

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia

Sara Cândida Barbosa

**A ingestão de bebida açucarada altera o metabolismo e a resposta
imune em camundongos C57BL/6**

Belo Horizonte

Abril – 2021

Sara Cândida Barbosa

A ingestão de bebida açucarada altera o metabolismo e a resposta imune em camundongos C57BL/6

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

Belo Horizonte

Abril – 2021

043 Barbosa, Sara Cândida.
 A ingestão de bebida açucarada altera o metabolismo e a resposta imune em camundongos C57BL/6 [manuscrito] / Sara Cândida Barbosa. – 2021.
 78 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Dra. Tatiani Uceli Maioli.

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. Mucosite. 4. Síndrome X Metabólica. 5. Sacarose na Dieta. I. Maioli, Tatiani Uceli. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. 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 SARA CÂNDIDA BARBOSA.
 Aos vinte dias do mês de abril de 2021 às 14:00 horas, reuniu-se de forma “on line” pela plataforma “meet.google.com”, 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 "A ingestão de bebida açucarada altera o metabolismo e a resposta imune em camundongos C57BL/6", 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. 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. Daniela Carlos Sartori (Universidade de São Paulo), aprovada; Dr. Edenil Costa Aguilar (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, 20 de abril de 2021.

Dra. Daniela Carlos Sartori (Universidade de São Paulo)

Dr. Edenil Costa Aguilar (UFMG)

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

À Deus e à Nossa Senhora, pela fé, força e amparo.

Aos meus pais, Marília e Adalberto, pela educação que me dedicaram, pelo apoio, por me incentivarem e acreditarem no meu potencial. Vocês são sensacionais, eu consegui chegar até aqui porque vocês sempre estiveram ao meu lado. Amo muito vocês!

Ao meu irmão Lucas, pelo carinho e amizade, por me incentivar e caminhar comigo nesta jornada. Amo você!

À minha orientadora Tatiani Maioli, pelos ensinamentos científicos e de vida, e por ser meu exemplo de mulher cientista e determinada. Obrigada por me acolher no LIB e abrir as portas do universo científico, por estimular meu amadurecimento e me instruir sempre com conselhos certos.

À minha psicóloga Ione, por infinitos ensinamentos, por me ajudar a acreditar em mim e a entender melhor a vida, por me fortalecer nos momentos mais difíceis e me fazer acreditar que eles passam! Nossos encontros tornaram esta trajetória mais leve.

Aos meus amigos/as de todas as horas, Jean, Lara, Jaque, Gustavo, Laysla, Victor, Mariana Ribeiro, Lorena, Miguel, Gabriela... obrigada por me acolherem com tanta paciência e compreensão. Vocês abrilhantaram meus dias, me tiraram boas risadas e com certeza tornaram tudo mais leve. Amo vocês!

À professora Ana Caetano, por excelentes ideias e discussões enriquecedoras.

À toda equipe do LIB, em especial àqueles que contribuíram diretamente para o desenvolvimento deste projeto: Marcos, Vinícius, Luísa, Thais, Mariana e Helder. Sou grata pela parceria no laboratório, por tantas ideias, discussões e pela amizade.

Aos parceiros do laboratório LAGI da professora Leda, pelo suporte.

À Ildinha e ao Hermes por cuidarem com excelência do nosso biotério, sempre com carinho e respeito aos animais.

Ao Zé, por disponibilizar as cervejas mais geladas deste período.

Gratidão universo!

Resumo

O intestino é a principal superfície de absorção dietética, e os compartimentos imunológicos associados à mucosa intestinal possuem uma complexa rede de mecanismos tolerogênicos capazes de interagir constante e simultaneamente com nutrientes e com a microbiota sem desencadear processos patológicos. Os nutrientes da dieta são peças-chave para a diferenciação de células na mucosa e para integridade da barreira intestinal. Adotar hábitos alimentares ricos em gorduras e alimentos refinados, escassos em carboidratos complexos e fibras, favorecem o desenvolvimento de doenças crônicas não-transmissíveis e o agravamento de doenças inflamatórias intestinais. Baseados nestas evidências, procuramos esclarecer como as alterações metabólicas induzidas por bebida açucarada interferem no sistema imune de mucosa intestinal e na susceptibilidade à mucosite. Camundongos C57BL/6 ou C57BL/6-GFP-*knock-in* FoxP3 foram alimentados com dieta AIN93G e receberam água ou bebida açucarada contendo 25% de uma mistura de glicose e frutose na proporção 45:55, respectivamente. Após 8 semanas de consumo contínuo de bebida açucarada houve aumento do consumo calórico total, o que foi capaz de desencadear alterações corporais e metabólicas relacionadas à síndrome metabólica. Tais alterações incluem o aumento de glicemia, glicosúria e hemoglobina glicada, modificações no perfil lipídico sanguíneo, bem como o acúmulo de tecido adiposo e a degeneração hepática. Foi identificado na análise histológica e por citometria de fluxo a inflamação do tecido adiposo do grupo bebida açucarada, caracterizada por leucócitos ao redor dos adipócitos hipertrofiados e aumento na frequência de células TCD4⁺ROR γ T⁺, relacionadas ao perfil T_H17, e frequência reduzida de células T reguladoras FoxP3⁺. Além disso, a análise histológica do íleo de camundongos que consumiram carboidratos simples em excesso, mostrou achatamento dos vilos e redução do número de células caliciformes. Ao analisar a frequência celular no linfonodo responsável por drenar a porção distal do intestino delgado, houve maior frequência de células T_H17 e menor frequência de células T reguladoras FoxP3⁺. Porém, essa inflamação não foi suficiente para piorar a mucosite causada pelo 5-FU. Sendo assim, foi identificada síndrome metabólica associada à inflamação subclínica na porção mais distal do intestino delgado de camundongos que consumiram a bebida açucarada cronicamente.

Palavras-chave: Bebida Açucarada, Síndrome Metabólica, Imunologia de Mucosa, Inflamação.

Abstract

The intestine is the main surface for dietary absorption, and the immune compartments associated with it have a complex network of tolerogenic mechanisms capable of interacting constantly and simultaneously with nutrients and the microbiota without triggering pathological processes. Dietary nutrients are key to the differentiation of cells in the intestinal mucosa and to the integrity of the intestinal barrier. Eating habits related to high fat and refined food intake, as well as to low complex carbohydrates and fiber intake, favor the development of chronic non-communicable diseases and the worsening of inflammatory bowel diseases. Based on this evidence, we sought to clarify how the metabolic changes induced by sugary drinks interfere with the gut immune system and with the susceptibility to mucositis. C57BL/6 or C57BL/6-GFP-knock-in FoxP3 mice were fed with AIN93G diet and given water or a sugar-sweetened beverage containing 25% of a glucose and fructose mixture in a 45:55 ratio, respectively. After 8 weeks of continuous ingestion of the sugar-sweetened beverage, there was an increase in total calorie intake, which was able to cause body composition and metabolic changes related to metabolic syndrome. Such changes included elevated blood glucose, glycosuria and glycated hemoglobin, alteration in blood lipid profile, as well as adipose tissue accumulation and liver degeneration. Adipose tissue inflammation in the sugar-sweetened beverage group was identified by histological and flow cytometry analysis, which showed the presence of leukocytes around hypertrophied adipocytes and increased frequency of TCD4⁺ROR γ T⁺ cells, related to the T_H17 profile, as well as reduced frequency of FoxP3⁺ regulatory T cells. Moreover, histological analysis of the ileum of mice that consumed excessive simple carbohydrates showed flattening of the villi and reduced numbers of goblet cells. When the cell frequency of the lymph node responsible for draining the distal portion of the small intestine was analyzed, a higher frequency of T_H17 cells and a lower frequency of FoxP3⁺ regulatory T cells was observed. However, this inflammation was not enough to worsen mucositis caused by 5-FU. Therefore, metabolic syndrome associated with subclinical inflammation was identified in the distal portion of the small intestine of mice that chronically ingested the sugar-sweetened beverage.

Keywords: Sugar-sweetened beverage, Metabolic syndrome, mucosal immunology, Inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Principais alterações do consumo excessivo de açúcares no organismo. .	19
Figura 2: Delineamento experimental.....	31
Figura 3: Exemplo do campo utilizado para análise morfométrica dos vilos intestinais.	37
Figura 4: Imunofenotipagem de linfócitos TCD4 ⁺ no baço.	41
Figura 5: Imunofenotipagem de linfócitos TCD4 ⁺ nos linfonodos mesentéricos.....	42
Figura 6: Imunofenotipagem de linfócitos TCD4 ⁺ no tecido adiposo.	43
Figura 7: Delineamento experimental e indução de mucosite com 5-FU.	44
Figura 8: Camundongos C57BL/6 alimentados com dieta AIN93G e que ingeriram bebida açucarada consomem mais carboidratos simples e têm maior ingestão calórica.....	46
Figura 9: O consumo de bebida açucarada não interfere no ganho de peso corporal e no tecido muscular de camundongos.....	47
Figura 10: A alteração no perfil celular no tecido adiposo epididimal indica a presença de inflamação tecidual provocada pelo consumo excessivo de glicose e frutose.	48
Figura 11: O consumo excessivo de glicose e frutose interfere no perfil glicêmico de camundongos C57BL/6.....	49
Figura 12: Camundongos C57BL/6 tratados com bebida açucarada apresentam alterações no perfil de lipídeos séricos.	50
Figura 13: Avaliação da permeabilidade intestinal.	51
Figura 14: O excesso de consumo de glicose e frutose provoca achatamento de vilos e redução do número de células caliciforme na porção mais distal do intestino delgado.	52
Figura 15: Aumento de vacúolos citoplasmáticos indica degeneração hepática em camundongos que consomem bebida açucarada.	53
Figura 16: Quantidades elevadas de carboidratos simples provocam hipertrofia de adipócitos e aumentam o infiltrado celular no tecido adiposo.	54
Figura 17: Frequência de células TCD4 ⁺ no baço de camundongos C57BL/6 tratados com água ou bebida açucarada.	55
Figura 18: Frequência de células TCD4 ⁺ nos linfonodos drenantes do intestino delgado de camundongos C57BL/6 que consumiram água ou bebida açucarada.	56

Figura 19: O consumo de bebida açucarada não interfere na resposta de camundongos C57BL/6 à mucosite induzida por 5-FU.	57
Figura 20: Via poliol.....	66
Figura 21: Resumo dos resultados.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição da dieta experimental AIN93G.....	30
Tabela 2 – Informações moleculares da glicose e frutose	30
Tabela 3 – Anticorpos utilizados para marcação de citometria de fluxo	40

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5-FU: 5-fluorouracil;

^{99m}Tc : 99 m-tecnécio;

$^{\circ}\text{C}$: grau Celsius;

μg : microgramas;

$\mu\text{g/mL}$: microgramas por mililitros;

μL : microlitros;

μm : micrômetros;

AIN-93G: *American Institute of Nutrition – growth diet*;

BSA: *bovine serum albumin*;

BHT: tert-butylhydroquinone;

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais;

cpm: contagem por minuto;

CTL: controle;

DCNTs: doenças crônicas não-transmissíveis;

DNase I: desoxirribonuclease I;

DTPA: dietilenotriaminopentacético;

ELISA: *enzyme-linked immunosorbent assay*;

ETC: estruturas tipo coroa;

FSC: *forward scatter*;

FoxP3: fator de transcrição *forkhead box P3*;

g: gramas;

GALT: *gut associated lymphoid tissue*;

GATA-3: *GATA-binding protein 3*;

GFP: *green fluorescent protein*;

GLUT2: *glucose transporter 2*

GLUT5: *glucose transporter 5*

H_2O_2 : peróxido de hidrogênio;

H_2SO_4 : ácido sulfúrico;

HDL: *high density lipoprotein cholesterol*;

HE: hematoxilina-eosina;

HFCS: *high-fructose corn syrup*;

HTAB: brometo de hexadeciltrimetilamônio;

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia Estatística;
ICB: Instituto de Ciências Biológicas;
IFN- γ : interferon-gama;
IL-1 β : interleucina 1 beta;
IL-4: interleucina 4;
IL-5: interleucina 5;
IL-6: interleucina 6;
IL-8: interleucina 8;
IL-12: interleucina 12;
IL-13: interleucina 13;
IL-17: interleucina 17;
IL-23: interleucina 23;
Kcal: quilocalorias;
kg: quilos;
KHK: *ketohexokinase*
KO: *knockout*;
LD: *live/dead*;
LDL: *low density lipoproteins*;
LPS: lipopolissacarídeos;
M: molar;
MBq: megabecquerel;
mg: miligramas;
mg/dL: miligramas por decilitro;
mL: mililitros;
MLNs: *mesenteric lymph nodes*;
mM: milimolar;
MPO: mieloperoxidase;
MUC: mucosite;
nm: nanômetros;
PBS: tampão fosfato-salino;
PBS-HTAB: tampão fosfato-salino com 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio;
PBS-wash: tampão fosfato-salino com 0,5% de albumina bovina;
pH: potencial hidrogeniônico;
ROR γ t: *factor retinoic acid-related orphan receptor gamma t*);

rpm: rotações por minuto;

SSC: *side scatter*;

SFB: soro fetal bovino;

SGLT1: *sodium-glucose linked transporter 1*;

slgA: imunoglobulina A secretada;

TA: tecido adiposo;

T-bet: membro da família de fatores de transcrição T-box que regula a diferenciação da linhagem T_{H1};

TGF- β : *transforming growth factor beta*;

T_{H1}: célula T *helper* tipo 1;

T_{H17}: célula T *helper* tipo 17;

T_{H2}: célula T *helper* tipo 2;

T_{reg}: célula T reguladora;

TLR-4: *toll-like receptor 4*;

TMB: 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina;

TNF- α : *tumor necrosis factor alpha*;

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais;

Vigitel: Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico;

VLDL: *very low-density lipoproteins*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Fatores associados ao consumo de bebidas açucaradas.....	15
1.2. Absorção e metabolismo de glicose e frutose.....	18
1.3. A mucosa intestinal e o papel de nutrientes na manutenção da homeostase.	21
1.4. As consequências do consumo excessivo de carboidratos na mucosa intestinal	25
2. JUSTIFICATIVA	27
3. OBJETIVOS	28
3.1. Objetivo geral.....	28
3.2. Objetivos específicos	28
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1. Animais	29
4.2. Dieta experimental, bebida açucarada e ingestão alimentar.....	29
4.3. Delineamento experimental	31
4.4. Medida de peso corporal.....	31
4.5. Eutanásia e coleta de amostras.....	32
4.6. Cálculo do índice de adiposidade	32
4.7. Análise de perfil glicêmico e lipídico.....	33
a. Glicemia e glicosúria pós-prandial e de jejum.....	33
b. Hemoglobina glicada	33
c. Insulina endógena.....	34
d. Colesterol e triglicérides pós-prandial e de jejum	34
4.8. Avaliação da Permeabilidade Intestinal	35
4.9. Análises histológicas.....	36
a. Coleta e fixação dos tecidos	36
b. Análises morfológicas do intestino delgado	36
c. Quantificação de degeneração hepática.....	37
d. Análises morfológicas do tecido adiposo	37
4.10. Obtenção de células de órgãos linfoides e do tecido adiposo	38
a. Baço e linfonodos mesentéricos	38
b. Tecido adiposo	38
4.11. Análises por Citometria de Fluxo	39

a. Imunofenotipagem	39
b. Estratégia de análise das populações de interesse	40
4.12. Indução de Mucosite	43
a. Peso corporal.....	44
b. Atividade de mieloperoxidase	44
4.13. Análise estatística	45
5. RESULTADOS	46
5.1. A ingestão de bebida açucarada altera o padrão alimentar de camundongos C57BL/6	46
5.2. O consumo excessivo de carboidratos simples interfere na composição corporal e no metabolismo de camundongos C57BL/6	47
5.3. A ingestão de bebida açucarada interfere na mucosa do intestino delgado, provoca degeneração hepática e a inflamação do tecido adiposo epididimal.....	51
5.4. O consumo de glicose e frutose em doses excessivas modificam o perfil celular do baço	55
5.5. As populações de células TCD4 ⁺ nos linfonodos mesentéricos estão alteradas após o consumo de bebida açucarada	55
5.6. O consumo de bebida açucarada não interferiu na dinâmica da mucosite desencadeada por 5-FU	57
6. DISCUSSÃO	59
7. CONCLUSÃO.....	68
8. PERSPECTIVAS.....	69
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
ANEXO.....	78

1. INTRODUÇÃO

1.1. Fatores associados ao consumo de bebidas açucaradas

A urbanização e o capitalismo trouxeram uma série de transformações que afetam a qualidade dos alimentos produzidos e a quantidade consumida, salientando alimentos industrializados. Com o processo acelerado da industrialização, as mudanças nos padrões alimentares influenciaram a população a ingerir excessivamente alimentos com açúcar, sal e gordura e, conseqüentemente, a dieta desequilibrada se tornou um potencial fator de risco para o aumento de problemas de saúde pública.

Hábitos alimentares ricos em gorduras e alimentos refinados, e escassos em carboidratos complexos e fibras são característicos da dieta ocidental que favorecem o desenvolvimento de doenças crônicas não-transmissíveis (DCNTs), como a obesidade, diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares (BLEIL, 1998; CHRIST et al., 2018). A longo prazo, o excesso desses nutrientes pode perturbar a interface imune-metabólica e prejudicar a homeostase desse mecanismo, promovendo alterações patológicas no metabolismo energético, bem como a ativação do sistema imunológico (CHRIST; LAUTERBACH; LATZ, 2019). Christ e colaboradores (2018) descreveram que o consumo por 4 semanas de dieta ocidental em modelo de camundongos para aterosclerose, resultou na persistência de um estado inflamatório onde o sistema imune continuou gerando células mieloides programadas para responder de forma ainda mais inflamada, o que prejudica ao organismo mesmo após a retomada da dieta controle.

O *fast-food* exemplifica os padrões nutricionais dos alimentos consumidos na dieta ocidental e se destaca na população dos grandes centros devido a praticidade e a rapidez, aliadas à publicidade. Nesse contexto, bebidas açucaradas, como refrigerantes e sucos artificiais, ganham preferência e são frequentemente consumidas em quantidades elevadas, apesar de fornecerem basicamente calorias adicionais, pouco valor nutricional e não proporcionarem a mesma saciedade que os alimentos sólidos (RITZE et al., 2014; WHO, 2014). O principal componente de bebidas açucaradas é o carboidrato que, além de estar envolvido em funções estruturais e energéticas, também participa da sinalização celular e da interação entre moléculas (MUSA; MARANGON, 2012; POMIN; MOURÃO, 2006).

Carboidratos são encontrados naturalmente nos alimentos, e são amplamente utilizados como aditivo durante a fabricação de muitos alimentos e bebidas, seja na sua forma simples, como glicose e frutose, ou complexa, como amido (MUSA; MARANGON, 2012; TAPPY; LE, 2010). O aprimoramento tecnológico para extrair e refinar o açúcar trouxe destaque a este componente no processamento e preparação de alimentos, principalmente na produção de adoçantes. Com isso, foi possível desenvolver adoçantes derivados do milho a partir de técnicas que permitem hidrolisar o amido em glicose e, por isomerização enzimática, converter parte da glicose em frutose (HANOVER; WHITE, 1993). Entre os resultados deste processo, o xarope de milho rico em frutose (do inglês *high-fructose corn syrup*, HFCS) evidencia o interesse da indústria alimentícia por esses produtos devido a suas propriedades organolépticas, ao fácil manuseio e ao baixo custo, tornando-se mais lucrativo substituir a sacarose por HFCS (BRAY; NIELSEN; POPKIN, 2004; FERREIRA, 2010; TAPPY; LE, 2010).

Algumas proporções de glicose e frutose podem basear a composição deste adoçante, sendo o HFCS-55 utilizado com maior frequência na indústria de bebidas açucaradas, predominantemente em refrigerantes, contendo 45% de glicose e 55% de frutose (HANOVER; WHITE, 1993; TAPPY; LE, 2010). As características e o destaque comercial consolidaram a utilização de HFCS-55 nos meios de produção e, simultaneamente, aumentaram seu consumo, ampliando a preocupação relacionada à ingestão excessiva de alimentos constituídos basicamente por açúcar simples. Um estudo com adolescentes descreveu que quase metade (45,2%) da frutose consumida provém de bebidas açucaradas, representando uma fonte significativa de calorias (VOS et al., 2008). Além de diminuir a ingestão de leite e sucos naturais (GAINO; SILVA, 2015), o consumo excessivo de bebidas açucaradas aumenta os níveis de açúcares ingeridos e eleva a densidade energética total das dietas, levando ao quadro de obesidade e síndrome metabólica (CDC, 2019; SILVA et al., 2019).

A obesidade é caracterizada pelo excesso de gordura corporal acumulada no tecido adiposo de maneira prejudicial à saúde dos indivíduos, além de ser uma doença crônica, de etiologia multifatorial e que predispõe outras comorbidades, como diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares (WANDERLEY; FERREIRA, 2010). Alterações no ambiente e no perfil celular, bem como a produção de algumas citocinas pelos adipócitos hipertrofiados favorecem o estabelecimento de um estado inflamatório

sistêmico de baixa intensidade que acompanha a síndrome metabólica (MONTEIRO; AZEVEDO, 2010).

Associada a este cenário, a síndrome metabólica pode prever alguns distúrbios imunometabólicos como o acúmulo de gordura abdominal, resistência à insulina, hiperglicemia, hipertrigliceridemia, redução do colesterol em lipoproteína de alta densidade (do inglês *high density lipoprotein cholesterol*, HDL), hipertensão e envelhecimento (CHRIST; LAUTERBACH; LATZ, 2019). A literatura dispõe de dados que descrevem maior prevalência de síndrome metabólica entre adultos que consomem 1 refrigerante por dia, independentemente de ser *diet* (DHINGRA et al., 2007), que o consumo de bebidas açucaradas aumenta a incidência de doenças cardíacas (TAPPY; LE, 2010) e prejudica a sensibilidade à insulina (LÊ; TAPPY, 2006).

Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) mostram que as bebidas açucaradas integram o grupo de alimentos que apresentaram maior média de aquisição alimentar, ou seja, disponibilidade para consumo domiciliar no período de 2017 a 2018 (IBGE, 2020). No sistema de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel), refrigerantes e alimentos ultraprocessados são considerados marcadores de padrões não saudáveis de alimentação. Em 2019, o relatório do Vigitel mostrou que 15% da população brasileira adulta das capitais e do Distrito Federal consome refrigerantes regularmente, ou seja, em 5 ou mais dias da semana, e que a frequência é maior entre homens (18,3%) do que entre mulheres (12,3%) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

Considerando a importância clínica e epidemiológica do consumo excessivo de bebidas açucaradas, é necessário desenvolver pesquisas que elucidem as consequências desse comportamento. Para isso, a literatura dispõe de protocolos experimentais executados em animais de laboratório que se assemelham à ingestão de bebida açucarada como, por exemplo, o trabalho de Gonçalves e colaboradores (2019) que disponibilizou glicose e frutose na razão 45:55 em 25% da água filtrada para camundongos, que é similar a razão do HFCS-55.

