB exacerbou a degradação do epitélio intestinal, evidenciada pela diminuição da expressão de *Zo-1* e *Muc2* no cólon. Em concordância com nosso trabalho, Heazlewood e colaboradores (2017) demonstraram que camundongos com mutações ou deficiências na expressão de *Muc2* são mais susceptíveis ao desenvolvimento de UC, além disso, estudos associam a produção ineficiente de muco intestinal a fisiopatologia de diversas doenças imunomediadas (SHAM et al., 2018), por exemplo, deficiências na produção de mucinas podem levar ao aumento das concentrações de TNF no intestino de camundongos resultando em aumento da permeabilidade intestinal e maior susceptibilidade à UC (TURNER, 2009).

Um estudo *in vivo* e *in vitro* observou que altas concentrações de glicose exacerbam a colite ulcerativa induzida por transferência de células T ativadas por espécies reativas de oxigênio e TGF β (ZHANG et al., 2019). Elegantemente, Zhou e colaboradores (2023) mostraram que a depleção da microbiota ou das células T no intestino foram capazes de atenuar a UC, confirmando que o desenvolvimento da UC induzida por DSS pode ser influenciada pelo perfil da microbiota e de células TCD4⁺ no intestino (AGUIAR et al., 2018; BARRETT; LI, 2011; ZHANG et al., 2019). Em nosso estudo, o consumo de SSB provocou redução na frequência de células TCD4⁺ Th1, Th17 e Treg nos linfonodos mesentéricos distais durante UC. Considerando a observação de maior infiltrado celular na histologia do intestino grosso, é possível que a redução dos perfis de células T funcionais nos linfonodos mesentéricos observada nos animais tratados com SSB e desafiados com 1%DSS esteja relacionada com migração celular para a região da inflamação, além da participação de células do sistema imune inato no desenvolvimento na colite ulcerativa, por exemplo, os neutrófilos e macrófagos (GUAN, 2019; LI et al., 2021).

Em nosso estudo, observamos que a colite ulcerativa exacerbou as alterações na microbiota intestinal provocadas pelo consumo crônico de glicose e frutose, podendo esta ser uma das razões envolvidas no agravamento da UC. Os mecanismos relacionados às alterações metabólicas e imunológicas associadas ao

consumo de carboidratos refinados ainda não estão totalmente compreendidos. Por isso, estudos que investigam os efeitos do consumo de SSB, que representam a maior fonte de açúcar adicionado na dieta ocidental, na saúde e na doença tornam-se relevantes.

6 CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que o consumo crônico de SSB contendo glicose e frutose altera o metabolismo de glicose, o comportamento inato e a microbiota intestinal de camundongos. Durante doença inflamatória intestinal, o consumo excessivo de açúcares simples parece agravar o desenvolvimento da colite ulcerativa.

Nossa pesquisa buscou contribuir para melhor compreensão dos efeitos do perfil nutricional da dieta no eixo intestino-microbiota-cérebro, sendo importante que outros estudos sejam realizados a fim de esclarecer os mecanismos relacionados às alterações observadas, além de trazer possíveis aplicações preventivas e terapêuticas para distúrbios psiquiátricos e para as doenças inflamatórias intestinais.

7 PERPECTIVAS

1. Avaliar o perfil de células TCD4+ na lâmina própria e intestino na saúde e na doença inflamatória intestinal.
2. Avaliar a presença de células do sistema imune inato no intestino grosso durante a doença inflamatória intestinal.
3. Avaliar se as alterações na microbiota provocadas pelo consumo excessivo de bebida açucarada influenciam o desenvolvimento da colite ulcerativa.
4. Avaliar os efeitos do consumo crônico de bebida açucarada no cérebro, a partir da dosagem e avaliação de neurotransmissores e seus respectivos metabólitos, no intestino grosso e no cérebro.