O desenvolvimento experimental com sistemas *in vivo* envolvendo camundongos são empregados na maioria das pesquisas em imunologia, pois esses animais possuem o sistema imune bem caracterizado e com similaridade genética a humanos, facilitando investigações de alterações específicas (CHORILLI; MICHELIN; SALGADO, 2007). De modo auxiliar, Reeves, Nielsen e Fahey (1993) descreveram a

dieta *growth* do *American Institute of Nutrition* (AIN-93G), recomendada entre as dietas experimentais por apresentar a fórmula indicada para as fases de crescimento de camundongos, podendo ser amplamente utilizada em diferentes aplicações devido à facilidade de adaptação ao protocolo específico. Sendo assim, protocolos bem estabelecidos envolvendo aspectos nutricionais facilitam a interpretação dos resultados.

1.2. Absorção e metabolismo de glicose e frutose

Os carboidratos ou hidratos de carbono são moléculas que apresentam um átomo de carbono e uma molécula de água em sua fórmula empírica $(CH_2O)_n$ e são classificados em monossacarídeo, dissacarídeo e polissacarídeo (POMIN; MOURÃO, 2006), de acordo com a complexidade da sua estrutura. Um exemplo clássico de dissacarídeo é a sacarose que une moléculas de glicose e frutose, conhecida popularmente como açúcar de mesa, já os monossacarídeos livres incluem adoçantes como HFSC-55.

O intestino delgado é o local mais importante da absorção, responsabilizado pelo transporte de moléculas do lúmen através de células epiteliais da mucosa para o sangue ou sistema linfático. A absorção intestinal de carboidratos difere de acordo com a complexidade molecular, pois o carboidrato complexo (polissacarídeos) requer a hidrólise enzimática para gerar monossacarídeos que serão posteriormente absorvidos por diferentes vias de transporte (BRAY; NIELSEN; POPKIN, 2004; CASPARY, 1992). Os enterócitos transportam a glicose do lúmen para o citosol através do cotransportador de glicose dependente de sódio 1 (do inglês *sodium-glucose linked transporter*, SGLT1), enquanto a frutose é transportada por difusão facilitada mediada por GLUT5 (do inglês *glucose transporter 5*). Com relação a distribuição para os vasos sanguíneos, o GLUT2 é capaz de transportar tanto moléculas de glicose quanto de frutose (MERINO et al., 2020).

Uma questão interessante envolvendo o metabolismo intestinal de açúcares está associada à regulação de transportadores. A expressão de SGLT1 no intestino é regulada pelo conteúdo de carboidratos da dieta, sendo assim, o excesso de glicose aumenta a expressão desse transportador em camundongos obesos. Com relação ao GLUT5, sua expressão diminui ao longo do intestino delgado (RAND et al., 1993) e é regulada por metabólitos gerados após a fosforilação da frutose por frutoquinase (do

inglês *ketohexokinase*, KHK), representando um importante mecanismo exercido pelos enterócitos (MERINO et al., 2020).

Uma pesquisa revelou que a resistência a insulina induzida por dieta rica em açúcar aumentou a expressão de GLUT2 no ápice dos enterócitos de camundongos, descontrolando o tráfego de glicose, uma vez que houve aumento na captação no lúmen intestinal e, conseqüentemente, aumentou a quantidade liberada para a circulação portal (TOBIN et al., 2008). Por outro lado, após o transporte de frutose via GLUT5, a metabolização no intestino envolve a fosforilação utilizando ATP como doador (Figura 1). O excesso de frutose consome rapidamente ATP e provoca a depleção transitória de fosfato intracelular, induzindo estresse oxidativo mitocondrial que pode estar relacionado com características da síndrome metabólica (ANDRES-HERNANDO et al., 2020; MERINO et al., 2020).

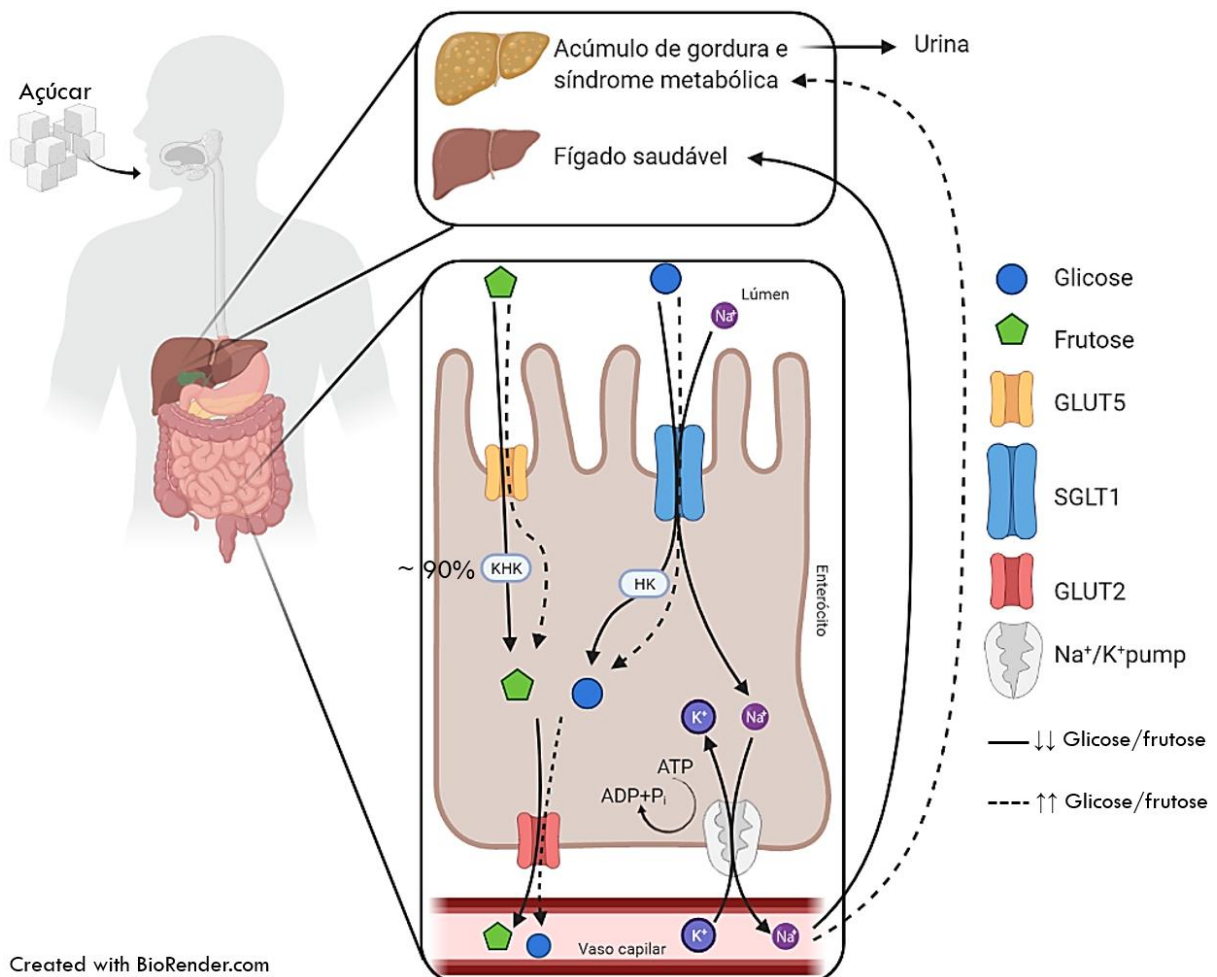


Figura 1: Principais alterações do consumo excessivo de açúcares no organismo.

O intestino é capaz de metabolizar aproximadamente 90% de açúcares, transportando pouca quantidade para a circulação portal e que, posteriormente, será metabolizada no fígado. Porém, quantidades excessivas de glicose e frutose sobrecarregam a capacidade de metabolização intestinal e aumenta a quantidade transportada para o fígado. O excesso de carboidratos no organismo provoca o acúmulo de gordura e a síndrome metabólica, com isso,

maiores quantidades são excretadas na urina. Fonte: ANDRES-HERNANDO et al., 2020; MERINO et al., 2020 (Adaptado).

Após a absorção intestinal, o fígado desempenha um papel importante na regulação do metabolismo de carboidratos através da lipogênese, em que ocorre a conversão de carboidratos em ácidos graxos. A captação hepática de glicose dietética é limitada pelo estado energético, pois a glicólise pode ser inibida pelo excesso de ATP e citrato. Por outro lado, o metabolismo hepático da frutose é independente do estado de energia, resultando em captação hepática desregulada e aumento da lipogênese (STANHOPE et al., 2009) que podem provocar toxicidade.

As principais vias do metabolismo da frutose estão relacionadas a conversão em glicose e lipídios, portanto, doses elevadas provocam a depleção de ATP pela frutoquinase, redução da oxidação de ácidos graxos e a lipogênese *de novo* (JANG et al., 2018; MERINO et al., 2020; VOS et al., 2008). O fornecimento excessivo de glicose e frutose com bebidas açucaradas estimula o aumento da lipogênese no organismo, aumentando a síntese de triglicérides e acúmulo de gordura no fígado, associados ao risco de desenvolvimento de doença hepática não alcoólica, bem como fibrose e esteatose (CHEN et al., 2019; MERINO et al., 2020).

Com relação à homeostase energética, o tecido adiposo (TA) contribui ativamente para este mecanismo, pois além de armazenar lipídeos, é um importante órgão secretor de citocinas e adipocinas, que atuam no sistema imune conferindo proteção de diversas funções metabólicas. A síndrome metabólica é capaz de alterar a homeostase deste mecanismo devido ao acúmulo excessivo de lipídeos (hipertrofia e hiperplasia) e alterações na produção de adipocinas que podem provocar um estado de inflamação crônica de baixa intensidade. Os mecanismos envolvidos neste estado inflamatório inclui a secreção de citocinas por adipócitos e por células imunes residentes no tecido adiposo, como TNF- α , IL-1 β e IL-6, que em associação à maior quantidade de ácidos graxos livres favorecem a ativação de vias de sinalização, como NF- κ B (BAKER; HAYDEN; GHOSH, 2011; KUSMINSKI; BICKEL; SCHERER, 2016). Além disso, a inflamação do tecido adiposo também implica em células do sistema imune, a leptina pode estimular a diferenciação em células T_{H1} e inibir a de células T_{reg} (CHATZIGEORGIOU et al., 2012).

Além disso, é importante ressaltar que os níveis circulantes de hormônios reguladores da saciedade são modulados pelo consumo de açúcar, portanto,

alterações nos tipos e nas quantidades de carboidratos podem interferir na sinalização hormonal (MERINO et al., 2020). Ao contrário da glicose, a frutose não estimula a liberação de insulina e inibe a secreção de leptina pelo tecido adiposo, com isso, a redução da saciedade resulta no aumento da ingestão geral de alimentos (ANDRES-HERNANDO et al., 2020; JANG et al., 2018).

Existem evidências que a ingestão excessiva desses carboidratos, principalmente em bebidas açucaradas, tem papel significativo no aumento da incidência de obesidade, dislipidemia e síndrome metabólica, por caracterizarem uma fonte calórica adicional sem muito valor nutricional agregado (ANDRES-HERNANDO et al., 2020; MERINO et al., 2020). Sendo assim, é importante destinar uma atenção especial aos hábitos alimentares em função das consequências dos alimentos compostos excessivamente por açúcares.

1.3. A mucosa intestinal e o papel de nutrientes na manutenção da homeostase

A modulação da resposta imune através do estado nutricional é importante para o desenvolvimento e a manutenção da homeostase do sistema imunológico. Adquirir nutrientes essenciais para a sobrevivência do organismo através da alimentação também proporciona contato com diversas moléculas que atuam como estímulo antigênico durante a digestão de macromoléculas no intestino delgado (FARIA et al., 2013). A microbiota e seus metabólitos, além de atuar na manutenção da arquitetura intestinal, também são importantes na modulação da imunidade (FARIA; REIS; MUCIDA, 2017). Sendo assim, os antígenos da dieta e a microbiota intestinal atuam simultaneamente para definir o perfil imunológico, desencadeando uma resposta não inflamatória caracterizada pela tolerância aos antígenos com efeitos locais e sistêmicos (FARIA; WEINER, 2005). Alguns trabalhos já descreveram que a maturação do sistema imune de camundongos é prejudicada após a ingestão de dieta sem a presença de macromoléculas, o que provoca alterações intestinais e reduz a ativação de células da mucosa intestinal (MENEZES et al., 2003; SOUZA, 2016).

A mucosa intestinal é a maior área de contato do organismo com o meio externo e possui uma precisa organização fisiológica e celular necessárias na manutenção do ambiente tolerogênico e na integridade da barreira intestinal (FARIA; REIS; MUCIDA, 2017). A superfície absorptiva intestinal é especializada e adaptada para lidar com diferentes estímulos externos, amparada por uma série de vilos e por células

caliciformes. Os vilos aumentam a área absorptiva e digestiva, já as células caliciformes são responsáveis pela produção de muco, sendo a imunoglobulina A secretada (sIgA) a principal imunoglobulina presente no muco intestinal que exerce o mecanismo de depuração de toxinas e microrganismos patogênicos, fornecendo, assim, a primeira linha de defesa contra patógenos (FARIA et al., 2013; MOWAT; AGACE, 2014).

O tecido linfoide associado ao intestino (do inglês *gut associated lymphoid tissue*, GALT) é o maior e mais complexo órgão linfoide do organismo que também atua na manutenção de um ambiente tolerogênico através de diversas estruturas, incluindo placas de Peyer, linfócitos da lâmina própria, linfócitos intraepiteliais e os linfonodos mesentéricos (do inglês *mesenteric lymph nodes*, MLNs) (MOWAT, 2003; WEINER et al., 2011). Os MLNs são órgãos que drenam partes específicas de acordo com a região intestinal, proporcionando o encontro de células imunes migratórias e, com isso, exercem papel importante nas vias de recirculação periférica (ESTERHÁZY et al., 2019). A lâmina própria, disposta abaixo da camada epitelial, possui vasos sanguíneos e linfáticos que comunicam com MLNs, facilitando a organização de uma resposta imune efetora através de seus componentes celulares como linfócitos, plasmócitos e células apresentadoras de antígenos (MOWAT; AGACE, 2014).

As células apresentadoras de antígenos incluem subpopulações de fagócitos mononucleares, por exemplo células dendríticas (do inglês *dendritic cells*, DCs) e macrófagos que estão localizados na lâmina própria, capturaram antígenos no lúmen intestinal e migram para os MLNs para induzir a resposta imunológica de acordo com o estímulo (MOWAT; AGACE, 2014). As DCs prevalentes na mucosa intestinal apresentam subconjuntos que envolvem a expressão de CD103 e CD11b em suas membranas e um mecanismo dependente do receptor da quimiocina CCR7 para a migração para os MLNs, contribuindo para a manutenção da integridade intestinal e a diferenciação de células TCD4⁺. Os subconjuntos de DCs caracterizados por CD103⁺CD11b⁺ possuem um papel importante na diferenciação de respostas do tipo T_H2 e T_H17, a expressão de CD103⁺CD11b⁻ com a geração de células T_H1, ao passo que populações de DCs CD103⁺ estão relacionadas com indução de T_{reg} e promover a troca de IgA (FLORES-LANGARICA et al., 2012, 2018).

O microambiente intestinal possui um papel muito importante na polarização das funções imunes. Algumas pesquisas descrevem que um microambiente com citocinas inflamatórias, como IFN- γ e IL-12, induz a expressão do fator de transcrição T-bet (do inglês *T-box expressed in T cells*) e inicia a diferenciação de células TCD4⁺

virgens em T_{H1} (SAHPUTRA et al., 2019; SZABO et al., 2000; YU et al., 2014). Este processo resulta na produção de IFN- γ e TNF- α que possuem papel importante na ativação de macrófagos e na troca de isotipo de imunoglobulinas (REEVES et al., 2011). Por outro lado, o aumento da citocina IL-4 polariza um perfil tipo T_{H2} por meio da expressão dos fatores de transcrição GATA-3 (do inglês *GATA-binding protein 3*) e STAT-6 (do inglês *signal transducer and activator of transcription 6*) (SAHPUTRA et al., 2019; SZABO et al., 2000; YU et al., 2014), resultando na produção de IL-4, IL-5 e IL-13, envolvidas nas respostas imunes aos helmintos e na produção de anticorpos, especialmente IgE (REEVES et al., 2011).

Atarashi, Tanoue e Honda (2010) descreveram que a diferenciação de células T_{H17} nos MLNs provavelmente ocorre pela ativação de células dendríticas na lâmina própria por moléculas derivadas da microbiota comensal. A citocina TGF- β induz a expressão do principal fator de transcrição para a diferenciação de células TCD4⁺ virgens em T_{H17}, o ROR γ T (do inglês *fator retinoic acid-related orphan receptor gamma t*), na presença de outras citocinas como IL-6 e IL-23. Porém, o TGF- β sozinho é incapaz de iniciar a diferenciação de T_{H17} porque também induz a expressão de FoxP3, fator de transcrição essencial para diferenciação de células T reguladoras (T_{reg}) (ATARASHI; TANOUE; HONDA, 2010). As células T_{H17} produzem IL-17 e são mediadoras importantes de uma série de doenças autoimunes, incluindo a artrite reumatoide e doença inflamatória intestinal, já as T_{reg} têm um papel essencial na regulação da resposta imune e na manutenção da auto tolerância (REEVES et al., 2011).

Após a diferenciação das células ativadas nos MLNs, haverá respostas imunes locais, ou seja, na mucosa, e repercussões em todo organismo, dado que este local possui conexões com o sistema imune periférico e sistêmico (FARIA et al., 2013). Além de atuar em doenças autoimunes, as células T_{H17} têm papel fundamental na mucosa intestinal, principalmente em funções relacionadas à manutenção da integridade da barreira intestinal, à modulação de populações microbianas. Neste sentido, os linfócitos T_{H17} reforçam as uniões intracelulares (*tight-junctions*) estabelecidas entre as células epiteliais intestinais, como a associação de claudina (KINUGASA et al., 2000). Também estão envolvidos na expressão da mucina em células caliciformes, além de induzir o recrutamento de neutrófilos do sangue para a lâmina própria intestinal via CXCL-1 e CXCL2 (AUJLA; DUBIN; KOLLS, 2007; CHEN et al., 2003).

Os nutrientes da dieta são peças-chave para a diferenciação de células na mucosa e na manutenção da integridade da barreira intestinal. O ácido retinóico, por exemplo, ao ser metabolizado por DCs presentes nos MLNs direciona a diferenciação de células TCD4⁺ em células T_{reg} (HOUSTON et al., 2016). Além disso, a frutose foi capaz de reprogramar vias metabólicas de monócitos estimulados por lipopolissacarídeos (LPS) de forma a favorecer um fenótipo inflamatório e o metabolismo oxidativo, uma vez que produziram níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF, e direcionaram o piruvato para o ciclo do ácido cítrico, respectivamente (JONES et al., 2021).

A microbiota intestinal é diretamente afetada pela dieta, o que pode modular a permeabilidade intestinal e provocar um impacto metabólico relacionado a disponibilidade de nutrientes (MERINO et al., 2020). Frequentemente associada com alto consumo de açúcares simples e gordura saturada, a disbiose intestinal provoca mudanças no repertório microbiano de modo a prevalecer propriedades patobiontes (SATOKARI, 2020). O excesso de glicose ou frutose, especificamente, favorece uma composição microbiana patobionte que expressa altas concentrações de endotoxinas, como LPS, de bactérias gram-negativas, suprime a produção de ácidos graxos de cadeia curta, recruta e ativa células fagocíticas que expressam *toll-like receptor 4* (TLR-4). O LPS, por sua vez, é uma potente endotoxina capaz de se ligar ao TLR-4 e desencadear vias de sinalização de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , com significativos efeitos metabólicos envolvidos no desenvolvimento de DCNTs (MOREIRA et al., 2012; SATOKARI, 2020). Todo este processo em conjunto provoca inflamação da mucosa intestinal, aumenta a permeabilidade e a penetração de patógenos na corrente sanguínea, e prejudica a função hepática (JANG et al., 2018; LAMBERTZ et al., 2017).

A metabolização intestinal de carboidratos é importante para prevenir a distribuição excessiva para outros órgãos como o fígado, conforme descrito anteriormente. Altas quantidades de glicose e frutose sobrecarregam a capacidade metabólica intestinal e aumentam a quantidade que é transportada para o fígado, o que provoca em longo prazo a síndrome metabólica (ANDRES-HERNANDO et al., 2020). Alguns trabalhos descrevem que o consumo excessivo de açúcar aumenta os transportadores intestinais GLUT2 e GLUT5, e a expressão de grelina, hormônio regulador da saciedade em humanos (RITZE et al., 2014), além de reduzir a expressão de ocludina e claudina em camundongos, proteínas importantes para

estabelecimento da barreira do epitélio intestinal (KAWABATA et al., 2019; VOLYNETS et al., 2017).

1.4. As consequências do consumo excessivo de carboidratos na mucosa intestinal

Adotar hábitos alimentares baseados em alimentos ultraprocessados, estes ricos em gorduras, açúcares refinados e sódio vêm sendo associado não só às DCNTs, mas também às desordens psicológicas, como depressão e ansiedade (MARTINS DE CARVALHO et al., 2019; SANTOS et al., 2018), às doenças inflamatórias intestinais e doenças autoimunes, como a esclerose múltipla (AGUIAR et al., 2018; ZHANG et al., 2019). Por ser a principal superfície de absorção dietética, a mucosa intestinal possui um importante mecanismo tolerogênico capaz de interagir constante e simultaneamente com nutrientes e a microbiota. Porém, quantidades exacerbadas de sódio e açúcares aumentam a produção mitocondrial de espécies reativas de oxigênio e, conseqüente, ativa TGF- β que na presença de IL-6 promove a diferenciação de células TCD4⁺ em T_H17 devido à sinalização intracelular. Assim, desequilíbrio entre células T_{reg} e as células inflamatórias T_H1, T_H2 e T_H17 devido ao excesso destes nutrientes pode favorecer o desenvolvimento de algumas patologias do intestino, como doença de Chron e colite ulcerativa (AGUIAR et al., 2018; ZHANG et al., 2019).

De forma semelhante, a dieta rica em sódio, gordura e carboidratos refinados e pobre em fibras e micronutrientes tem sido relacionada à progressão de doenças oncológicas (DE VRIES et al., 2017). O consumo exagerado de glicose e frutose por camundongos sobrecarregou a capacidade absorptiva do intestino delgado e aumentou as concentrações desses açúcares no cólon. As células tumorais localizadas no intestino delgado e grosso se beneficiaram da concentração elevada de frutose e expressaram altos níveis do receptor GLUT5 para transportar e metabolizar a frutose, favorecendo seu crescimento e desenvolvimento (GONCALVES et al., 2019).

A mucosite é um efeito colateral comum em pacientes em tratamento oncológico pois, além de afetar células cancerosas, também atinge as células epiteliais da barreira mucosa gastrointestinal. Esta condição é caracterizada pela inflamação da mucosa gastrointestinal devido à apoptose de células epiteliais, perda da integridade e da barreira epitelial que podem levar a formação de úlceras

(GENEROSO et al., 2015; VLIET et al., 2010). O fármaco 5-fluorouracil (5-FU), amplamente utilizado no tratamento de câncer, é capaz de induzir mucosite em modelos experimentais provocando danos como perda de peso, infiltração de neutrófilos e achatamentos dos vilos intestinais (MAIOLI et al., 2014; SOARES et al., 2008; TRINDADE et al., 2018).

2. JUSTIFICATIVA

O estado nutricional é capaz de modular a resposta imunológica do indivíduo e o intestino é o principal local de absorção de nutrientes. Nesse âmbito, a literatura científica dispõe de poucos dados relacionados aos efeitos do consumo excessivo de bebidas açucaradas no sistema imune de mucosa intestinal, especificamente no intestino delgado. Sendo assim, compreender tais alterações pode ajudar a esclarecer a relação de risco entre o consumo excessivo de glicose e frutose no organismo e o desenvolvimento de doenças crônicas, bem como a susceptibilidade a doenças inflamatórias intestinais.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito de bebida açucarada no perfil de resposta imune de mucosa intestinal para verificar se ocorre aumento da susceptibilidade a doenças inflamatórias em camundongos C57BL/6.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar se a síndrome metabólica provocada pelo excesso de carboidrato simples interfere na arquitetura e no sistema imune de mucosa do intestino delgado.
- Identificar se a bebida açucarada provoca mudanças no perfil celular imune do baço como órgão sistêmico.
- Investigar se o consumo excessivo de açúcares é capaz de alterar a morfologia e de modificar o perfil celular do tecido adiposo epididimal.
- Analisar a frequência de células TCD4⁺ nos linfonodos mesentéricos compartimentalizados, após o consumo de bebida açucarada.
- Verificar se a bebida açucarada interfere na dinâmica da mucosite experimental.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Camundongos machos C57BL/6 ou C57BL/6-GFP-*knock-in* para o fator de transcrição FoxP3 com 6 a 8 semanas de idade foram agrupados e mantidos em gaiolas coletivas (máximo 5 animais/gaiola) no biotério do Laboratório de Imunobiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais. Os camundongos C57BL/6-GFP-*knock-in* para FoxP3 foram utilizados para analisar a frequência celular de linfócitos T_{reg} nos tecidos pelo método de citometria de fluxo. Durante toda experimentação os animais tiveram livre acesso a água e alimentação. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG sob protocolo número 126/2020 (Anexo 1).

4.2. Dieta experimental, bebida açucarada e ingestão alimentar

Os animais foram alimentados com a dieta AIN-93G (*American Institute of Nutrition - growth*) (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993), que é recomendada como dieta experimental por apresentar composição de acordo com as necessidades nutricionais de roedores, e por possibilitar modificações de acordo com as diferentes aplicações devido à facilidade de produção e adaptação a protocolos específicos. A composição da dieta é descrita na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição da dieta experimental AIN93G

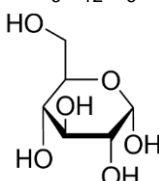
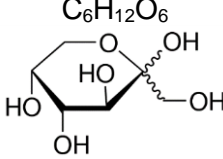
Ingredientes	g/kg de dieta
Amido de milho	397,486
Caseína láctea	200
Amido dextrinizado	132
Sacarose (açúcar cristal)	100
Óleo de soja	70
Celulose MC-101	50
Mix mineral AIN93G	35
Mix vitamina	10
L-cistina	3
Bitartarato de colina	2,5
<i>Tert-butylhydroquinone</i> (BHT)	0,014
Total (g)	1000
Kcal/g	3,95
Composição centesimal de macronutrientes (%/kg)	
Carboidratos	64
Proteína	20
Lipídeos	16

AIN93G: dieta padrão para roedores; g/kg: gramas/quilo; Kcal: quilocalorias.

A ingestão alimentar dietética foi monitorada semanalmente durante todo o experimento (9 semanas) através da diferença entre a quantidade (gramas) de dieta ofertada e o remanescente na semana seguinte.

Simultaneamente, os camundongos do grupo experimental receberam a bebida açucarada *ad libitum*. A bebida foi administrada na garrafa de água e continha 25% de uma mistura de glicose e frutose na proporção 45:55, respectivamente (GONCALVES et al., 2019). A Tabela 2 descreve as características da glicose e frutose utilizadas nos experimentos.

Tabela 2 – Informações moleculares da glicose e frutose

Nome	Fórmula Molecular	Peso Molecular	Concentração
D-(+)-Glicose Anidra P.A.	$C_6H_{12}O_6$ 	180,16	99,50%
D-(-)-Frutose P.A.	$C_6H_{12}O_6$ 	180,16	98,0%

Fonte: Ficha de Informações de Segurança de produtos Químicos - Neon Comercial Ltda (adaptada).

O consumo líquido foi monitorado a cada três dias durante 8 semanas, pois a primeira semana foi de adaptação dos animais à dieta. O cálculo se deu através da diferença entre o volume (mililitros) de água filtrada ou bebida açucarada ofertada e o remanescente de três dias.

4.3. Delineamento experimental

Os animais foram separados em dois grupos: animais controle tratados com água filtrada (grupo água); animais do grupo experimental tratados com 25% de glicose e frutose na água (grupo bebida açucarada). Durante a primeira semana foi ofertado AIN93G e água filtrada para ambos os grupos de modo que os animais pudessem se adaptar à dieta e a fim de prevenir a substituição do alimento sólido pela bebida devido à saciedade advinda do excesso calórico. Sendo assim, foi administrado bebida açucarada para o respectivo grupo experimental durante oito semanas (Figura 2), quando já é possível observar alguns efeitos metabólicos decorrentes do excesso de carboidratos simples (GONCALVES et al., 2019).

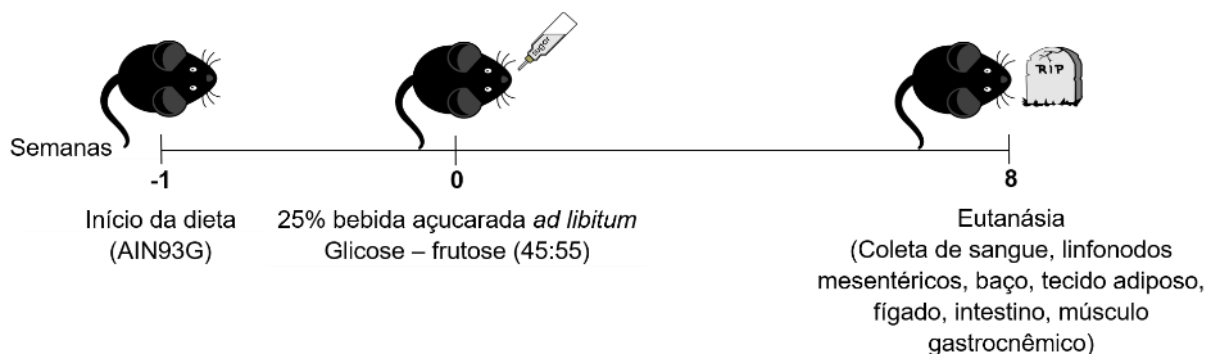


Figura 2: Delineamento experimental.

Camundongos C57BL/6-GFP-*knock-in* FoxP3 foram alimentados com dieta AIN93G por uma semana. Logo após, se iniciou o tratamento com a bebida açucarada em 25% da água filtrada na proporção 45:55 de glicose e frutose, respectivamente. A dieta foi ofertada durante todo experimento. Após oito semanas de tratamento com bebida açucarada, os animais foram eutanasiados para coleta de sangue para análises enzimáticas, linfonodos mesentéricos, baço e tecido adiposo para análises de citometria de fluxo, fígado, intestino e músculo gastrocnêmico para confecção de lâminas histológicas.

4.4. Medida de peso corporal

Os animais foram pesados semanalmente no mesmo dia e horário, a temperatura local se manteve em aproximadamente 26°C, mantendo constante a temperatura corporal dos animais para reduzir possíveis interferências na aferição. A

média do ganho de peso corporal de cada grupo foi avaliada pela diferença de peso entre as respectivas semanas de tratamento com a semana zero (peso inicial) e expressa através da curva de crescimento. O peso dos camundongos foi determinado em gramas com auxílio de balança eletrônica de precisão (*Marte* – modelo AS2000c) com seis casas decimais.

4.5. Eutanásia e coleta de amostras

Os animais foram anestesiados utilizando 100µL de solução de 25% de Cloridrato de Quetamina e 25% Xilazina diluídas em 50% de salina fisiológica, aplicada via intraperitoneal. O sangue foi coletado através de pulsão cardíaca, transferido para microtubos e centrifugados a 12000rpm por 20 minutos para separação do soro, seguido da coleta e armazenamento à -20°C para análises posteriores. Após a eutanásia, os linfonodos mesentéricos, baço, tecido adiposo, músculo gastrocnêmico da perna direita, lobo esquerdo do fígado e intestino delgado foram coletados. O peso do tecido adiposo e do músculo gastrocnêmico foi determinado em miligramas com auxílio de balança digital de precisão (*Commerce Brasil*, modelo CBRN05529) com cinco casas decimais.

4.6. Cálculo do índice de adiposidade

Para avaliar um dos parâmetros de obesidade nos animais foi utilizado o índice de adiposidade. Antes da eutanásia, os camundongos foram pesados e, após a coleta do sangue, o tecido adiposo epididimal foi retirado e pesado (TAYLOR; PHILLIPS, 1996). Em seguida, realizou-se o seguinte cálculo:

$$\text{Índice de Adiposidade} = \frac{\text{peso do tecido adiposo epididimal}}{\text{peso corporal final}}$$

4.7. Análise de perfil glicêmico e lipídico

a. Glicemia e glicosúria pós-prandial e de jejum

Os níveis de glicose pós-prandial foram definidos por teste enzimático colorimétrico de acordo com as instruções de uso do KIT *Bioclin* Glicose Monoreagente (referência K082). As amostras de soro, o reagente padrão e o branco (controle negativo) foram adicionadas à placa de poliestireno (*Sarstedt*) devidamente identificadas, homogeneizadas e deixadas a 37°C por 10 minutos. A leitura da absorbância foi realizada em leitor automático (*Bio-RadiMark™ Microplate Reader*) em comprimento de onda 490nm. O resultado é expresso pela média de cada grupo em mg/dL calculado através da seguinte equação:

$$\text{Glicose (mg/dL)} = \frac{(\text{absorbância da amostra} \times 100)}{\text{absorbância do padrão}}$$

A glicemia de jejum noturno (6 horas) foi mensurada através de glicosímetro de tiras (*Accu-Chek Active – Roche Diabetes Care*) após a coleta de uma gota de sangue da cauda dos camundongos. Os níveis de glicose de cada animal foram definidos em mg/dL e o resultado expresso pela média do grupo.

A glicosúria pós-prandial e de jejum também foram determinadas com auxílio de glicosímetro de tiras (*Accu-Chek Active – Roche Diabetes Care*) após a coleta de uma gota de urina de cada animal. O resultado é apresentado pela média de cada grupo em mg/dL.

b. Hemoglobina glicada

A análise de hemoglobina glicada de jejum no soro dos animais foi realizada pelo método de cromatografia no laboratório TECSA – Tecnologia em Sanidade Animal. O resultado é apresentado pela frequência média de hemoglobina glicada em cada grupo.

c. Insulina endógena

A análise de insulina endógena de jejum no soro dos animais foi realizada pelo método de ELISA no laboratório TECSA – Tecnologia em Sanidade Animal. O resultado é apresentado pela média de cada grupo em mcUI/ml.

d. Colesterol e triglicérides pós-prandial e de jejum

A caracterização do perfil lipídico de jejum (6 horas) se deu através da coleta de 200µL de sangue na veia submandibular (GOLDE; GOLLOBIN; RODRIGUEZ, 2005) dos camundongos.

Para avaliar os níveis de colesterol total e de triglicérides foi realizado teste enzimático colorimétrico de acordo com as instruções de uso do KIT *Bioclin* Colesterol Monoreagente (referência K083) e Triglicérides Monoreagente (referência K117). As amostras de soro (pós-prandial e de jejum), o reagente padrão e o branco foram adicionadas à placa de poliestireno (*Sarstedt*) devidamente identificadas, homogeneizadas e deixadas a 37°C por 10 minutos. A leitura da absorvância foi realizada em leitor automático (*Bio-RadiMark™ Microplate Reader*) em comprimento de onda 490nm. O resultado é expresso pela média de cada grupo em mg/dL calculado através da seguinte equação:

$$\text{Colesterol (mg/dL)} = \frac{\text{absorvância da amostra}}{\text{absorvância do padrão}} \times 200$$

$$\text{Triglicérides (mg/dL)} = \frac{(\text{absorvância da amostra} \times 100)}{\text{absorvância do padrão}}$$

A determinação da lipoproteína de baixa densidade (do inglês *low density lipoproteins*, LDL) de jejum e pós-prandial foi realizada pelo teste enzimático colorimétrico de acordo com as instruções de uso do KIT *Bioclin* LDL direto (referência K088). As amostras de soro, o reagente calibrador reconstituído e o branco (controle negativo) foram adicionadas à placa de poliestireno (*Sarstedt*) devidamente identificadas, homogeneizadas e após 5 minutos de incubação a 37°C foi medido a absorvância em 595nm. Em seguida, o reagente de cor foi adicionado aos poços e

homogeneizado para realização de nova leitura após 5 minutos de incubação a 37°C. O resultado é expresso pela média de cada grupo em mg/dL calculado através da seguinte equação:

$$\text{Coolesterol LDL (mg/dL)} = \frac{(A_2 - A_1)_{amostra}}{(A_2 - A_1)_{padrão}} \times n$$

A₁= absorvância 1.

A₂= absorvância 2.

n= concentração do calibrador.

A dosagem da lipoproteína de alta densidade (do inglês *high density lipoproteins*, HDL) foi realizado por teste enzimático colorimétrico de acordo com as instruções de uso do KIT *Bioclin* Coolesterol HDL enzimático (referência K015). Após a precipitação das LDL, VLDL e quilomícrons das amostras, o sobrenadante, o padrão e o branco (controle negativo) foram adicionados à placa de poliestireno (*Sarstedt*) devidamente identificadas, homogeneizadas e deixadas em banho-maria 37°C por 5 minutos. A leitura da absorvância foi realizada em leitor automático (*Bio-RadiMark™ Microplate Reader*) em 490 nm. O resultado é expresso pela média de cada grupo em mg/dL calculado através da seguinte equação:

$$\text{Coolesterol HDL (mg/dL)} = \frac{\text{absorvância da amostra}}{\text{absorvância do padrão}} \times 80$$

A fração aterogênica de jejum e pós-prandial, ou seja, o coolesterol não-HDL (n-HDL), é apresentada pela média de cada grupo em mg/dL como resultado da seguinte equação:

$$n - HDL = CT - HDL$$

CT= coolesterol total.

4.8. Avaliação da Permeabilidade Intestinal

Para avaliar a permeabilidade intestinal, os animais receberam 0,1 mL de solução de ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA) contendo 18,5 MBq de 99 m-

tecnécio (^{99m}Tc). Após 4 horas, os animais foram anestesiados, conforme descrito anteriormente, e o sangue foi coletado por punção axilar para a determinação da radioatividade utilizando um contador-gama (VIANA et al., 2010). Para calcular o percentual da dose no sangue foi utilizado um padrão com a mesma dose de ^{99m}Tc -DTPA. O resultado é expresso pela porcentagem (%) da dose, utilizando a seguinte equação:

$$\% \text{ da dose de } ^{99m}\text{Tc} - \text{DTPA} = \frac{\text{cpm do sangue}}{\text{cpm da dose administrada (padrão)}} \times 100$$

cpm= contagem por minuto.

4.9. Análises histológicas

a. Coleta e fixação dos tecidos

Após a eutanásia, o tecido adiposo, o intestino delgado (fragmentado em duodeno, jejuno e íleo) e o lobo esquerdo do fígado dos animais foram retirados e fixados em solução de formol 10% até o processamento. Os tecidos foram desidratados através de sucessivas imersões em concentrações crescentes de álcool, imersos em xilol e incluídos em parafina para formação de blocos contendo os fragmentos dos tecidos. Cortes histológicos foram realizados em micrótomo em secções de 4 μm de espessura. A parafina foi removida em estufa a 96°C por 15 minutos para a coloração com hematoxilina-eosina (HE). Para montagem, as lâminas foram lavadas em água corrente, contra coradas com eosina e imersas em cubas de álcool e de xilol. As imagens foram capturadas por uma microcâmera JVC TK-1270/RGB em aumento de 100x ou 200x e analisadas com auxílio do software *ImageJ*.

b. Análises morfológicas do intestino delgado

As imagens foram obtidas em aumento de 100x para avaliar a morfometria dos vilos e o número de células caliciformes de cada porção do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo).

Dois vilos íntegros por secção histológica foram medidos a partir da região basal até seu ápice, descontando-se as criptas, com auxílio de lamínula milimetrada (Figura 3). O resultado foi expresso pela média de 20 vilosidades de cada amostra.

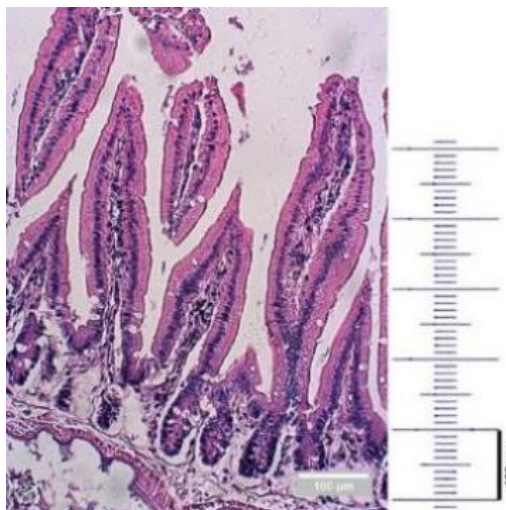


Figura 3: Exemplo do campo utilizado para análise morfológica dos vilos intestinais.

As células caliciformes das porções do intestino delgado foram identificadas e selecionadas através de diferentes *pixels* nas imagens capturadas das lâminas histológicas coradas pela técnica HE em aumento de 100x (MOWAT; AGACE, 2014). Foram consideradas todas as células caliciformes presentes nos vilos do duodeno, jejuno e íleo (desconsiderando-se as criptas) de 10 campos diferentes em cada animal. O resultado é apresentado como a média de células caliciformes em 10 campos por animal.

c. Quantificação de degeneração hepática

A degeneração hepática foi caracterizada pela presença de vacúolos citoplasmáticos nas imagens obtidas em aumento de 200x. O resultado representa a média de sinais degenerativos em 10 campos aleatórios por animal.

d. Análises morfológicas do tecido adiposo

Para avaliar o diâmetro dos adipócitos (aumento de 200x) determinou-se a média da área (μm^2) de 50 adipócitos em campos aleatórios de cada animal; o número de estruturas tipo coroa (ETC), definidas como leucócitos que circundam os adipócitos

(LUCK et al., 2019; PEREIRA et al., 2012), foi quantificado em 10 campos de cada animal. O resultado foi expresso pela média de ETC em 10 campos por animal.

4.10. Obtenção de células de órgãos linfoides e do tecido adiposo

a. Baço e linfonodos mesentéricos

O baço e os linfonodos mesentéricos compartimentalizados de cada animal foram retirados e mantidos em meio RPMI 1640 (*Gibco*) pH 7,2 acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB), 2mM de L-glutamina, 25 mM de HEPES (*Sigma*), 50 μ M de β -mercaptoetanol (*Amersham Pharmacia Biotech*), 20 μ g/mL de sulfato de gentamicina, 1mM de piruvato de sódio e 0,1mM de aminoácidos não-essenciais. Os órgãos foram homogeneizados em 1mL de meio completo com auxílio de lâminas com extremidades foscas friccionando-as uma à outra. O homogeneizado celular foi centrifugado durante 10 minutos a 500g a 4°C em tubos cônicos de 15mL. Para os linfonodos mesentéricos, o sedimento celular foi ressuscitado em 200 μ L de meio RPMI completo. O sedimento do baço foi acrescido de 9mL de água bidestilada para lisar as hemácias e, em seguida, adicionou-se 1mL de tampão fosfato (PBS) 10 vezes concentrado para ajustar a osmolaridade, sendo novamente centrifugado e ressuscitado em 500 μ L de meio RPMI completo. As células viáveis foram quantificadas utilizando câmara de Neubauer e o corante Azul de Tripan a 0,4%.

b. Tecido adiposo

Para obter a suspensão de células do tecido adiposo epididimal foi retirado aproximadamente 200mg por animal. O tecido foi fragmentado em tamanho menor e mantido sob agitação em homogeneizador orbital a 37°C por 1 hora em meio RPMI acrescido de 2mg/mL de colagenase tipo II (*Sigma*) e 150 μ g/mL de desoxirribonuclease I (DNase I) (*Sigma*). Em seguida, a reação de digestão da colagenase foi interrompida ao alocar o recipiente com as amostras no gelo por 5 minutos. O homogenato foi filtrado em filtro de células de nylon de 100 μ m e adicionado ao meio RPMI com 5% SFB até completar 10mL em tubos cônicos de 50mL. As amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 500g a 4°C e, após, o sobrenadante, que consistia na camada de gordura, foi cuidadosamente descartado

e apenas os leucócitos foram coletados com auxílio de pipeta Pasteur de vidro e transferidos para tubos cônicos de 15mL, tendo o volume ajustado para 2mL com RPMI acrescido de 5% SFB. Após a centrifugação a 500g por 10 minutos à 4°C, o sedimento com as células foi ressuspensionado em meio RPMI completo (CHO; MORRIS; LUMENG, 2014). As células viáveis foram quantificadas através de contagem em câmara de Neubauer usando Azul de Tripán a 0,4% para coloração de células mortas.

4.11. Análises por Citometria de Fluxo

a. Imunofenotipagem

O fenótipo celular e a expressão de determinadas moléculas em diferentes órgãos foram avaliadas pela técnica de citometria de fluxo. As células obtidas dos órgãos linfoides e do tecido adiposo foram lavadas com PBS acrescido de 0,5% de albumina de soro bovino (do inglês *bovine serum albumin*, BSA) (PBS-*wash*) e incubadas em placas de poliestireno por 30 minutos com Fc-*block* (anti-CD16/32 – *BD Biosciences*). Após lavar e centrifugar as placas, foram adicionados 10µL de variadas combinações de anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos reativos para moléculas de superfície (previamente diluídos) e incubadas por 30 minutos a 4°C em abrigo de luz. Para a marcação intracelular dos fatores de transcrição, após a primeira etapa, foi utilizado KIT de fixação/permeabilização (*e-Bioscience*) e, em seguida, as amostras foram incubadas por 30 minutos ao abrigo de luz com anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos reativos para moléculas intracelulares. Após lavar com PBS-*wash* e centrifugar, as amostras foram fixadas com 200µL de solução contendo 1% paraformaldeído durante 30 minutos, lavadas novamente e armazenadas em PBS a 4°C para leitura no citômetro. As suspensões celulares foram transferidas para tubos de leitura apropriados (7,5 cm x 1cm), armazenadas a 4°C e protegidas de luz. A aquisição das amostras foi realizada no citômetro FACScanto II acoplado a um computador com o software *Diva* (*BD Biosciences*). As populações de interesse foram delimitadas a partir de um gráfico que permite identificar o tamanho e a granulosidade das células pelo padrão de dispersão do laser após a aquisição das amostras (*Forward Scatter* - FSC x *Side Scatter* - SSC), sendo adquiridos 50000 a 100000 eventos para as análises de linfócitos. Para determinar os canais positivos e criar o delineamento das análises foram realizadas marcações de células simples,

leitura de células na ausência de marcadores e o método *fluorescence minus one* (FMO) (ROEDERER, 2001; TUNG et al., 2004). As análises posteriores e a determinação das populações positivas e negativas de cada marcador, bem como o nível de expressão das respectivas moléculas, foram realizadas com auxílio do software *FlowJo* (BD Biosciences).