REFERÊNCIAS

- ABIEGA-FRANYUTTI, P.; FREYRE-FONSECA, V. **Chronic consumption of food-additives lead to changes via microbiota gut-brain axis.** *Toxicology* Elsevier Ireland Ltd, , 1 dez. 2021.
- AGUIAR, S. L. F. et al. High-salt diet induces IL-17-dependent gut inflammation and exacerbates colitis in mice. *Frontiers in Immunology*, v. 8, n. JAN, 15 jan. 2018.
- ANG, Q. Y. et al. Ketogenic Diets Alter the Gut Microbiome Resulting in Decreased Intestinal Th17 Cells. *Cell*, v. 181, n. 6, p. 1263- 1275.e16, 11 jun. 2020.
- ANGOÁ-PÉREZ, M. et al. Marble burying and nestlet shredding as tests of repetitive, compulsive-like behaviors in mice. *Journal of visualized experiments : JoVE*, n. 82, p. 50978, 2013.
- AUCOIN, M. et al. **Diet and anxiety: A scoping review.** *Nutrients* MDPI, , 1 dez. 2021.
- BARONE, S. et al. Slc2a5 (Glut5) is essential for the absorption of fructose in the intestine and generation of fructose-induced hypertension. *Journal of Biological Chemistry*, v. 284, n. 8, p. 5056–5066, 20 fev. 2009.
- BARRETT, T.; LI, L. **T-Helping Colitis.** *Gastroenterology* W.B. Saunders, , 2011.
- BEAM, A.; CLINGER, E.; HAO, L. **Effect of diet and dietary components on the composition of the gut microbiota.** *Nutrients* MDPI, , 1 ago. 2021.
- BOURIN, M.; HASCOËT, M. **The mouse light/dark box test.** *European Journal of Pharmacology* Elsevier, , 28 fev. 2003.
- BRAY, G. A. **Fructose: Should we worry?** *International Journal of Obesity*, 2008.
- BROWN, H.; ESTERHÁZY, D. Intestinal immune compartmentalization: implications of tissue specific determinantes in health and disease. *Mucosal Immunology*, v. 14, p. 1256–1270, 2021.
- BURR, A. H. P. et al. Excess Dietary Sugar Alters Colonocyte Metabolism and Impairs the Proliferative Response to Damage. *CMGH*, v. 16, n. 2, p. 287–316, 1 jan. 2023.
- CANESSO, M. C. C.; MOREIRA, T. G.; FARIA, A. M. C. Compartmentalization of gut immune responses Mucosal niches and lymph. *Immunology Letters*, p. 86–90, 2022.

CHAKRABORTI, A. et al. High Fructose Corn Syrup-Moderate Fat Diet Potentiates Anxio-Depressive Behavior and Alters Ventral Striatal Neuronal Signaling. **Frontiers in Neuroscience**, v. 15, 26 maio 2021.

CHASSAING, B. et al. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. **Current Protocols in Immunology**, n. SUPPL.104, 2014.

CHRIST, A.; LAUTERBACH, M.; LATZ, E. **Western Diet and the Immune System: An Inflammatory Connection**. ImmunityCell Press, , 19 nov. 2019.

COLLINS, N. et al. The Bone Marrow Protects and Optimizes Immunological Memory during Dietary Restriction. **Cell**, v. 178, n. 5, p. 1088- 1101.e15, 22 ago. 2019.

COSTA, K. A. et al. Effect of high-refined carbohydrate diet on intestinal integrity. **Nutrition**, v. 113, 1 set. 2023.

COSTALL, B. et al. **Exploration of Mice in a Black and White Test Box: Validation as a Model of Anxiety****Pharmacology Biochemistry & Behavior**. [s.l.] Pergamon Press plc, 1989.

CUI, W.; TAUB, D. D.; GARDNER, K. qPrimerDepot: A primer database for quantitative real time PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. SUPPL. 1, jan. 2007.

DA COSTA, C. O. et al. Prevalence of anxiety and associated factors in adults. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 68, n. 2, p. 92–100, 1 abr. 2019.

DE ALMEIDA MAGALHÃES, T. et al. Maternal separation affects expression of stress response genes and increases vulnerability to ethanol consumption. **Brain and Behavior**, v. 8, n. 1, 1 jan. 2018.

FANNING, A. S. et al. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 45, p. 29745–29753, 6 nov. 1998.

FARIA, A. M. C. et al. **Food components and the immune system: From tonic agents to allergens**. **Frontiers in Immunology**, 2013.

GOMES, J. A. S. et al. High-refined carbohydrate diet consumption induces neuroinflammation and anxiety-like behavior in mice. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 77, 2020.

HAN, X. et al. Effects of High-Fructose Corn Syrup on Bone Health and Gastrointestinal Microbiota in Growing Male Mice. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, 30 mar. 2022.