Os fluorocromos associados aos anticorpos (Tabela 3) utilizados para análise das células do baço, MLNs e TA foram: ficoeritrina (PE) conjugado com ROR γ T; isotiocianato de fluoresceína (FITC) conjugado com FoxP3; peridina clorofila (PerCP) Cy5.5 conjugado com CD3; alofocianina (APC) conjugado com CD45; APC-Cy7 conjugado com CD4; *Pacific blue* conjugado com T-bet; amycyan conjugado com *Live/Dead* (L/D).

Tabela 3 – Anticorpos utilizados para marcação de citometria de fluxo

Molécula	Anticorpo	Marca
L/D	Amcyan	Invitrogen
CD45	APC	eBioscience
CD3	PerCP-Cy5.5	BioLegend
CD4	APC-Cy7	BD Biosciences
T-bet	<i>Pacific blue</i>	BD Biosciences
ROR γ T	PE	BD Biosciences
FoxP3	FITC	*
<i>Fc-block</i>	-	BD Biosciences

*Camundongo C57BL/6 *green fluorescent protein* (GFP)

b. Estratégia de análise das populações de interesse

As células extraídas do baço, MLNs e TA foram avaliadas por citometria de fluxo para identificar o perfil celular e a frequência de linfócitos TCD4⁺. A identificação foi realizada pela seleção padrão para leucócitos por tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC-A) e, em seguida, as populações positivas e negativas foram separadas de acordo com os marcadores utilizados (Figuras 4, 5 e 6).

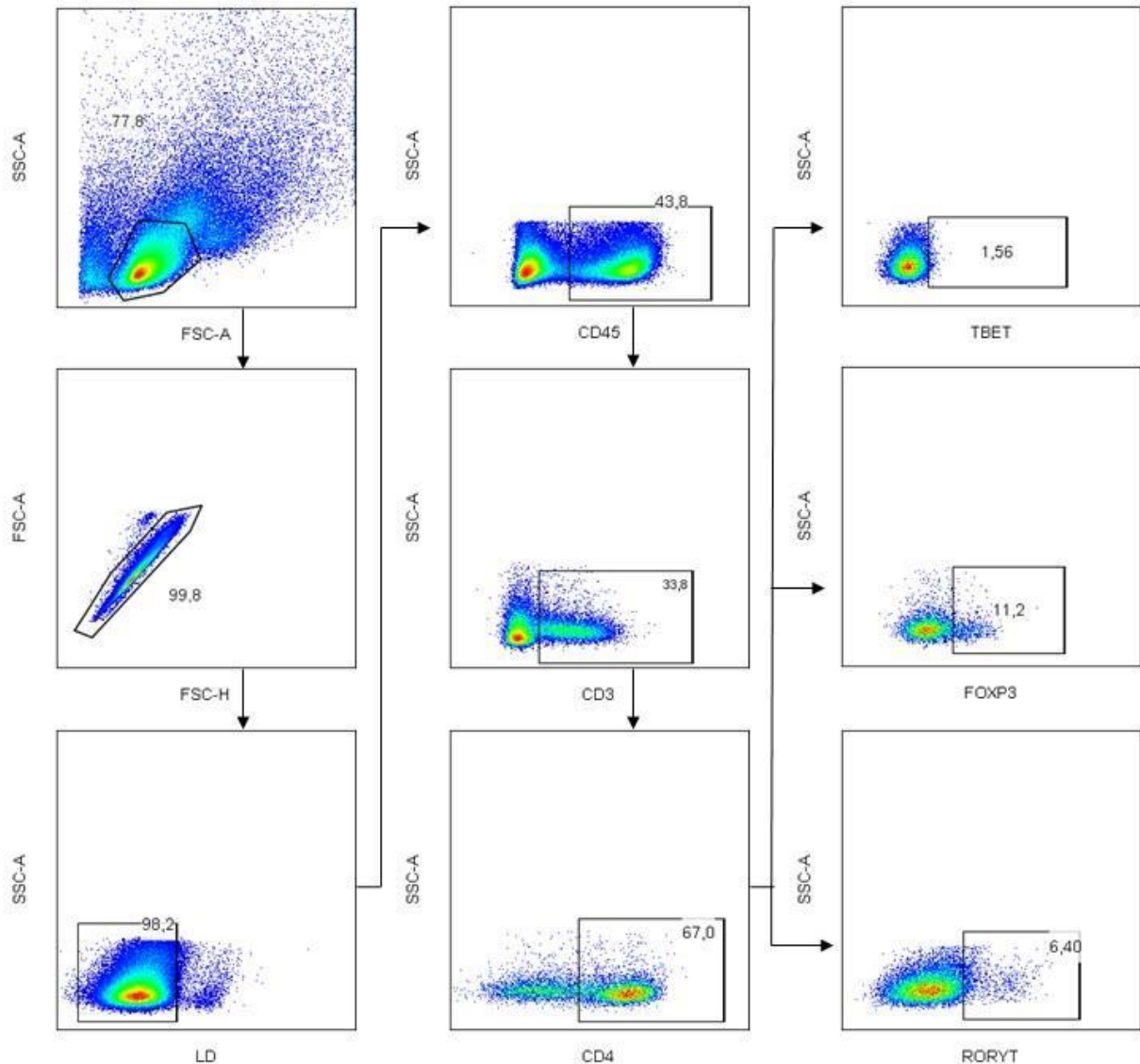


Figura 4: Imunofenotipagem de linfócitos TCD4⁺ no baço.

Foram selecionados os singlets (FSC-A x FSC-H). Células vivas foram selecionadas pelo marcador *Live/Dead* (LD). Os leucócitos foram selecionados com base no tamanho e granulosidade celular (SSC-A x FSC-A) e pelo marcador CD45. Os linfócitos foram selecionados pela expressão de CD3 e os linfócitos T *helper* pela expressão de CD4. As populações T_{H1}, T_{H17} e T_{reg} foram definidas pela expressão de T-bet, ROR γ T, FoxP3, respectivamente.

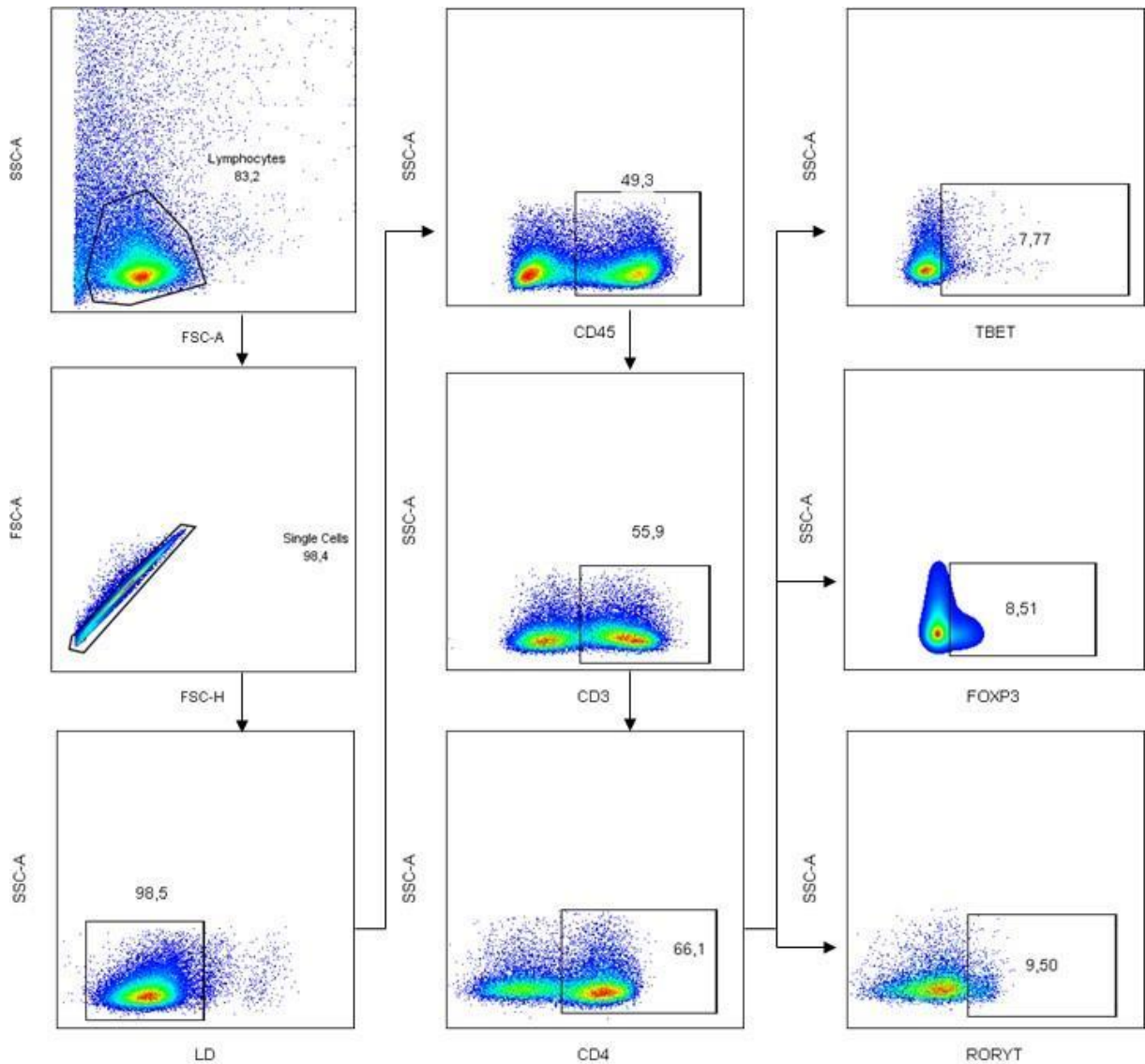


Figura 5: Imunofenotipagem de linfócitos TCD4⁺ nos linfonodos mesentéricos.

Foram selecionados os singlets (FSC-A x FSC-H). Células vivas foram selecionadas pelo marcador *Live/Dead* (LD). Os leucócitos foram selecionados com base no tamanho e granulosidade celular (SSC-A x FSC-A) e pelo marcador CD45. Os linfócitos foram selecionados pela expressão de CD3 e os linfócitos T *helper* pela expressão de CD4. As populações T_{H1}, T_{H17} e T_{reg} foram definidas pela expressão de T-bet, ROR γ T, FoxP3, respectivamente.

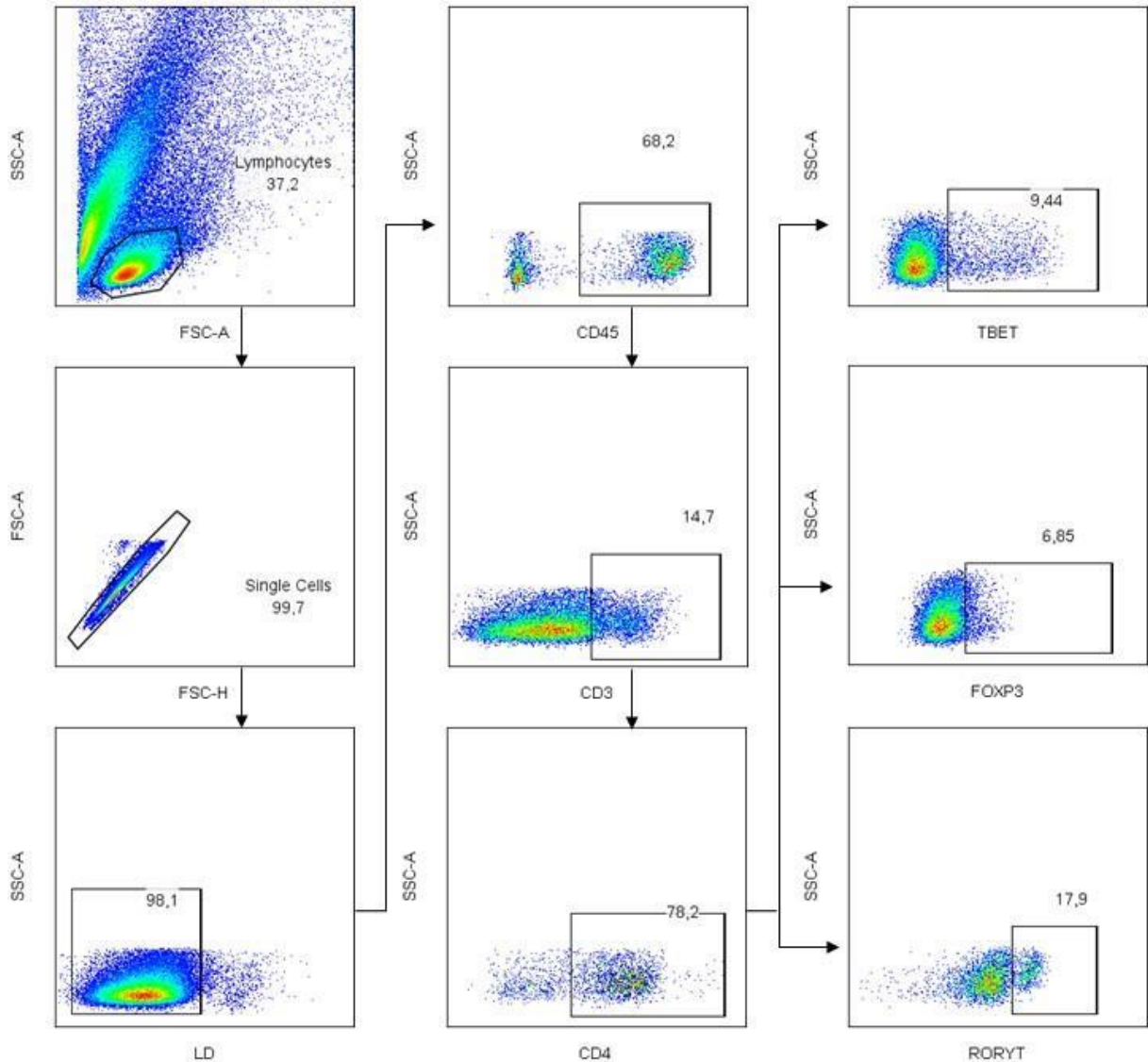


Figura 6: Imunofenotipagem de linfócitos TCD4⁺ no tecido adiposo.

Foram selecionados os singlets (FSC-A x FSC-H). Células vivas foram selecionadas pelo marcador Live/Dead (LD). Os leucócitos foram selecionados com base no tamanho e granulosidade celular (SSC-A x FSC-A) e pelo marcador CD45. Os linfócitos foram selecionados pela expressão de CD3 e os linfócitos T *helper* pela expressão de CD4. As populações T_{H1}, T_{H17} e T_{reg} foram definidas pela expressão de T-bet, ROR γ T, FoxP3, respectivamente.

4.12. Indução de Mucosite

A fim de estudar os efeitos da ingestão de bebida açucarada na mucosite, foi delineado um segundo protocolo experimental (Figura 7). Animais submetidos ou não à ingestão de bebida açucarada por 8 semanas foram divididos em grupos com ou sem indução de mucosite: controle (CTL) + água, CTL + bebida açucarada, mucosite (MUC) + água, MUC + bebida açucarada. Para indução de mucosite experimental, os camundongos receberam injeção intraperitoneal (i.p.) de 300mg/kg de 5-fluorouracil

(5-FU). Os animais sem indução de mucosite receberam injeção i.p. do mesmo volume de solução salina estéril (MAIOLI et al., 2014). Durante 3 dias os animais continuaram recebendo o tratamento com água ou bebida açucarada. Após 72 horas da injeção de 5-FU, os animais foram sacrificados e o sangue foi coletado para analisar a permeabilidade intestinal, conforme descrito anteriormente, e a atividade de mieloperoxidase (MPO).

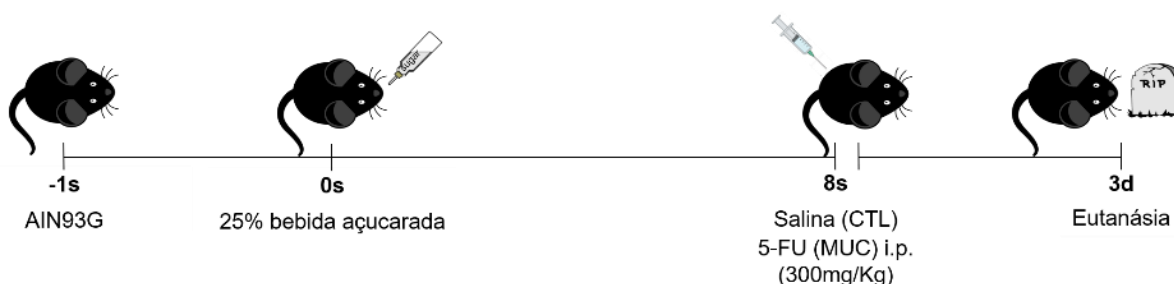


Figura 7: Delineamento experimental e indução de mucosite com 5-FU.

Camundongos C57BL/6 foram alimentados com dieta AIN93G por uma semana e, logo após, se iniciou o tratamento com a bebida açucarada em 25% da água filtrada por oito semanas. A dieta foi ofertada durante todo experimento. Na oitava semana, os camundongos dos grupos Água + MUC e Bebida açucarada + MUC receberam injeção intraperitoneal (i.p.) de 300mg/Kg de 5-FU para indução de mucosite. Os grupos controles Água CTL e Bebida açucarada CTL receberam o mesmo volume de solução salina. Após 72 horas, os animais foram eutanasiados para analisar a permeabilidade intestinal e a atividade de mieloperoxidase (MPO).

a. Peso corporal

O peso corporal de cada grupo foi monitorado durante 3 dias consecutivos e a perda de peso foi avaliada pela diferença (Δ) do peso inicial e o peso 72 horas após a administração de 5-FU ou salina. O resultado é expresso pela média do Δ de cada grupo. O peso dos camundongos foi determinado em gramas com auxílio de balança eletrônica de precisão (*Marte* – modelo AS2000c) com seis casas decimais.

b. Atividade de mieloperoxidase

A atividade neutrofílica no íleo foi estimada indiretamente através da medida de MPO. Resumidamente, 100mg de tecido foram homogeneizados em 1,9mL de PBS (pH 4,7) com auxílio de homogeneizador de tecido, centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C, logo após o precipitado foi submetido à lise hipotônica (500 μ L de NaCl 0,2%), seguido da lise de hemácias através da adição de 500 μ L de solução de NaCl 1,6% contendo 5% de glicose e novamente submetido a centrifugação. O sedimento foi ressuspenso em PBS (pH 5,4) contendo 0,5% de brometo de

hexadeciltrimetilamônio (PBS-HTAB) e homogeneizado. Alíquotas de 1mL da suspensão foram transferidas para microtubos de 1,5mL, submetidas a três ciclos de congelamento/descongelamento utilizando nitrogênio líquido e novamente centrifugadas a 10000rpm por 10 minutos. Para o ensaio enzimático, 25µL do sobrenadante das amostras diluídos em PBS (pH 5,4) e 25µL do substrato tetrametilbenzidina (TMB) foram adicionados em placa de 96 poços e incubados por 5 minutos a 37°C; em seguida, foram adicionados 100µL peróxido de hidrogênio (H₂O₂ – 0,5mM) e realizada nova incubação por 5 minutos a 37°C (LEONEL et al., 2013, adaptado). A reação foi interrompida pela adição de 100µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄ – 1M). A leitura da absorbância foi realizada em leitor automático (*Bio-RadiMark™ Microplate Reader*) em comprimento de onda de 450nm e os resultados são expressos como unidades relativas.

4.13. Análise estatística

Nas avaliações das diferenças estatísticas entre as variáveis utilizou-se o software *GraphPad Prism 9*. O teste de normalidade Shapiro-Wilk foi utilizado para determinar a distribuição das amostras e, em seguida, foram executados os testes t de *Student* ou *Two-way ANOVA* considerando-se o nível de significância $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. A ingestão de bebida açucarada altera o padrão alimentar de camundongos C57BL/6

O tratamento com a bebida açucarada aumentou significativamente ($p < 0,05$) o consumo hídrico dos animais (Figura 8 A), ao passo que diminuiu a ingestão alimentar neste grupo quando comparado ao grupo controle (Figura 8 B), provavelmente devido à saciedade advinda dos carboidratos presentes na suplementação na bebida. Com isso, houve aumento na densidade energética cumulativa ingerida pelo grupo bebida açucarada (Figura 8 C), sendo que a maior parte das calorias foram provenientes de carboidratos simples (Figura 8 D), ou seja, monossacarídeos e dissacarídeos.

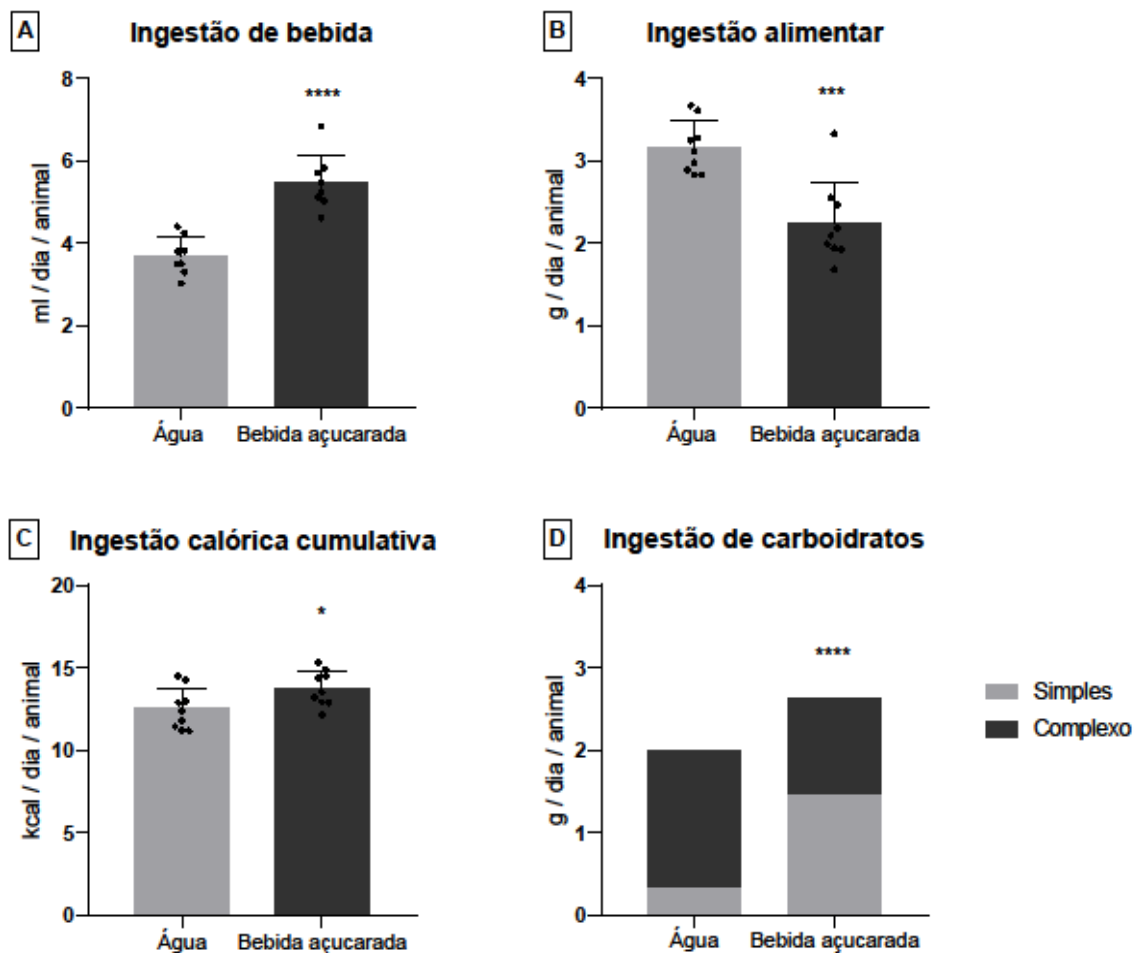


Figura 8: Camundongos C57BL/6 alimentados com dieta AIN93G e que ingeriram bebida açucarada consomem mais carboidratos simples e têm maior ingestão calórica.

(A) Média do consumo de água filtrada ou bebida açucarada durante 8 semanas (n=8).

(B) Média do consumo alimentar de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta AIN93G monitorado durante 9 semanas (n=9).

(C) A ingestão calórica cumulativa representa o somatório de calorias totais da dieta AIN93G e da suplementação com carboidratos na água do grupo bebida açucarada (n=9). O resultado é apresentado pela média de ingestão de quilocalorias (kcal) por dia de cada animal.

(D) A ingestão de carboidratos foi calculada combinando o consumo de carboidratos (simples e complexos) da dieta AIN93G com a suplementação na água do grupo bebida açucarada (n=9).

Barras representam valores (média \pm desvio padrão) de um grupo; dados representativos de 3 experimentos independentes com pelo menos 8 camundongos em cada grupo; (*) representa a diferença entre os grupos (teste t paramétrico não pareado): * $p=0,0252$ **** $p<0,0001$; (ml) mililitros; (g) gramas; (kcal) quilocalorias.

5.2. O consumo excessivo de carboidratos simples interfere na composição corporal e no metabolismo de camundongos C57BL/6

Ao longo de nove semanas, o ganho de peso corporal dos camundongos foi monitorado e os grupos não apresentaram diferenças significativas em nenhuma das semanas avaliadas (Figura 9 A e B). A análise do músculo gastrocnêmico demonstra que os animais não perderam tecido muscular (Figura 9 C).

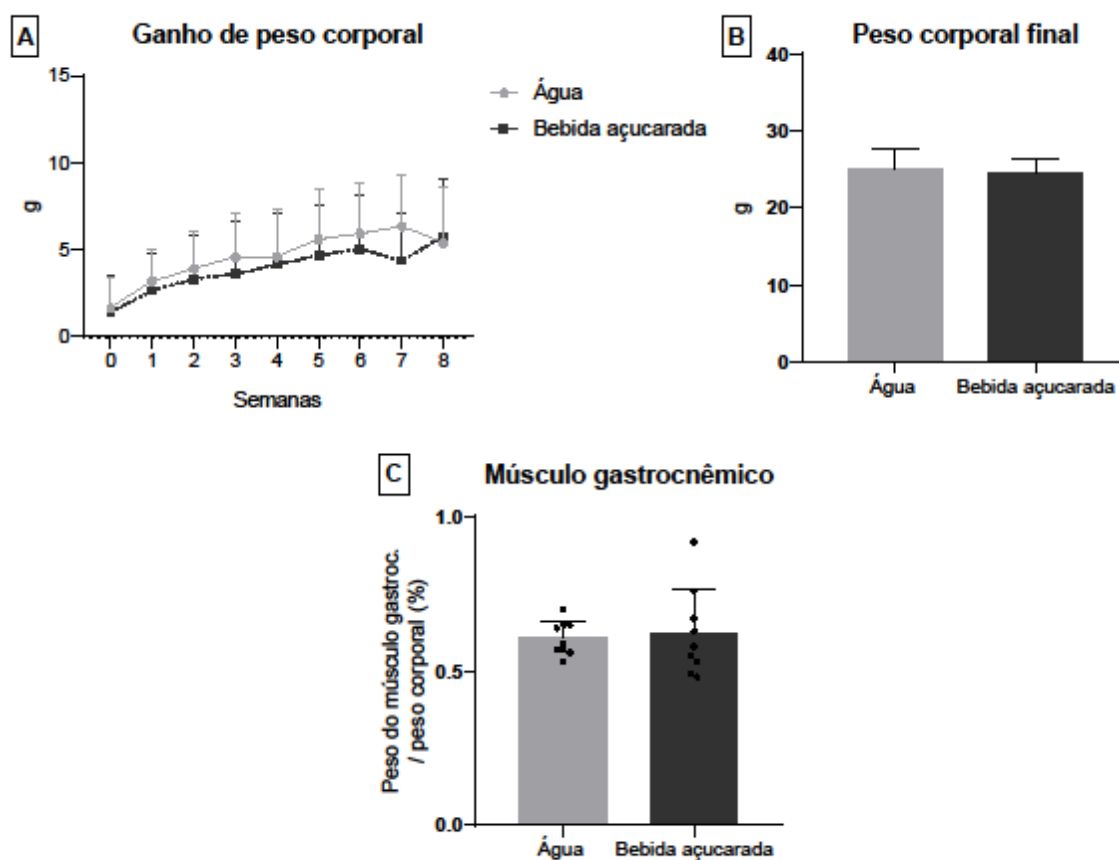


Figura 9: O consumo de bebida açucarada não interfere no ganho de peso corporal e no tecido muscular de camundongos.

(A) Média do ganho de peso corporal de camundongos C57BL/6 tratados com água filtrada (n=30) ou bebida açucarada (n=30) monitorada durante 9 semanas; dados representativos de

3 experimentos independentes com 10 camundongos em cada grupo; o cálculo foi realizado com relação à semana inicial (0).

(B) Média do peso corporal referente à oitava semana de camundongos C57BL/6 que consumiram água filtrada (n=30) ou bebida açucarada (n=30); dados representativos de 3 experimentos independentes com 10 camundongos em cada grupo.

(C) Média da razão entre o peso do músculo gastrocnêmico da perna direita e o peso corporal final de cada animal do grupo água (n=9) e do grupo bebida açucarada (n=9).

Barras representam valores (média \pm desvio padrão) de um grupo; (*) representa a diferença entre os grupos (*Two-way ANOVA*; teste t paramétrico não pareado); (g) gramas; (gastroc) gastrocnêmico.

Simultaneamente, o grupo que recebeu a bebida açucarada apresentou acúmulo substancial de tecido adiposo (TA) avaliado pelo índice de adiposidade quando comparado ao grupo água (Figura 10 A). Ao investigar a frequência de populações linfocitárias TCD4⁺ presentes no TA por citometria de fluxo, descobrimos que o fenótipo celular indica aumento da inflamação local no órgão. Foi identificado redução na frequência de células T_H1, junto à redução de linfócitos T reguladores FoxP3⁺ e ao aumento de T_H17 (Figura 10 B) no grupo que consumiu a bebida açucarada comparado ao grupo que consumiu água.

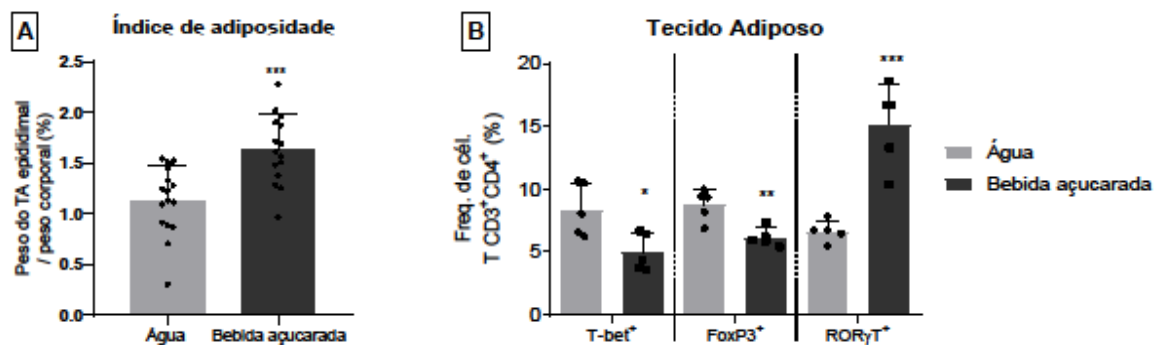


Figura 10: A alteração no perfil celular no tecido adiposo epididimal indica a presença de inflamação tecidual provocada pelo consumo excessivo de glicose e frutose.

(A) Índice de adiposidade é expresso pelo peso do tecido adiposo (TA) epididimal/peso corporal final de cada animal do grupo água (n=16) e do grupo bebida açucarada (n=15); dados representativos de 2 experimentos independentes.

(B) Média da frequência de linfócitos TCD4⁺ T_H1, T_H17 e T_{reg} definidas pela expressão de T-bet, RORγT, FoxP3, respectivamente, no tecido adiposo epididimal de camundongos C57BL/6 FoxP3⁺-GFP-*knock-in* que consumiram água (n=5) ou bebida açucarada (n=5) por 8 semanas. Barras representam valores (média \pm desvio padrão) de um grupo; (*) representa a diferença entre os grupos (teste t pareado paramétrico e não paramétrico): *p= 0,0166; **p=0,0038; (A) ***p= 0,0003; (B) ***p=0,0005.

Os níveis de glicose sanguínea de jejum apresentaram uma instabilidade durante o experimento e foi observado hiperglicemia na última semana avaliada no grupo bebida açucarada em relação ao grupo controle (Figura 11 A). Uma vez que

não foi observado aumento de peso e níveis glicêmicos relacionados à diabetes, ou seja, valores acima de 200mg/dL, que são características clássicas da obesidade, o próximo passo foi investigar outras características que também pudessem evidenciar a síndrome metabólica devido ao excesso de consumo de carboidratos simples.

O consumo de bebida açucarada aumentou o metabolismo de glicose quando comparada ao grupo controle, representado pelo aumento dos níveis de glicemia pós-prandial (Figura 11 B), aumento da glicosúria pós-prandial e de jejum (Figura 11 C), bem como aumento da hemoglobina glicada (Figura 11 D), apesar de não haver alterações na produção de insulina (Figura 11 E).

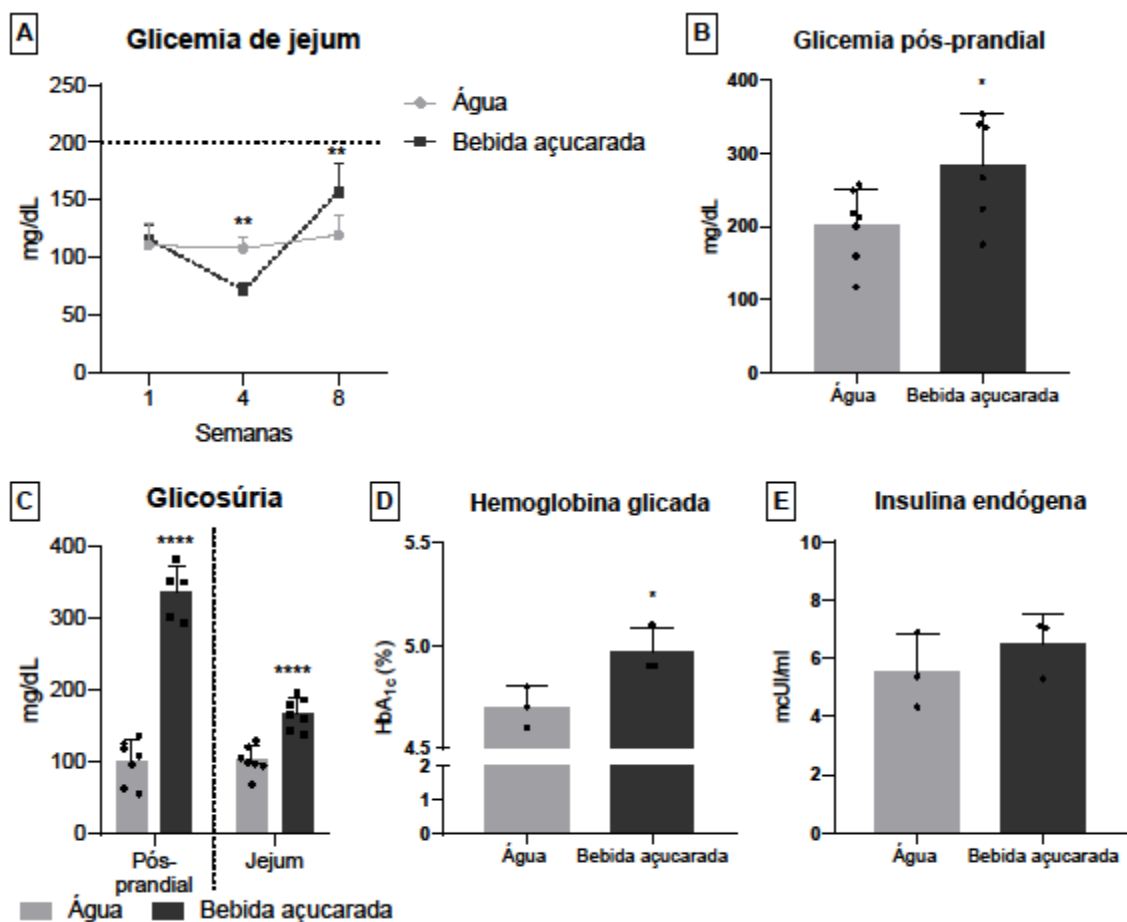


Figura 11: O consumo excessivo de glicose e frutose interfere no perfil glicêmico de camundongos C57BL/6.

(A) Média dos níveis séricos de glicose em jejum mensurados por glicemia capilar nas semanas 1, 4 e 8 dos animais que consumiram água (n=7) ou bebida açucarada (n=7).

(B) Média da concentração sérica de glicose pós-prandial medida por reação enzimática dos grupos água (n=7) e bebida açucarada (n=6); *p=0,0375.

(C) Glicosúria representada pela média de glicose na urina pós-prandial e de jejum medida com glicosímetro dos animais que receberam água (n=7) ou bebida açucarada (pós-prandial n=5; jejum n=7).

(D) Representação gráfica da medida de hemoglobina glicada de jejum (n=3); *p=0,039.

(E) Representação gráfica da média de níveis séricos da insulina endógena de jejum (n=3).

Barras representam valores (média \pm desvio padrão) de um grupo; (*) representa a diferença entre os grupos (*Two-way* ANOVA, teste t paramétrico não pareado): ** $p=0,0013$; ** $p=0,0096$; **** $p<0,000194$; **** $p<0,0001$; (mg/dL) miligramas por decilitro; (HbA_{1c}) subtipo 1c da forma glicada da hemoglobina A; (mcUI/ml) microunidade internacional por mililitros.

Além disso, alterações no perfil lipídico também foram identificadas. Houve redução nos níveis de HDL e LDL e aumento do n-HDL pós-prandial (Figura 12 A), aumento do colesterol total e n-HDL de jejum (Figura 12 B). Já é descrito na literatura que aumentar a ingestão de carboidratos eleva os níveis de triglicérides devido ao acúmulo de gordura (LAMBERTZ et al., 2017), sendo assim, foi observado aumento desse metabólito na análise pós-prandial (Figura 12 C).

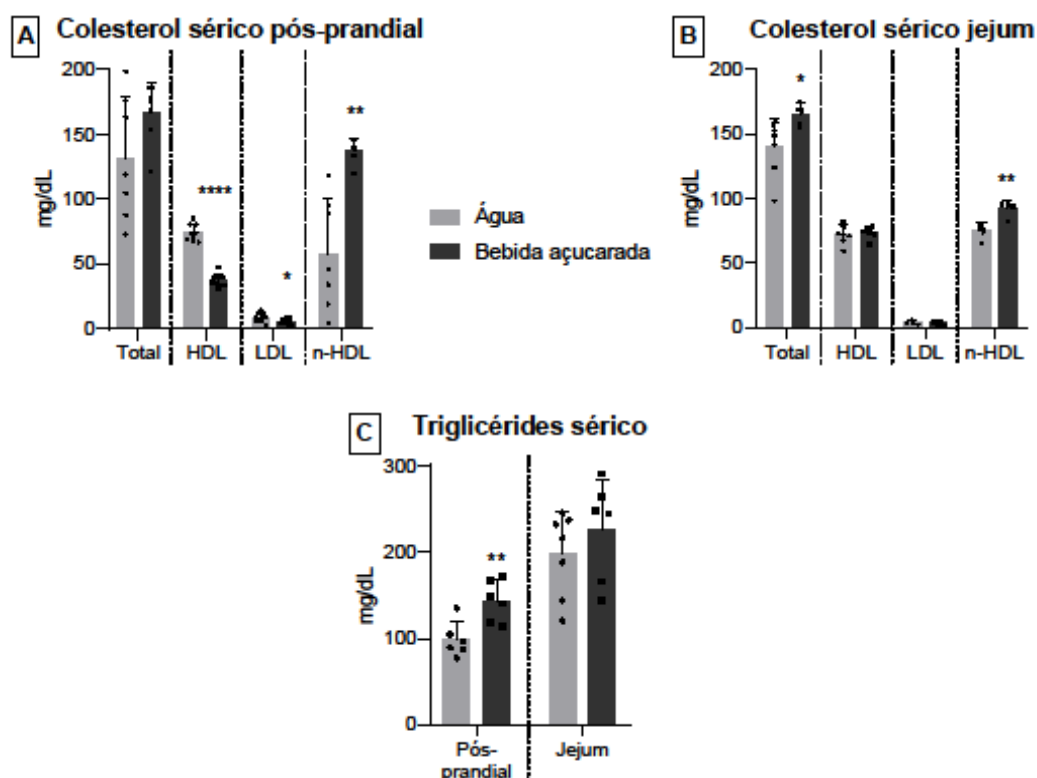


Figura 12: Camundongos C57BL/6 tratados com bebida açucarada apresentam alterações no perfil de lipídeos séricos.

(A) Média da concentração sérica medida por reação enzimática de colesterol total, HDL, LDL e cálculo de n-HDL pós-prandial dos grupos água e bebida açucarada; (n=9); * $p=0,05$.

(B) Média da concentração sérica medida por reação enzimática de colesterol total, HDL, LDL e cálculo de n-HDL de jejum dos grupos água (n=7) e bebida açucarada (n=6); * $p=0,0385$.

(C) Média dos níveis séricos de triglicérides pós-prandial e de jejum medida por reação enzimática (n=6).

Barras representam valores (média \pm desvio padrão) de um grupo (n = 9); (*) representa a diferença entre os grupos (teste t paramétrico não pareado): ** $p=0,0058$; **** $p<0,0001$; (mg/dL) miligramas por decilitro.

5.3. A ingestão de bebida açucarada interfere na mucosa do intestino delgado, provoca degeneração hepática e a inflamação do tecido adiposo epididimal

Sabendo que o intestino delgado é o principal local de absorção de carboidratos, resolveu-se avaliar se havia alterações na estrutura da mucosa intestinal decorrente da ingestão de bebida açucarada. Ao analisar a permeabilidade intestinal não foi observado alterações significativas (Figura 13). Na avaliação da estrutura das vilosidades do duodeno e jejuno, não foi possível identificar alterações em decorrência do consumo de bebida açucarada (Figura 14 A, 14 B, 14 D e 14 E). Porém, a análise histológica deste tecido mostrou que o consumo de bebida açucarada provoca o achatamento dos vilos do íleo (Figura 14 G). Além disso, o número de células caliciformes, que são produtoras de muco (indicadas pelas setas na Figura 14 A - F) da porção mais distal do intestino delgado estava reduzido nos animais tratados com a bebida açucarada quando comparados ao grupo água (Figura 14 H). Estes dados indicam que há uma possível inflamação do íleo.

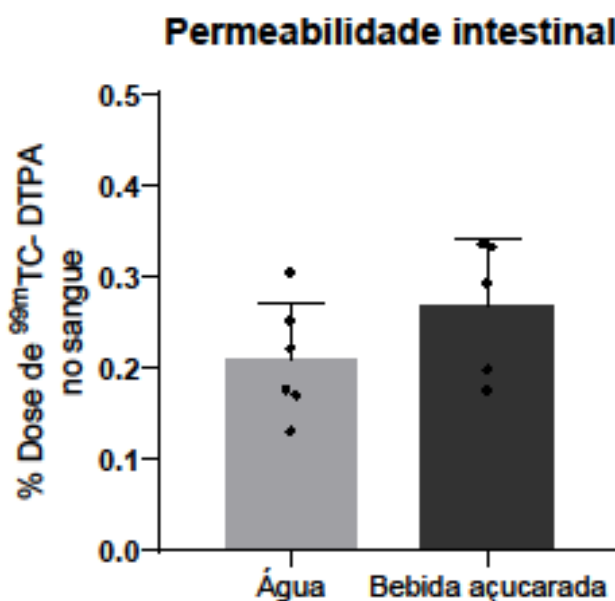


Figura 13: Avaliação da permeabilidade intestinal.

Concentração plasmática de ^{99m}Tc-DTPA em camundongos C57BL/6 tratados por 8 semanas com água filtrada ou bebida açucarada. Barras representam valores (média ± desvio padrão) de um grupo (n=6); (^{99m}Tc) 99 m-tecnécio; (DTPA) dietilenotriaminopentacético.