HEAZLEWOOD, C. K. et al. Aberrant mucin assembly in mice causes endoplasmic reticulum stress and spontaneous inflammation resembling ulcerative colitis. **PLoS ONE**, v. 12, n. 4, 1 mar. 2017.

HÉLÈNE SEROUSS. **A metabolic role for gut immune cells**. California: [s.n.].

JOEL, D. Current animal models of obsessive compulsive disorder: A critical review. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 30, n. 3, p. 374–388, maio 2006.

GOMES, J. A. S. et al. A high-refined carbohydrate diet facilitates compulsive-like behavior in BALBc. **Nitric Oxide**, v. 80, p. 61–69, 2018.

KAWANO, Y. et al. Microbiota imbalance induced by dietary sugar disrupts immune-mediated protection from metabolic syndrome. **Cell**, v. 185, n. 19, p. 3501- 3519.e20, 15 set. 2022a.

KAWANO, Y. et al. Microbiota imbalance induced by dietary sugar disrupts immune-mediated protection from metabolic syndrome. **Cell**, v. 185, n. 19, p. 3501- 3519.e20, 15 set. 2022b.

KIM, J.; LIM, J.; LEE, C. **Quantitative real-time PCR approaches for microbial community studies in wastewater treatment systems: Applications and considerations**. **Biotechnology Advances**, dez. 2013.

KINASHI, Y.; HASE, K. **Partners in Leaky Gut Syndrome: Intestinal Dysbiosis and Autoimmunity**. **Frontiers in Immunology**Frontiers Media S.A., , 22 abr. 2021.

LEE, A. H.; DIXIT, V. D. **Dietary Regulation of Immunity**. **Immunity**Cell Press, , 15 set. 2020.

LEE, Z. M. P.; BUSSEMA, C.; SCHMIDT, T. M. rrn DB: Documenting the number of rRNA and tRNA genes in bacteria and archaea. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. SUPPL. 1, 2009.

LI, G. et al. Microbiota metabolite butyrate constrains neutrophil functions and ameliorates mucosal inflammation in inflammatory bowel disease. **Gut Microbes**, v. 13, n. 1, 2021.

LIM, G. P. et al. **Ibuprofen effects on Alzheimer pathology and open field activity in APPsw transgenic mice**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/neuaging>.

LUBAWY, M.; FORMANOWICZ, D. **High-Fructose Diet–Induced Hyperuricemia Accompanying Metabolic Syndrome–Mechanisms and Dietary Therapy Proposals**. *International Journal of Environmental Research and Public Health* MDPI, , 1 fev. 2023.

MACCHIONE, I. G. et al. **Akkermansia muciniphila: key player in metabolic and gastrointestinal disorders**. [s.l.: s.n.].

MACKAY, I. M. **Real-time PCR in the microbiology laboratory**. *Clinical Microbiology and Infection* Blackwell Publishing Ltd, , 2004.

MAGNE, F. et al. **The firmicutes/bacteroidetes ratio: A relevant marker of gut dysbiosis in obese patients?** *Nutrients* MDPI AG, , 1 maio 2020.

MARTINS DE CARVALHO, L. et al. High-fat diet withdrawal modifies alcohol preference and transcription of dopaminergic and GABAergic receptors. *Journal of Neurogenetics*, v. 33, n. 1, p. 10–20, 2 jan. 2019.

MARTINS, V. D. et al. Obesity impairs resistance to leishmania major infection in c57bl/6 mice. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 1, p. 1–20, 2 jan. 2020.

MARTINS, V. D. et al. Obesity alters the macrophages' response to Leishmania major in C57BL/6 mice. *Journal of Leukocyte Biology*, 30 ago. 2024.

MORAN, G. W.; THAPALIYA, G. The gut–brain axis and its role in controlling eating behavior in intestinal inflammation. *Nutrients*, v. 13, n. 3, p. 1–17, 1 mar. 2021.

MOREIRA JÚNIOR, R. E. et al. Interaction between high-fat diet and ethanol intake leads to changes on the fecal microbiome. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 72, 1 out. 2019.

NOLDUS, L. P. J. J. , S. A. J. , T. R. A. J. EthoVision: A versatile video tracking system for automation of behavioral experiments. **Behavior Research Methods, Instruments, & Computers**, p. 398–414, 2001.

PATKAR, O. L. et al. A binge high sucrose diet provokes systemic and cerebral inflammation in rats without inducing obesity. *Scientific Reports*, v. 11, n. 1, 1 dez. 2021.