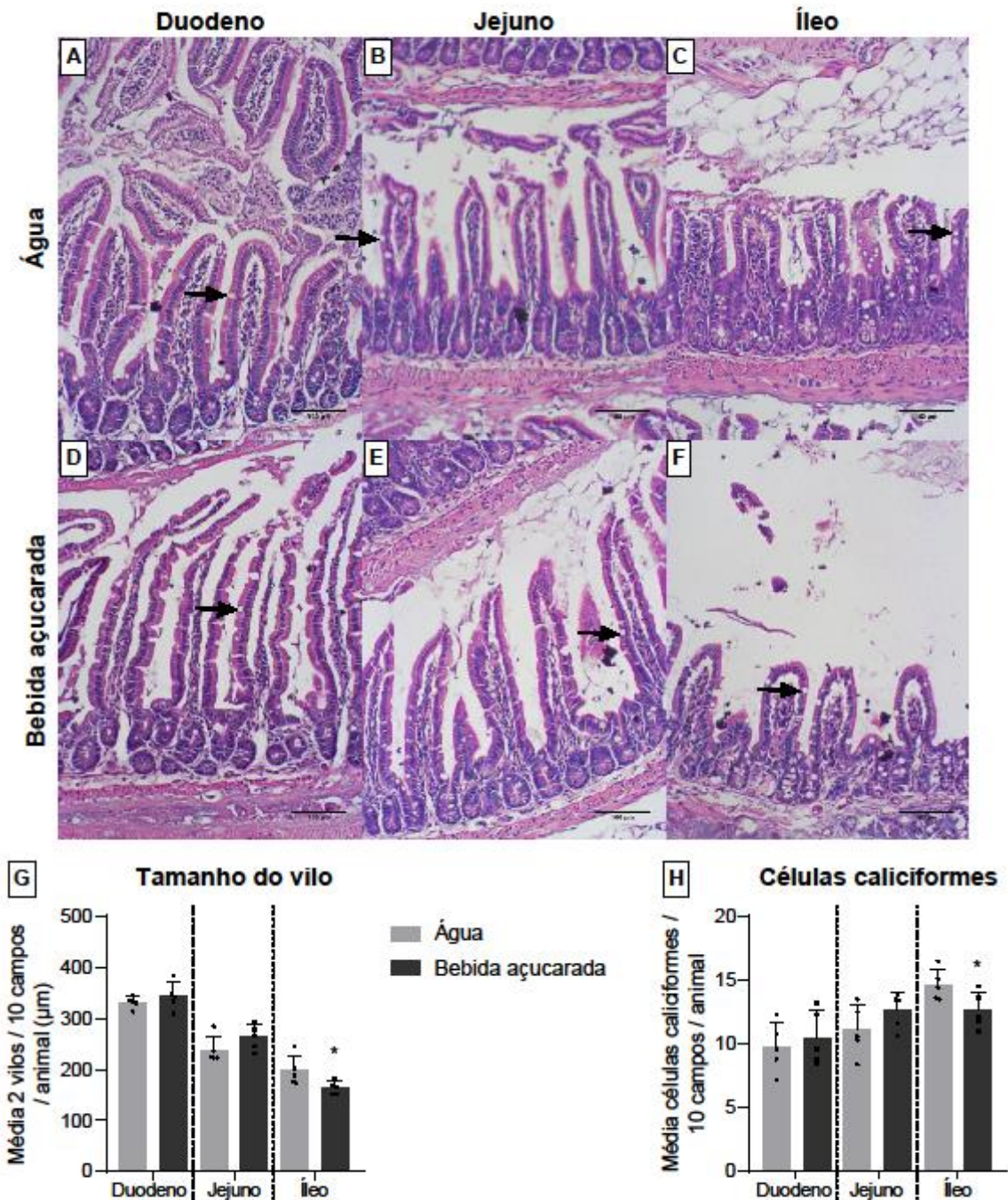


Figura 14: O excesso de consumo de glicose e frutose provoca achatamento de vilos e redução do número de células caliciforme na porção mais distal do intestino delgado.

(A-C) Fotomicrografias de lâminas histológicas coradas com HE obtidas em aumento de 100x representando a morfologia das vilosidades do duodeno, jejuno e íleo e as células caliciformes (setas) de camundongos C57BL/6 tratados com água filtrada.

(D-F) Fotomicrografias de lâminas histológicas coradas com HE obtidas em aumento de 100x representando a morfologia das vilosidades do duodeno, jejuno e íleo e as células caliciformes (setas) de camundongos C57BL/6 tratados com bebida açucarada.

(G) Média do comprimento dos vilos avaliados, morfometria feita a partir da medida de 2 vilos íntegros em 10 secções histológicas de cada animal (20 vilos por animal); *p=0,05.

(H) Representação gráfica da quantificação média de todas as células caliciformes no duodeno, jejuno e íleo em 10 secções histológicas de cada animal; *p=0,0432.

Barras representam valores (média \pm desvio padrão) de um grupo (n=5); (*) representa a diferença entre os grupos (teste t paramétrico não pareado); (μm) micrômetros.

Considerando que o excesso de glicose e frutose sobrecarrega a capacidade metabólica intestinal e aumenta a quantidade transportada para o fígado (ANDRES-HERNANDO et al., 2020), foi possível identificar aumento do número de vacúolos citoplasmáticos (indicados pelas setas na Figura 15 A – B) nas fotomicrografias histológicas do tecido hepático que indicam a presença de degeneração hepática (esteatose) (Figura 15 C) no grupo que recebeu a bebida açucarada em relação ao controle.

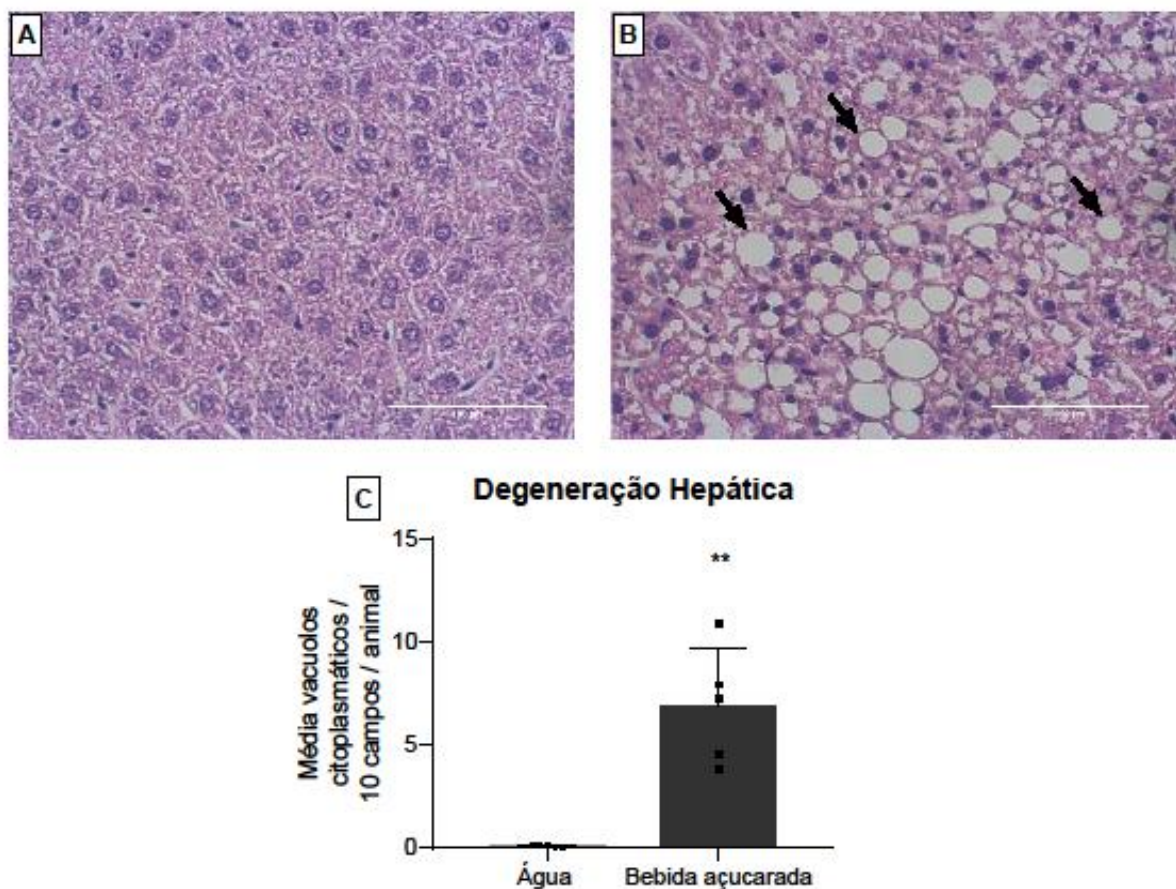


Figura 15: Aumento de vacúolos citoplasmáticos indica degeneração hepática em camundongos que consomem bebida açucarada.

(A-B) Fotomicrografias de lâminas histológicas coradas com HE obtidas em aumento de 200x representando o tecido hepático e os vacúolos citoplasmáticos (setas) de camundongos C57BL/6 tratados com água filtrada (à esquerda) ou bebida açucarada (à direita).

(C) Representação gráfica da quantificação média de vacúolos citoplasmáticos em 10 secções histológicas do fígado de cada animal.

Barras representam valores (média \pm desvio padrão) de um grupo (n=5); (*) representa a diferença entre os grupos (teste t não paramétrico): *p=0,0079; (μm) micrômetros.

Outro resultado que contribui para a confirmação da síndrome metabólica neste modelo é a hipertrofia dos adipócitos identificada pelo aumento do diâmetro (Figura 16 C) e aumento da infiltração celular (Figura 16 D) caracterizada pela formação de ETCs (indicadas pelas setas na Figura 16 B), constituída por leucócitos que circundam as células do tecido adiposo.

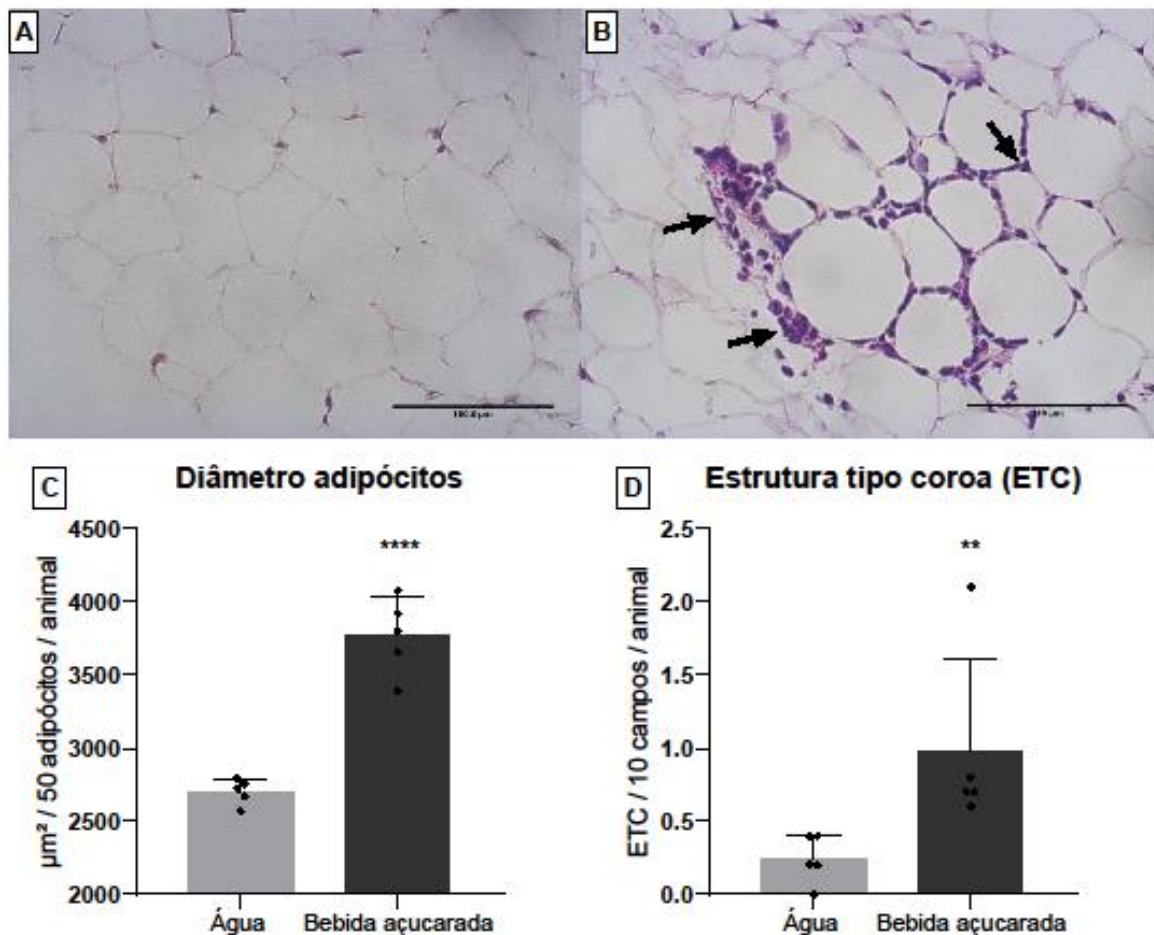


Figura 16: Quantidades elevadas de carboidratos simples provocam hipertrofia de adipócitos e aumentam o infiltrado celular no tecido adiposo.

(A-B) Fotomicrografias de lâminas histológicas coradas com HE obtidas em aumento de 200x representando o tecido adiposo e estruturas do tipo coroa (ETC) (setas) de camundongos C57BL/6 tratados com água filtrada (à esquerda) ou bebida açucarada (à direita).

(C) Representação gráfica da média da área de 50 adipócitos por animal.

(D) Média da quantificação de ETC em 10 secções histológicas do tecido adiposo de cada animal.

Barras representam valores (média \pm desvio padrão) de um grupo (n=5); (*) representa a diferença entre os grupos (teste t pareado paramétrico e não paramétrico): **p=0,0079; ****p<0,0001; (µm²) micrômetros ao quadrado.

Sendo assim, os resultados até aqui apresentados evidenciam que o consumo excessivo de carboidratos simples provoca síndrome metabólica e interfere na arquitetura da porção distal do intestino delgado.

5.4. O consumo de glicose e frutose em doses excessivas modifica o perfil celular do baço

Para investigar se o tratamento com a bebida açucarada provoca alterações no perfil de células TCD4⁺ presentes no baço, utilizamos a citometria de fluxo para analisar a frequência de populações linfocitárias nos órgãos de interesse. As células ROR γ T⁺ estão em maior frequência no baço de camundongos que consumiram a bebida açucarada quando comparado ao grupo controle (Figura 17).

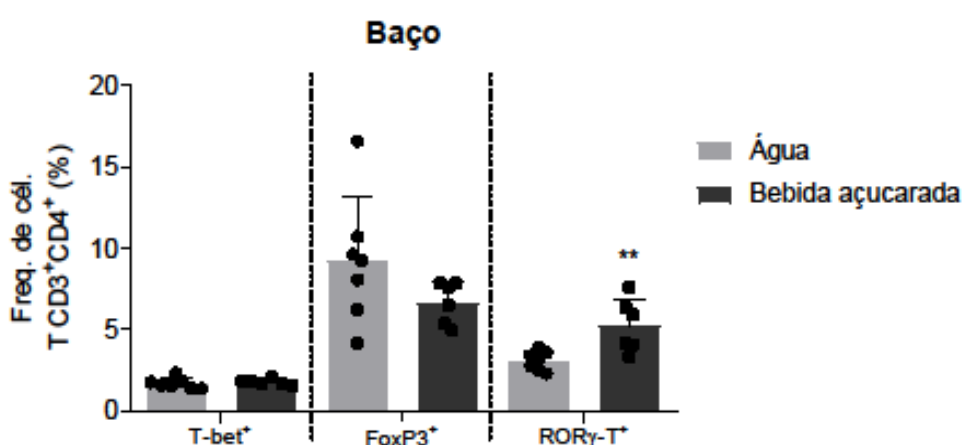


Figura 17: Frequência de células TCD4⁺ no baço de camundongos C57BL/6 tratados com água ou bebida açucarada.

Média da frequência de populações de células TCD4⁺ T_{H1}, T_{H17} e T_{reg} definidas pela expressão de T-bet, ROR γ T, FoxP3, respectivamente, no baço de camundongos C57BL/6 FoxP3⁺-GFP-*knock-in* que ingeriram água (n=7) ou bebida açucarada (n=6) por 8 semanas. Barras representam valores (média \pm desvio padrão) de um grupo; (*) representa a diferença entre os grupos (teste t pareado paramétrico e não paramétrico): **p=0,0081.

5.5. As populações de células TCD4⁺ nos linfonodos mesentéricos estão alteradas após o consumo de bebida açucarada

Considerando, então, que o intestino é a primeira área de contato e sítio de absorção de nutrientes, o próximo passo foi investigar como as alterações provocadas pela síndrome metabólica no modelo proposto pela ingestão de bebida açucarada, poderia interferir no sistema imune associado à mucosa intestinal. Nesse contexto, a microbiota e antígenos da dieta são estímulos importantes para o sistema imune, pois as células dendríticas da lâmina própria capturam esses antígenos do lúmen e migram para os linfonodos mesentéricos responsáveis por drenar partes específicas do intestino e induzem a diferenciação de células T *naive* em células reguladoras, T_{H1},

T_H2 ou T_H17 de acordo com o estímulo (FARIA; REIS; MUCIDA, 2017). A análise mais refinada do perfil celular nos linfonodos mesentéricos compartimentalizados mostrou que há aumento na frequência de células T_H1 (Figura 18 A) e T_H17 (Figura 18 B), redução de T_{reg} Foxp3⁺ (Figura 18 C). Ainda que o linfonodo duodenal apresente aumento na frequência de células do perfil T_H1 , as alterações estão mais frequentes na porção distal do intestino delgado, corroborando com as alterações histológicas observadas no íleo que, em conjunto, indicam uma possível inflamação nesta região.

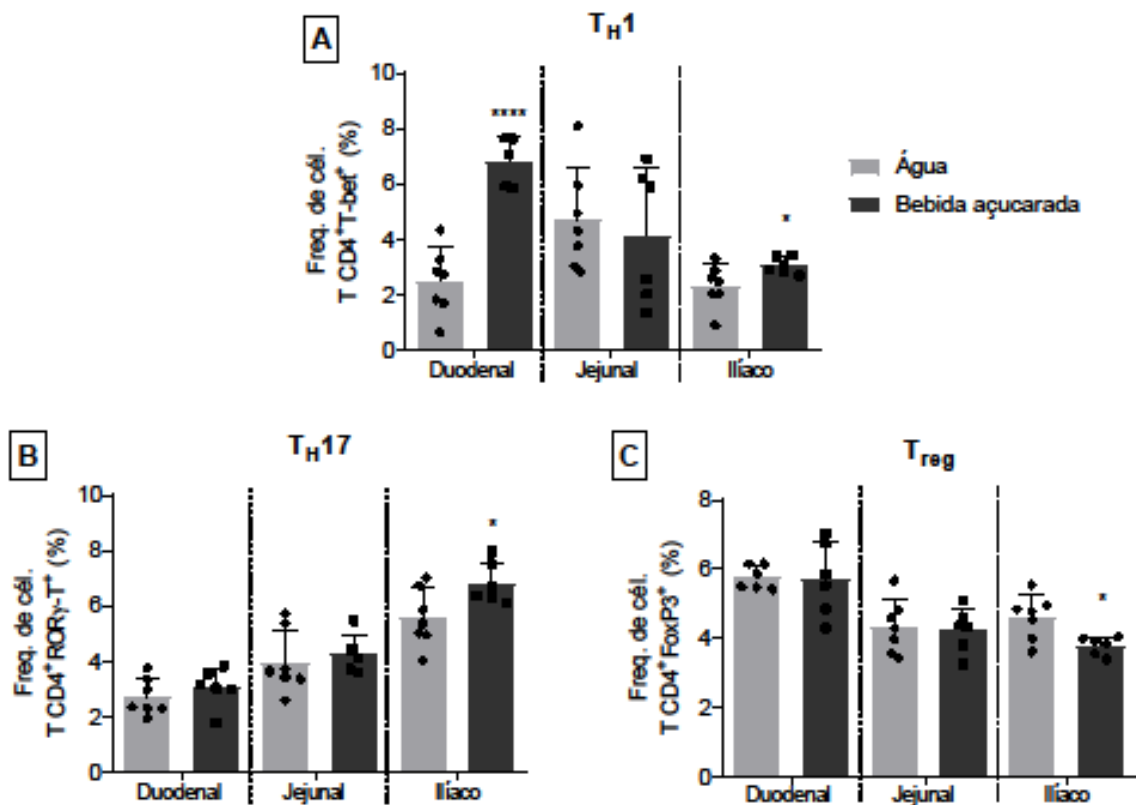


Figura 18: Frequência de células TCD4⁺ nos linfonodos drenantes do intestino delgado de camundongos C57BL/6 que consumiram água ou bebida açucarada.

(A, B e C) Média da frequência de populações de células TCD4⁺ T_H1 , T_H17 e T_{reg} definidas pela expressão de Tbet, RORγT, FoxP3, respectivamente, nos linfonodos responsáveis por drenar partes específicas do intestino delgado (duodenal, jejunal e íliaco) de camundongos C57BL/6 FoxP3⁺-GFP-*knock-in* que consumiram água (n=7) ou bebida açucarada (n=6) por 8 semanas.

Barras representam valores (média ± desvio padrão) de um grupo; (*) representa a diferença entre os grupos (teste t pareado paramétrico e não paramétrico): A (*p=0,05); B (*p=0,0341); C (*p=0,0134); ****p<0,0001.

5.6. O consumo de bebida açucarada não interferiu na dinâmica da mucosite desencadeada por 5-FU

Uma vez que foi identificado alterações relevantes na porção distal do intestino delgado, utilizou-se o modelo de mucosite experimental para verificar se a ingestão de quantidades elevadas de glicose e frutose poderiam agravar a inflamação intestinal. Sendo assim, observamos que os animais com mucosite perderam peso (Figura 19 A), aumentaram a permeabilidade intestinal (Figura 19 B) e a atividade de MPO (Figura 19 C) quando comparados aos animais dos grupos controles, sem mucosite. Porém, não foram identificadas alterações significativas entre o grupo que recebeu bebida açucarada em relação ao grupo água, provavelmente devido à dose e à agressividade do fármaco utilizado para induzir a mucosite (GENEROSO et al., 2015; MAIOLI et al., 2014).

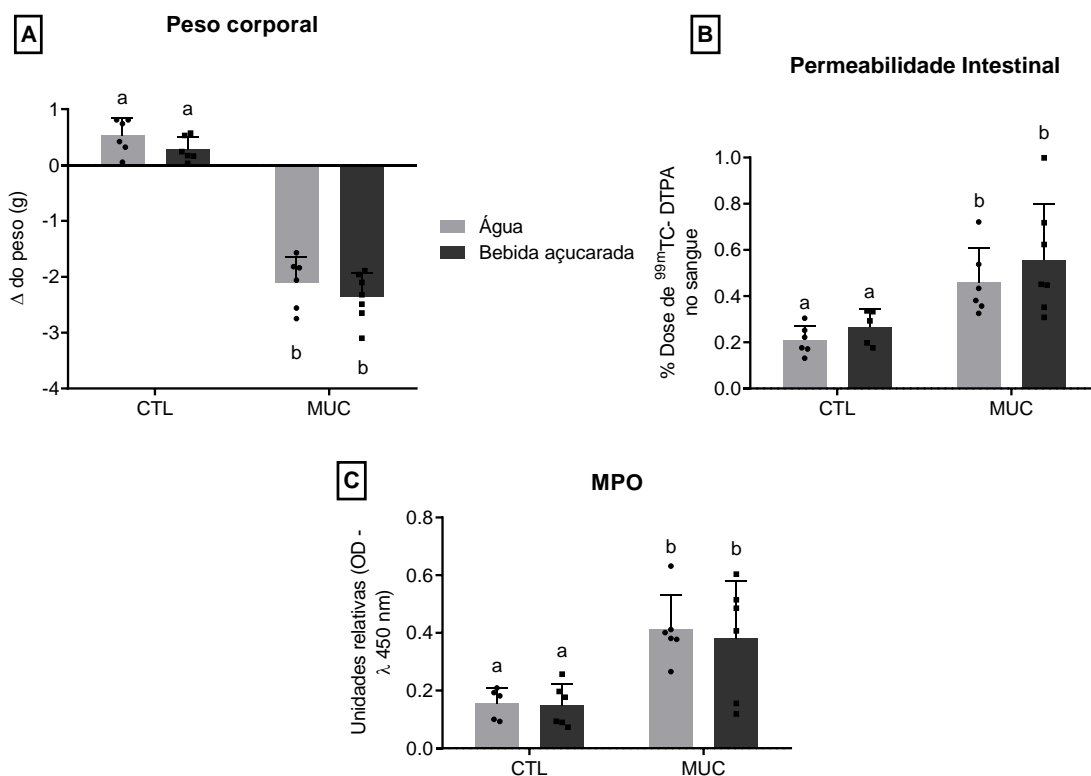


Figura 19: O consumo de bebida açucarada não interfere na resposta de camundongos C57BL/6 à mucosite induzida por 5-FU.

(A) Média da diferença (Δ) do peso corporal de camundongos C57BL/6 tratados com água filtrada ou bebida açucarada após 72 horas da administração de 5-FU (MUC) ou salina (CTL); o cálculo foi realizado com relação ao tempo inicial; $p < 0,0001$.

(B) Concentração plasmática de ^{99m}Tc-DTPA em camundongos tratados com água filtrada ou bebida açucarada após 3 dias da administração intraperitoneal de 5-FU (MUC) ou salina (CTL); $p = 0,0005$.

(C) Média da densidade óptica (OD) do teste enzimático de mieloperoxidase (MPO) utilizado para avaliar a atividade neutrofílica no íleo de camundongos tratados com água filtrada ou bebida açucarada após 3 dias da administração intraperitoneal de 5-FU (MUC) ou salina (CTL); $p=0,0002$.

Barras representam valores (média \pm desvio padrão) de um grupo ($n=6$); letras representam as diferenças entre os grupos (*Two-way ANOVA*); (^{99m}Tc) 99 m-tecnécio; (DTPA) dietilenotriaminopentacético.

6. DISCUSSÃO

A glicose e a frutose são frequentemente consumidas de modo simultâneo, seja como monossacarídeo ou dissacarídeo, portanto, uma abordagem que reflita a realidade do consumo de bebidas açucaradas com sacarose ou glicose e frutose torna-se clinicamente relevante. Um estudo realizado com indivíduos adultos mostrou que o consumo de bebida açucarada estava presente em aproximadamente 28% dos avaliados e foi associado com maus hábitos alimentares e a insatisfação com o peso (SILVA et al., 2019). Além disso, indivíduos com sobrepeso ou obesos que consumiram 25% da necessidade energética em bebidas açucaradas com glicose ou frutose desenvolveram a hipertrigliceridemia pós-prandial e acúmulo de gordura visceral (STANHOPE et al., 2009).

Em nosso estudo, observamos que disponibilizar glicose e frutose na água dos camundongos aumentou o consumo de líquido de maneira suficiente para elevar o consumo calórico total, mesmo com redução da ingestão da dieta. Bray, Nielsen e Popkin (2004) descreveram que o desejo pela bebida açucarada reduz a ingestão de alimentos sólidos em roedores, mas não impede o equilíbrio calórico positivo e o desenvolvimento progressivo de características da síndrome metabólica. Quando a frutose foi ofertada em 30% da água de camundongos C57BL/6 a ingestão de dieta diminuiu consideravelmente (VOLYNETS et al., 2017). Além disso, Andres-Hernando e colaboradores (2020) observaram que adicionar glicose à solução de frutose aumenta o consumo de líquidos, bem como a absorção de frutose e a ingestão calórica.

Os animais que consumiram bebida açucarada não apresentaram elevação no peso corporal quando comparados ao grupo água, mesmo com aumento na densidade energética consumida. Um estudo que utilizou água ou bebida adoçada com 10% de sacarose também não identificou diferença de peso entre os grupos após 70 dias de consumo por camundongos (JÜRGENS et al., 2005). De forma similar, camundongos que consumiram 15 ou 30% de frutose na água também não apresentaram diferença no ganho de peso corporal na oitava semana de consumo quando comparados ao grupo que ingeriu apenas água (ISHIMOTO et al., 2012). Porém, frutose é capaz de induzir características da síndrome metabólica independente de alterações no peso (STANHOPE et al., 2009). Sendo assim, foi possível verificar alterações no perfil glicêmico e lipídico compatíveis com a síndrome

metabólica em camundongos C57BL/6 após a ingestão de glicose e frutose por 8 semanas. Nossos dados estão em acordo com outras pesquisas que utilizaram protocolos similares, bem como o aumento de glicemia de jejum, dos níveis de triglicérides e colesterol séricos pós-prandiais (ANDRES-HERNANDO et al., 2020; GONCALVES et al., 2019; ISHIMOTO et al., 2012). Além disso, a glicosúria e a elevação na concentração de hemoglobina glicada também já foram reportadas anteriormente (LANASPA et al., 2013; PATEL et al., 2015).

A elevação nos níveis de glicose sérica pós-prandial no grupo bebida açucarada está relacionada ao índice glicêmico que, por sua vez, varia de acordo com a digestibilidade do carboidrato. Nesse contexto, os carboidratos simples geram respostas pós-prandiais de glicose e insulina maiores e mais rápidas em relação aos carboidratos complexos que, por sua vez, fornecem um fluxo contínuo de glicose plasmática pós-prandial (LANASPA et al., 2013). Alimentos com alto índice glicêmico elevam a glicemia, provocam a produção excessiva de insulina e, logo em seguida, ocorre a hipoglicemia. Eventos como este podem sobrecarregar a capacidade pancreática e favorecer o desenvolvimento de diabetes tipo 2 (MUSA; MARANGON, 2012).

Interessantemente, o trabalho de Andres-Hernando e colaboradores (2020) permitiu esclarecer o papel da frutose e da glicose, bem como distinguir a ação do intestino e do fígado na indução de síndrome metabólica. Para isso, glicose e frutose foram administradas na água de camundongos C57BL/6 *knockout* (KO) para frutoquinase (KHK), enzima responsável pela fosforilação da frutose. Os resultados revelam que o metabolismo intestinal da frutose pode proteger o organismo da síndrome metabólica ao impedir que grandes quantidades deste carboidrato alcancem o fígado, além de contribuir para o controle da ingestão de bebida açucarada (ANDRES-HERNANDO et al., 2020; JANG et al., 2018). Ao passo que o bloqueio da enzima KHK hepática impede o desenvolvimento da síndrome metabólica induzida por glicose e frutose, indicando que é uma condição impulsionada pela frutose nos hepatócitos.

Considerando a relevância intestinal no metabolismo de carboidratos, buscamos compreender melhor como este processo no intestino delgado interfere no sistema imune de mucosa. Os dados apresentados em nosso modelo de bebida açucarada evidenciaram alterações histológicas no íleo, como o achatamento dos vilos e redução do número de células caliciformes, bem como alterações na frequência

de linfócitos especificamente no linfonodo drenante dessa porção. Sendo assim, nossos resultados sugerem que a quantidade excessiva de açúcares excede a capacidade absorviva intestinal e se torna um fator de estresse, aumentando a quantidade de carboidratos nas porções mais distais do intestino delgado. A área de absorção de nutrientes diminui ao longo do intestino delgado. Porém, pode diminuir ainda mais em situações de inflamação intestinal que leva ao achatamento do vilão na região do íleo, especificamente, como foi reportada em pesquisas sobre a inflamação intestinal em modelos de mucosite em camundongos BALB/c (GENEROSO et al., 2015) e em ratos Wistar (SOARES et al., 2008).

As células caliciformes do epitélio intestinal, por sua vez, contribuem para a homeostase da mucosa, pois possuem como principal função gerar uma camada protetora de muco, de modo que sua disfunção também está ligada à doença inflamatória intestinal (GONZALEZ-PEREZ et al., 2021). De maneira similar aos resultados que apresentamos relacionados à redução de células caliciformes no íleo, a dieta rica em sal aumentou o escore histológico de alterações da mucosa intestinal de camundongos, envolvendo, inclusive, a depleção de células caliciformes no cólon (AGUIAR et al., 2018), região do intestino grosso seguinte ao íleo. Além disso, algumas doenças inflamatórias intestinais, como a colite e a doença de Crohn, apresentam redução no número de células caliciformes. Uma pesquisa realizada com pacientes submetidos à colonoscopia identificou a depleção de células caliciformes, através da contagem de vacúolos nas análises histológicas do tecido colônico, em indivíduos com colite ulcerativa ou doença de Crohn (GERSEMANN et al., 2009).

Alguns trabalhos na literatura sugerem a possibilidade de absorção de carboidratos em excesso nas porções distais no intestino delgado, pois os refrigerantes com sacarose ou HFCS fornecem alto teor de monossacarídeos ao intestino. Jang e colaboradores (2018) demonstraram que o jejuno é a principal porção responsável por metabolizar ativamente doses fisiológicas de frutose dietética em glicose e ácidos orgânicos (lactato, glicerato, por exemplo), enquanto transporta de modo passivo a glicose para a circulação portal. Porém, a ingestão excessiva de açúcares por camundongos C57BL/6 saturou a absorção e o catabolismo intestinal desses carboidratos, e aumentou a quantidade de frutose na circulação portal (JANG et al., 2018). Bloquear a atividade de frutoquinase no jejuno de camundongos expostos a glicose e frutose não impediu o desenvolvimento da síndrome metabólica

mesmo com a menor expressão de GLUT5 neste segmento (ANDRES-HERNANDO et al., 2020).

Corroborando nossos resultados, a hipótese de que a saturação da gliconeogênese intestinal devido à ingestão elevada de açúcares aumenta a passagem direta e a absorção de frutose em porções distais do intestino delgado também pode ser apoiada por alterações na expressão de transportadores de açúcares. A frutose induz o aumento na expressão de genes envolvidos no transporte de açúcares, como o GLUT5 no intestino delgado (JANG et al., 2018), já a sacarose líquida, além de elevar a ingestão em camundongos, regula positivamente os transportadores de glicose GLUT2 e GLUT5 no íleo (RITZE et al., 2014). Em contraste, camundongos KO para o transportador de frutose GLUT5 no jejuno e que foram alimentados com dieta rica em frutose apresentaram má absorção e resultou na maior entrega deste nutriente ao cólon (BARONE et al., 2009), onde se encontra grande concentração da microbiota.

Existe a possibilidade de que a inflamação ilíaca relacionada ao achatamento dos vilos e redução de células produtoras de muco após o consumo de bebida açucarada esteja envolvida com o aumento da concentração da microbiota nesta região, considerando que as bactérias comensais utilizam componentes do muco para produzir metabólitos. A interação microbiota intestinal e hospedeiro envolvem o controle do metabolismo energético, pois o reconhecimento de fragmentos bacterianos por células especializadas é necessário para induzir a inflamação (JONES et al., 2021). Ser capaz de metabolizar polissacarídeos é uma importante característica da microbiota que fornece uma grande variedade de metabólitos, como os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), essenciais para a população microbiana e para a manutenção da homeostase intestinal (JANG et al., 2018). Este processo induz efeitos fisiológicos na própria microbiota intestinal e medeia a inflamação crônica, afetando a homeostase da glicose e a sensibilidade à insulina (ANG; DING, 2016; LAMBERTZ et al., 2017).

O excesso de frutose, por exemplo, além de influenciar a composição microbiana e alterar a composição de AGCC, pode induzir a toxicidade hepática, entretanto, é possível que a microbiota intestinal converta a frutose em metabólitos que afetam o fígado (JANG et al., 2018). Foi demonstrado que a frutose desenvolve uma resposta pró-inflamatória em fagócitos mononucleares devido à flexibilidade metabólica. Transportar e metabolizar a frutose do meio via GLUT5 por monócitos

estimulados por LPS reduziu a taxa glicolítica e elevou os níveis de citocinas inflamatórias, como IL-1 β , IL-10 e TNF, quando comparado ao meio enriquecido com glicose (JONES et al., 2021). Além disso, Jones e colaboradores (2021) demonstraram que disponibilizar soluções contendo 10% de glicose ou glicose e frutose para camundongos e desafiá-los com LPS após 2 semanas foi suficiente para aumentar níveis séricos de IL-1 β em animais expostos à frutose.

A ingestão de carboidratos simples por camundongos C57BL/6 durante 8 semanas não foi suficiente para alterar a permeabilidade intestinal, porém Volynets e colaboradores (2017), descrevem que o aumento na permeabilidade intestinal em camundongos que beberam solução de frutose foi evidenciado apenas em associação com dieta rica em lipídeos e açúcar (VOLYNETS et al., 2017). A ingestão de sacarose ou frutose por ratos Wistar associada à dieta rica em gordura implicou no aumento da permeabilidade intestinal e desenvolvimento de disbiose. Este cenário favoreceu que concentrações elevadas de LPS estivessem presente no sangue e correlacionado à maior quantidade de gordura corporal, gerando um estado crônico de inflamação (ROSAS-VILLEGAS et al., 2017). As alterações na permeabilidade e na disbiose contribuem para elevar quantidades de LPS no sangue de camundongos que, por sua vez, induz a inflamação do tecido adiposo e a liberação contínua de TNF- α (AMAR et al., 2011; HELSLEY et al., 2020).

Consumir excessivamente carboidratos simples também pode provocar o acúmulo de triglicérides hepáticos, resultando na maior produção de VLDL, desregulando a captação de lipídeos no músculo e nos tecidos periféricos (FERNANDES, 2020). Estas alterações estão em acordo com evidências obtidas em nosso trabalho relacionadas ao aumento de níveis de triglicérides séricos por camundongos que consumiram quantidades elevadas de glicose e frutose. Consistente aos sinais de degeneração hepática identificados na análise histológica, o aumento de vacúolos citoplasmáticos pode estar relacionado ao acúmulo de lipídeos no fígado. Tal processo envolve o mau gerenciamento de níveis de glicose por meio da síntese e degradação de glicogênio, descontrolando a produção de glicose através da gliconeogênese (JANG et al., 2018).

As alterações identificadas no perfil lipídico e glicêmico estão relacionadas ao acúmulo de gordura no tecido adiposo pelo grupo que ingeriu bebida açucarada, confirmadas por meio do aumento do índice de adiposidade, bem como a hipertrofia dos adipócitos e maior infiltrado de leucócitos identificados pelo aumento no número

de ETC na avaliação da histologia. O tecido adiposo também é capaz de metabolizar monossacarídeos e sintetizar ácidos graxos (lipogênese) e glicogênio, porém, a presença simultânea de glicose e frutose aumenta drasticamente este mecanismo e favorece a deposição de lipídeos (FROESCH; GINSBERG, 1962). Outros trabalhos com camundongos que consumiram glicose e frutose em 10 ou 30% da água reportaram o acúmulo de tecido adiposo epididimal e a inflamação adiposa evidenciada por ETC associada à degeneração hepática, frequentemente encontrada na síndrome metabólica (ANDRES-HERNANDO et al., 2020; ISHIMOTO et al., 2012)

A regulação das vias glicolíticas e lipogênicas no fígado e no tecido adiposo é mediada pelo fator de transcrição ChREBP (do inglês, *carbohydrate-responsive element-binding protein*), que é ativado por metabólitos de carboidratos e está associado com doenças metabólicas que incluem distúrbios como a obesidade e doença hepática gordurosa não alcoólica (LEI et al., 2020). Camundongos que consomem dieta rica em frutose demonstraram uma ativação robusta de ChREBP no fígado, associado a maior expressão de enzimas envolvidas na glicólise e lipogênese (KIM et al., 2016). Na ausência de ChREBP, camundongos C57BL/6 alimentados com dieta rica em frutose desenvolveram lesão hepática grave, pois a biossíntese de colesterol desregulada contribuiu para a apoptose de hepatócitos (ZHANG et al., 2017).

Aumentar a frequência de células T_{H17} e reduzir células T_{reg} no tecido adiposo é pertinente a inflamação identificada nas análises histológicas do TA hipertrófico de camundongos que ingeriram excessivamente glicose e frutose em nosso modelo. Sobretudo, as alterações imuno-metabólicas envolvem a quebra na homeostase energética e a inflamação persistente em tecidos metabólicos, como o tecido adiposo e o fígado. Este quadro envolve alterações no perfil de linfócitos T, bem como na produção de algumas citocinas associadas ao estado inflamatório de baixo grau que acompanha a síndrome metabólica (WINER et al., 2009). Os adipócitos hipertrofiados podem apresentar células T_{H1} e T_{H17} que aumentam funções pró-inflamatórias de adipócitos e de macrófagos induzindo a liberação de IL-1- β , IL-6 e TNF- α (WINER et al., 2009). Substituir a sacarose da dieta AIN93G por 20% frutose aumentou as concentrações pós-prandiais de TNF- α e IL-6 no fígado e no tecido adiposo epididimal de camundongos, respectivamente (RODRIGUES et al., 2014).

Administrar glicose e frutose por 8 semanas na água de camundongos aumentou a frequência de células que expressam o fator de transcrição ROR γ T no

baço, no linfonodo responsável por drenar a porção distal do intestino delgado e no TA. As células T_H17 desempenham importante papel na regulação da defesa do organismo contra uma variedade de infecções fúngicas e bacterianas. Considerando as circunstâncias relacionadas ao excesso de carboidratos e a alteração na homeostase energética e intestinal, as células T_H17 podem se apresentar como uma população de células inflamatórias autor-reativas e agravar o quadro de doenças autoimunes (ATARASHI; TANOUE; HONDA, 2010).

Observamos nos animais que consumiram a bebida adoçada com açúcares simples a redução da frequência de células T_{reg} no tecido adiposo epididimal e no intestino. De maneira similar aos resultados encontrados em nosso estudo, camundongos C57BL/6 que desenvolvem obesidade após o consumo de dieta rica em gordura e açúcar simples reduziram a frequência de células T_{reg} no tecido adiposo epididimal acompanhado por níveis menores de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- β (MAIOLI et al., 2016).

No que se refere à frequência de células T_{reg} FoxP3⁺ e T_H17 ROR γ T⁺ nos MLNs, é bem definido que as porções anteriores apresentam mais células reguladoras e que as mais distais apresentam características menos reguladoras (ESTERHÁZY et al., 2019). Os dados obtidos no nosso estudo, foi verificado que a ingestão de bebida açucarada aumentou a frequência de células ROR γ t no íleo, e que isso pode estar relacionado a maior inflamação. Neste sentido, foi demonstrado por Zhang e colaboradores (2019), que a ingestão excessiva de glicose promove a diferenciação de células T_H17 nos linfonodos mesentéricos de camundongos por um mecanismo que envolveu o estresse oxidativo induzido pelos altos níveis de glicose, aumentando a produção mitocondrial de espécies reativas de oxigênio em células T. Esse processo foi a chave para ativar TGF- β e, na presença de IL-6, induzir a diferenciação de células T_H17 , exacerbando a autoimunidade em modelos animais de colite e esclerose múltipla (ZHANG et al., 2019).

A mucosite torna-se um modelo relevante de doença para estudar a susceptibilidade a doenças intestinais após o consumo excessivo de carboidratos levando em consideração a descoberta de alterações inflamatórias no íleo, já que a mucosite induzida por 5-FU inflama principalmente a região do íleo. Após testar se o consumo de bebida açucarada pioraria a mucosite, não observamos diferenças entre os camundongos que consumiram bebida açucarada quando comparados ao grupo que ingeriu apenas água. Possivelmente, estas observações se devem a dose alta de

5-FU utilizada para induzir a doença, ponderando a existência da inflamação ílica decorrente da ingestão excessiva de carboidratos. Ainda assim, nossos resultados relacionados à perda de peso, aumento da permeabilidade intestinal e da atividade de MPO em camundongos com mucosite, independente do consumo de carboidratos simples, estão em acordo com outros trabalhos que utilizaram o modelo de 5-FU para induzir a mucosite em animais (GENEROSO et al., 2015; MAIOLI et al., 2014; TRINDADE et al., 2018).

Investigar melhor a relação do consumo de bebidas açucaradas na susceptibilidade de algumas patologias possui um impacto relevante. Digno de nota, o consumo excessivo de alguns nutrientes foi associado ao desenvolvimento e agravamento do quadro de algumas doenças inflamatórias intestinais e doenças autoimunes, como a colite e a esclerose múltipla (AGUIAR et al., 2018; ZHANG et al., 2019), doenças oncológicas (DE VRIES et al., 2017; GONCALVES et al., 2019), depressão e ansiedade (MARTINS DE CARVALHO et al., 2019; SANTOS et al., 2018).

Alguns trabalhos da literatura sugerem que a ingestão excessiva de açúcares simples induz a síndrome metabólica por mecanismos mediados especificamente por frutose, uma vez que pode ocorrer a conversão endógena de glicose em frutose através da via polioliol (Figura 20) (ANDRES-HERNANDO et al., 2020; LANASPA et al., 2013). A ingestão de solução contendo 10% de glicose por camundongos C57BL/6 KO para frutoquinase, mesmo com balanço energético positivo, não desenvolveu a síndrome metabólica. Em contra partida, camundongos do grupo controle ingeriram a mesma solução e apresentaram níveis elevados de frutose e sorbitol no fígado, acompanhados de maior expressão de aldose redutase e frutoquinase (LANASPA et al., 2013). Em conjunto, esses dados sugerem que o mecanismo pelo qual a glicose induz características da síndrome metabólica é mediado pela ativação de aldose redutase hepática com a conversão endógena de frutose. Bebidas adoçadas com glicose e frutose podem agravar ainda mais esse mecanismo e provocar graves consequências ao consumidor.

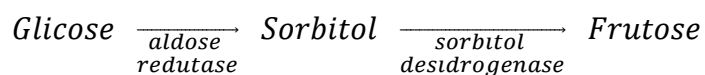


Figura 20: Via polioliol.

Fonte: LANASPA et al., 2013 (Adaptado).

Resumidamente, o excesso de frutose reduz fosfato intracelular e propicia a conversão de ácido úrico que, por sua vez, induz o estresse oxidativo mitocondrial prejudicando a oxidação de ácidos graxos, mantendo um estado de ATP baixo. A disfunção mitocondrial associada à ativação de fatores de transcrição, como ChREBP, ajudam a conduzir a lipogênese *de novo*, ativando processos que resultam na síndrome metabólica (ANDRES-HERNANDO et al., 2020).