PHELPS, N. H. et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. **The Lancet**, v. 403, n. 10431, p. 1027–1050, 23 dez. 2022.

SANTOS, C. J. et al. Carbohydrate-enriched diet predispose to anxiety and depression-like behavior after stress in mice. **Nutritional Neuroscience**, v. 21, n. 1, p. 33–39, 2 jan. 2018.

SARAH LEÃO FIORINI DE AGUIAR, C. A. M. F.; TATIANI MAIOLI UCELI. **EFEITOS INFLAMATÓRIOS DE DIETA RICA EM SAL NA MUCOSA INTESTINAL**. Belo Horizonte: [s.n.].

SERRA, D.; ALMEIDA, L. M.; DINIS, T. C. P. **The Impact of Chronic Intestinal Inflammation on Brain Disorders: the Microbiota-Gut-Brain Axis**. **Molecular Neurobiology** Humana Press Inc., , 1 out. 2019.

SHAM, H. P. et al. Immune Stimulation Using a Gut Microbe-Based Immunotherapy Reduces Disease Pathology and Improves Barrier Function in Ulcerative Colitis. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 27 set. 2018a.

SHAM, H. P. et al. Immune Stimulation Using a Gut Microbe-Based Immunotherapy Reduces Disease Pathology and Improves Barrier Function in Ulcerative Colitis. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 27 set. 2018b.

SHANDILYA, S. et al. **Interplay of gut microbiota and oxidative stress: Perspective on neurodegeneration and neuroprotection**. **Journal of Advanced Research** Elsevier B.V., , 1 maio 2022.

SHI, H. et al. A fiber-deprived diet causes cognitive impairment and hippocampal microglia-mediated synaptic loss through the gut microbiota and metabolites. **Microbiome**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2021.

SIKAND, K. et al. Housekeeping Gene Selection Advisory: Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) and β -Actin Are Targets of miR-644a. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, 16 out. 2012.

SOCALA, K. et al. The role of microbiota-gut-brain axis in neuropsychiatric and. **Pharmacological Research**, v. 172, 2021.

STALTNER, R. et al. **Fructose: a modulator of intestinal barrier function and hepatic health?** **European Journal of Nutrition** Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, , 1 dez. 2023.

STODDARD, S. F. et al. rrnDB: Improved tools for interpreting rRNA gene abundance in bacteria and archaea and a new foundation for future development. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D593–D598, 28 jan. 2015.

SUZUKI, T. et al. Diet-induced epigenetic regulation in vivo of the intestinal fructose transporter Glut5 during development of rat small intestine. **Biochemical Journal**, v. 435, n. 1, p. 43–53, 1 abr. 2011.

TURNER, J. R. **Intestinal mucosal barrier function in health and disease. Nature Reviews Immunology**, nov. 2009.

VOLYNETS, V. et al. Intestinal barrier function and the gut microbiome are differentially affected in mice fed a western-style diet or drinking water supplemented with fructose. **Journal of Nutrition**, v. 147, n. 5, p. 770–780, 2017.

WANG, X. et al. Effects of high fructose corn syrup on intestinal microbiota structure and obesity in mice. **npj Science of Food**, v. 6, n. 1, 1 dez. 2022.

WANG, X. et al. **The relationship between dietary sugar consumption and anxiety disorders: A systematic review. Nutrition Bulletin** John Wiley and Sons Inc, , 2024.

WHO. **World mental health report - Transforming mental health for all.** [s.l.: s.n.].

WICKE, K.; GROSS, G. Marble burying behavior is prevented by anxiolytics as well as by motorstimulants. **Pharmacopsychiatry**, v. 38, n. 05, set. 2005.

YU, X. D. et al. Distinct serotonergic pathways to the amygdala underlie separate behavioral features of anxiety. **Nature Neuroscience**, v. 25, n. 12, p. 1651–1663, 1 dez. 2022.

ZHANG, D. et al. High Glucose Intake Exacerbates Autoimmunity through Reactive-Oxygen-Species-Mediated TGF- β Cytokine Activation. **Immunity**, v. 51, n. 4, p. 671- 681.e5, 15 out. 2019.

ZHOU, M. et al. High-fructose corn syrup aggravates colitis via microbiota dysbiosis-mediated Th17/Treg imbalance. **Clinical Science**, v. 137, n. 20, p. 1619–1635, 2023.