Pesquisas que envolvem o açúcar e os HCFS em humanos e animais de laboratório se tornam relevantes para esclarecer o papel desses compostos na indução de comorbidades e agravos de outras doenças, assim como características de síndrome metabólica e de obesidade.

7. CONCLUSÃO

Em nosso trabalho demonstramos que o consumo excessivo de glicose e frutose foi capaz de induzir alterações metabólicas associadas à alterações morfológicas na porção distal (íleo) do intestino delgado em camundongos C57BL/6, bem como à indução de um perfil pro-inflamatório no linfonodo que drena esta região (Figura 21).

Os dados obtidos sugerem a interferência de carboidratos simples no sistema imune, em especial de mucosa intestinal. Sendo assim, nossa pesquisa pode ajudar a compreender melhor os mecanismos envolvidos no processo de indução da síndrome metabólica no sistema imune de mucosa, e assim, contribuir para o desenvolvimento de métodos e aplicações preventivas e terapêuticas ao consumo de excesso de carboidratos.

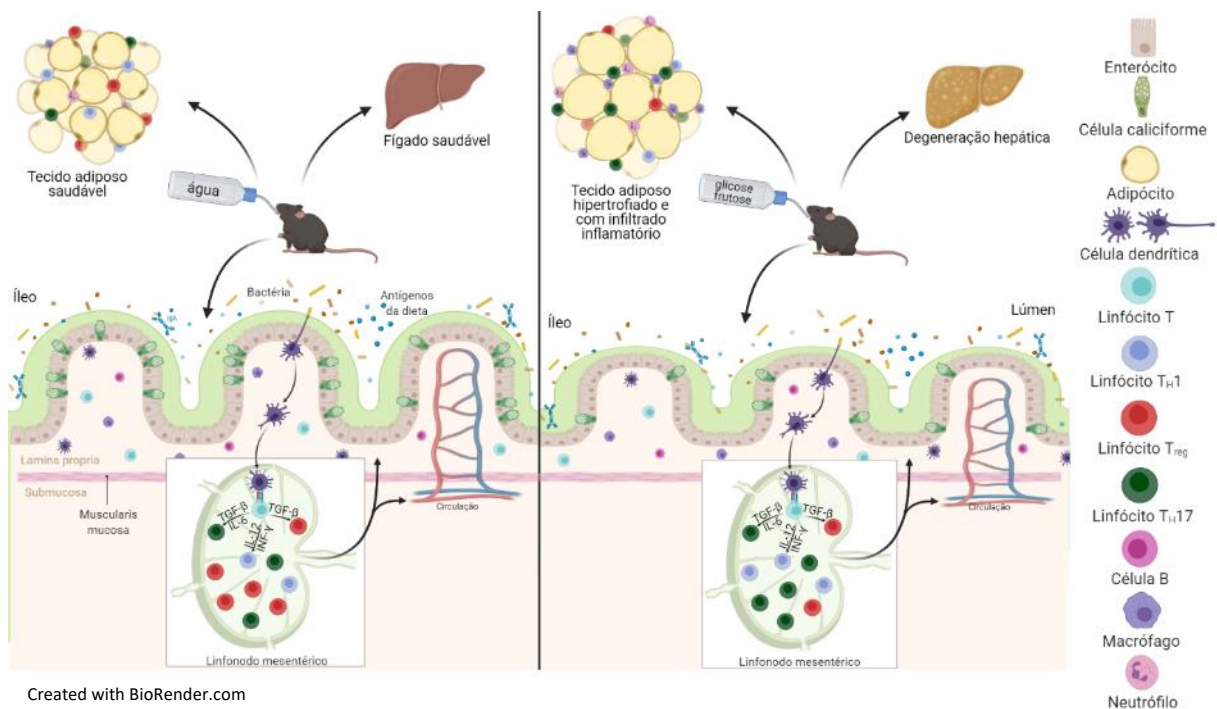


Figura 21: Resumo dos resultados.

O consumo excessivo de glicose e frutose pode induzir a disfunção metabólica e promover inflamação subclínica na porção mais distal (íleo) do intestino delgado de camundongos C57BL/6.

8. PERSPECTIVAS

1. Avaliar a resistência à insulina por meio dos testes de tolerância a glicose (do inglês *glucose tolerance test*, GTT) e a insulina (do inglês *insulin tolerance test*, ITT).

2. Validar por citometria de fluxo a frequência de células T_H2 através da expressão do fator de transcrição GATA-3 em linfócitos TCD4⁺.

3. Avaliar a expressão de quimiocinas relacionadas à atividade de neutrófilos, como CXCL1 e CXCL3, por citometria de fluxo após o consumo de bebida açucarada.

4. Verificar a inflamação no íleo por meio da análise da expressão de proteínas de junção no intestino por PCR, como claudina e ocludina.

5. Verificar se a ingestão de bebida açucarada interfere na susceptibilidade à inflamação intestinal, como, por exemplo, induzir mucosite com dose reduzida de 5-FU.

6. Avaliar a expressão de GLUT2 e GLUT5 nos enterócitos e nos linfócitos TCD4⁺ por PCR para verificar se há relação com a frequência de células T_H17 no linfonodo drenante da porção mais distal do intestino delgado.

7. Analisar o perfil da microbiota intestinal após o consumo de bebida açucarada.

8. Investigar se o alto consumo de carboidratos simples compromete a resposta imune à infecção no intestino delgado (por exemplo: *Salmonella*, *Ancylostoma*).

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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, p. 1–12, 2018.
- AMAR, J. et al. Intestinal mucosal adherence and translocation of commensal bacteria at the early onset of type 2 diabetes: Molecular mechanisms and probiotic treatment. **EMBO Molecular Medicine**, v. 3, n. 9, p. 559–572, 2011.
- ANDRES-HERNANDO, A. et al. Deletion of Fructokinase in the Liver or in the Intestine Reveals Differential Effects on Sugar-Induced Metabolic Dysfunction. **Cell Metabolism**, v. 32, n. 1, p. 117- 127.e3, 2020.
- ANG, Z.; DING, J. L. GPR41 and GPR43 in obesity and inflammation - Protective or causative? **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. FEB, p. 1–5, 2016.
- ATARASHI, K.; TANOUE, T.; HONDA, K. Induction of lamina propria Th17 cells by intestinal commensal bacteria. **Vaccine**, v. 28, n. 50, p. 8036–8038, 2010.
- AUJLA, S. J.; DUBIN, P. J.; KOLLS, J. K. Th17 cells and mucosal host defense. **Seminars in Immunology**, v. 19, n. 6, p. 377–382, 1 dez. 2007.
- BAKER, R. G.; HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. NF- κ B, Inflammation, and Metabolic Disease. **Cell Metabolism**, v. 13, n. 1, p. 11–22, jan. 2011.
- 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, 2009.
- BLEIL, S. I. O padrão alimentar ocidental: considerações sobre a mudança de hábitos no Brasil. **Cadernos de Debate**, v. 6, n. 1, p. 1–25, 1998.
- BRAY, G. A.; NIELSEN, S. J.; POPKIN, B. M. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 4, p. 537–543, 2004.
- CASPARY, W. F. Physiology and pathophysiology of intestinal absorption. **The American journal of clinical nutrition**, v. 55, n. 1, p. 299S-308S, 1992.
- CDC, C. FOR D. C. AND P. **Get the Facts: Sugar-Sweetened Beverages and Consumption**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/nutrition/data-statistics/sugar-sweetened-beverages-intake.html>>. Acesso em: 15 abr. 2020.
- CHATZIGEORGIOU, A. et al. Lymphocytes in obesity-related adipose tissue inflammation. **Diabetologia**, v. 55, p. 2583–2592, 2012.
- CHEN, H. et al. Consumption of sugar-sweetened beverages has a dose-dependent

effect on the risk of non-alcoholic fatty liver disease: an updated systematic review and dose-response meta-analysis. **International journal of environmental research and public health**, v. 16, n. 12, p. 2192, 2019.

CHEN, Y. et al. Stimulation of airway mucin gene expression by interleukin (IL)-17 through IL-6 paracrine/autocrine loop. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 19, p. 17036–17043, 9 maio 2003.

CHO, K. W.; MORRIS, D. L.; LUMENG, C. N. Flow Cytometry Analyses of Adipose Tissue Macrophages. In: **Bone**. [s.l.: s.n.]. v. 23p. 297–314.

CHORILLI, M.; MICHELIN, D. C.; SALGADO, H. R. N. Animais de laboratório: o camundongo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 1, p. 11–23, 2007.

CHRIST, A. et al. Western Diet Triggers NLRP3-Dependent Innate Immune Reprogramming. **Cell**, v. 172, n. 1–2, p. 162- 175.e14, 2018.

CHRIST, A.; LAUTERBACH, M.; LATZ, E. Western Diet and the Immune System: An Inflammatory Connection. **Immunity**, v. 51, n. 5, p. 794–811, 2019.

DE VRIES, Y. C. et al. Differences in dietary intake during chemotherapy in breast cancer patients compared to women without cancer. **Supportive Care in Cancer**, v. 25, n. 8, p. 2581–2591, 2017.

DHINGRA, R. et al. Soft drink consumption and risk of developing cardiometabolic risk factors and the metabolic syndrome in middle-aged adults in the community. **Circulation**, v. 116, n. 5, p. 480–488, 2007.

ESTERHÁZY, D. et al. Compartmentalized gut lymph node drainage dictates adaptive immune responses. **Nature**, v. 569, n. 7754, p. 126–130, 2019.

FARIA, A. M. C. et al. Food components and the immune system: From tonic agents to allergens. **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. MAY, p. 1–16, 2013.

FARIA, A. M. C.; REIS, B. S.; MUCIDA, D. Tissue adaptation: Implications for gut immunity and tolerance. **Journal of Experimental Medicine**, v. 214, n. 5, p. 1211–1226, 1 maio 2017.

FARIA, A. M. C.; WEINER, H. L. Oral tolerance. **Immunological Reviews**, v. 206, n. 1, p. 232–259, ago. 2005.

FERNANDES, A. S. M. **Má absorção de frutose: o impacto na microbiota intestinal**. [s.l.] Universidade Fernando Pessoa, 2020.

FERREIRA, S. S. **Frutose e a Síndrome Metabólica**. [s.l.] Universidade do Porto, 2010.

FLORES-LANGARICA, A. et al. Systemic Flagellin Immunization Stimulates Mucosal CD103 + Dendritic Cells and Drives Foxp3 + Regulatory T Cell and IgA Responses in the Mesenteric Lymph Node . **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 12, p. 5745–5754, 15 dez. 2012.

FLORES-LANGARICA, A. et al. CD103 + CD11b + mucosal classical dendritic cells initiate long-term switched antibody responses to flagellin. **Mucosal Immunology**, v. 11, n. 3, p. 681–692, 1 maio 2018.

FROESCH, E. R.; GINSBERG, J. L. Fructose Metabolism of Adipose Tissue. **Journal of Biological Chemistry**, v. 237, n. 11, p. 3317–3324, nov. 1962.

GAINO, N. M.; SILVA, M. V. DA. Consumo de frutose e impacto na saúde humana. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 18, n. 2, p. 88, 2015.

GENEROSO, S. D. V. et al. Dietary supplementation with omega-3 fatty acid attenuates 5-fluorouracil induced mucositis in mice. **Lipids in Health and Disease**, v. 14, n. 1, p. 1–10, 2015.

GERSEMANN, M. et al. Differences in goblet cell differentiation between Crohn's disease and ulcerative colitis. **Differentiation**, v. 77, n. 1, p. 84–94, 2009.

GOLDE, W. T.; GOLLOBIN, P.; RODRIGUEZ, L. L. TECHNIQUE A rapid , simple , and humane method for submandibular bleeding of mice using a lancet. v. 34, n. 9, p. 39–43, 2005.

GONCALVES, M. D. et al. High-fructose corn syrup enhances intestinal tumor growth in mice. **Science**, v. 363, n. 6433, p. 1345–1349, 2019.

GONZALEZ-PEREZ, V. et al. Goblet cell LRRC26 regulates BK channel activation and protects against colitis in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 118, n. 3, 19 jan. 2021.

HANOVER, L. M.; WHITE, J. S. Manufacturing, composition, and applications of fructose. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 58, n. 5, p. 724S-732S, 1 nov. 1993.

HELSLEY, R. N. et al. Tissue-Specific Fructose Metabolism in Obesity and Diabetes. **Current Diabetes Reports**, v. 20, n. 11, p. 64, 15 nov. 2020.

HOUSTON, S. A. et al. The lymph nodes draining the small intestine and colon are anatomically separate and immunologically distinct. **Mucosal Immunology**, v. 9, n. 2, p. 468–478, 2016.

IBGE, I. B. DE G. E E.-. **Pesquisa de orçamentos familiares 2017-2018: avaliação nutricional da disponibilidade domiciliar de alimentos no Brasil / IBGE,**

Coordenação de Trabalho e Rendimento. [s.l: s.n.].

ISHIMOTO, T. et al. Opposing effects of fructokinase C and A isoforms on fructose-induced metabolic syndrome in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 11, p. 4320–4325, 2012.

JANG, C. et al. The Small Intestine Converts Dietary Fructose into Glucose and Organic Acids Article The Small Intestine Converts Dietary Fructose into Glucose and Organic Acids. **Cell Metabolism**, v. 27, n. 2, p. 351- 361.e3, 2018.

JONES, N. et al. Fructose reprogrammes glutamine-dependent oxidative metabolism to support LPS-induced inflammation. **Nature communications**, v. 12, n. 1, p. 1209, 2021.

JÜRGENS, H. et al. Consuming fructose-sweetened beverages increases body adiposity in mice. **Obesity Research**, v. 13, n. 7, p. 1145–1156, 2005.

KAWABATA, K. et al. A high-fructose diet induces epithelial barrier dysfunction and exacerbates the severity of dextran sulfate sodium-induced colitis. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 43, n. 3, p. 1487–1496, 2019.

KIM, M. S. et al. ChREBP regulates fructose-induced glucose production independently of insulin signaling. **Journal of Clinical Investigation**, v. 126, n. 11, p. 4372–4386, 2016.

KINUGASA, T. et al. Claudins regulate the intestinal barrier in response to immune mediators. **Gastroenterology**, v. 118, n. 6, p. 1001–1011, 1 jun. 2000.

KUSMINSKI, C. M.; BICKEL, P. E.; SCHERER, P. E. Targeting adipose tissue in the treatment of obesity-associated diabetes. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 15, n. 9, p. 639–660, 2016.

LAMBERTZ, J. et al. Fructose: A dietary sugar in crosstalk with microbiota contributing to the development and progression of non-alcoholic liver disease. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. SEP, 2017.

LANASPA, M. A. et al. Endogenous Fructose Production and Metabolism in the Liver Contributes to the Development of Metabolic Syndrome. **Nature Communications**, v. 4, p. 1–8, 2013.

LÊ, K. A.; TAPPY, L. Metabolic effects of fructose. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 9, n. 4, p. 469–475, 2006.

LEI, Y. et al. Carbohydrate response element binding protein (ChREBP) correlates with colon cancer progression and contributes to cell proliferation. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2020.

- LEONEL, A. J. et al. Antioxidative and immunomodulatory effects of tributyrin supplementation on experimental colitis. **British Journal of Nutrition**, v. 109, n. 8, p. 1396–1407, 2013.
- LUCK, H. et al. Gut-associated IgA+ immune cells regulate obesity-related insulin resistance. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 3650, 13 dez. 2019.
- MAIOLI, T. U. et al. Pretreatment with *Saccharomyces boulardii* does not prevent the experimental mucositis in Swiss mice. **Journal of Negative Results in BioMedicine**, v. 13, n. 1, p. 1–8, 2014.
- MAIOLI, T. U. et al. High sugar and butter (HSB) diet induces obesity and metabolic syndrome with decrease in regulatory T cells in adipose tissue of mice. **Inflammation Research**, v. 65, n. 2, p. 169–178, 2016.
- 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.
- MENEZES, J. DA S. et al. Stimulation by food proteins plays a critical role in the maturation of the immune system. **International Immunology**, v. 15, n. 3, p. 447–455, 2003.
- MERINO, B. et al. Intestinal Fructose and Glucose Metabolism in Health and Disease. **Nutrients**, v. 12, n. 1, 2020.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Vigitel Brasil 2019**. [s.l: s.n.].
- MONTEIRO, R.; AZEVEDO, I. Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome. **Mediators of Inflammation**, v. 2010, n. Atp lii, 2010.
- MOREIRA, A. P. B. et al. Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia. **British Journal of Nutrition**, v. 108, n. 5, p. 801–809, 2012.
- MOWAT, A. M.; AGACE, W. W. Regional specialization within the intestinal immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 10, p. 667–685, 2014.
- MOWAT, A. M. I. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 4, p. 331–341, 2003.
- MUSA, S. C.; MARANGON, A. F. C. **Comparação da glicemia pós prandial após consumo de diferentes fontes de carboidratos** - doi: 10.5102/ucs.v10i1.1472. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 10, n. 1, p. 1–8, 2012.
- PATEL, C. et al. Effect of dietary fructose on portal and systemic serum fructose levels in rats and in KHK^{-/-} and GLUT5^{-/-} mice. **American Journal of Physiology** -

- Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 309, n. 9, p. G779–G790, 2015.
- PEREIRA, S. S. et al. Differences in adipose tissue inflammation and oxidative status in C57BL/6 and ApoE^{-/-} mice fed high fat diet. **Animal Science Journal**, v. 83, n. 7, p. 549–555, 2012.
- POMIN, V. H.; MOURÃO, P. A. DE S. Carboidratos de adoçantes a medicamentos. **Ciência Hoje**, v. 39, p. 24–31, 2006.
- RAND, E. B. et al. Sequence, tissue distribution, and functional characterization of the rat fructose transporter GLUT5. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 264, n. 6 27-6, 1993.
- REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **The Journal of nutrition**, v. 123, n. 11, p. 1939–51, 1993.
- REEVES, W. H. et al. **Origins of Antinuclear Antibodies**. Fifth Edit ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2011.
- RITZE, Y. et al. Effect of high sugar intake on glucose transporter and weight regulating hormones in mice and humans. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. 1–9, 2014.
- RODRIGUES, D. F. et al. Acute intake of a high-fructose diet alters the balance of adipokine concentrations and induces neutrophil influx in the liver. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 25, n. 4, p. 388–394, 2014.
- ROEDERER, M. Spectral compensation for flow cytometry: Visualization artifacts, limitations, and caveats. **Cytometry**, v. 45, n. 3, p. 194–205, 2001.
- ROSAS-VILLEGAS, A. et al. Differential effect of sucrose and fructose in combination with a high fat diet on intestinal microbiota and kidney oxidative stress. **Nutrients**, v. 9, n. 4, 2017.
- SAHPUTRA, R. et al. The Essential Role Played by B Cells in Supporting Protective Immunity Against *Trichuris muris* Infection Is by Controlling the Th1/Th2 Balance in the Mesenteric Lymph Nodes and Depends on Host Genetic Background. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. December, p. 1–14, 2019.
- 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, 2018.
- SATOKARI, R. High intake of sugar and the balance between pro-and anti-inflammatory gut bacteria. **Nutrients**, v. 12, n. 5, p. 12–15, 2020.

- SILVA, D. C. G. DA et al. Consumo de bebidas açucaradas e fatores associados em adultos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 24, n. 3, p. 899–906, 2019.
- SOARES, P. M. G. et al. Gastrointestinal dysmotility in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis outlasts inflammatory process resolution. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 63, n. 1, p. 91–98, 2008.
- SOUZA, A. L. DE. **Efeitos imunobiológicos de dietas contendo aminoácidos livres**. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, 2016.
- STANHOPE, K. L. et al. Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 5, p. 1322–1334, 1 maio 2009.
- SZABO, S. J. et al. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. **Cell**, v. 100, n. 6, p. 655–669, 2000.
- TAPPY, L.; LE, K. A. Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. **Physiological Reviews**, v. 90, n. 1, p. 23–46, 2010.
- TAYLOR, B. A.; PHILLIPS, S. J. Detection of obesity QTLs on mouse chromosomes 1 and 7 by selective DNA pooling. **Genomics**, v. 34, n. 3, p. 389–398, 1996.
- TOBIN, V. et al. Insulin Internalizes GLUT2 in the Enterocytes of Healthy but Not Insulin-Resistant Mice. v. 57, n. March, p. 1–8, 2008.
- TRINDADE, L. M. et al. Oral administration of Simbioflora® (synbiotic) attenuates intestinal damage in a mouse model of 5-fluorouracil-induced mucositis. **Beneficial Microbes**, v. 9, n. 3, p. 477–486, 2018.
- TUNG, J. W. et al. New approaches to fluorescence compensation and visualization of FACS data. **Clinical Immunology**, v. 110, n. 3, p. 277–283, 2004.
- VIANA, M. L. et al. Pretreatment with arginine preserves intestinal barrier integrity and reduces bacterial translocation in mice. **Nutrition**, v. 26, n. 2, p. 218–223, 2010.
- VLIET, M. J. VAN et al. The Role of Intestinal Microbiota in the Development and Severity of Chemotherapy-Induced Mucositis. v. 6, n. 5, p. 1–7, 2010.
- 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. **The Journal of Nutrition**, v. 147, n. 5, p. 770–780, 1 maio 2017.
- VOS, M. B. et al. Dietary fructose consumption among US children and adults: the Third National Health and Nutrition Examination Survey. **The Medscape Journal of**

Medicine, v. 10, n. 7, p. 160, 2008.

WANDERLEY, E. N.; FERREIRA, V. A. Obesidade: uma perspectiva plural. **Ciência & Saúde Coletiva e Saúde Coletiva**, v. 15, p. 185–194, 2010.

WEINER, H. L. et al. Oral tolerance. **Immunological Reviews**, v. 241, n. 1, p. 241–259, 2011.

WHO, W. H. O. **Reducing consumption of sugar-sweetened beverages to reduce the risk of childhood overweight and obesity**. Disponível em: <https://www.who.int/elena/titles/bbc/ssbs_childhood_obesity/en/#:~:text=Sugar-sweetened beverages contain sugars,with little other nutritional value.>>. Acesso em: 14 abr. 2020.

WINER, S. et al. Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. **Nature Medicine**, v. 15, n. 8, p. 921–929, 2009.

YU, W. et al. The influence of Th1/Th2 and CD4 + regulatory t cells of mesenteric lymph nodes on systemic lipopolysaccharide. **Polish Journal of Pathology**, v. 2, n. 2, p. 125–129, 2014.

ZHANG, D. et al. Lipogenic transcription factor ChREBP mediates fructose-induced metabolic adaptations to prevent hepatotoxicity. **Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 7, p. 2855–2867, 2017.

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, 2019.

ANEXO A – Certificado de aprovação do protocolo experimental



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Efeito da ingestão de bebida açucarada no perfil metabólico e imunológico de camundongos C57BL/6.", protocolo do CEUA: 126/2020 sob a responsabilidade de Tatiani Uceli Maioli que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 22/06/2020.

Vigência da Autorização	22/06/2020 a 21/06/2025
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	13
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia/ICB/UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	13
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia/ICB/UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	13
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia/ICB/UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	13
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia/ICB/UFMG

Considerações posteriores:

22/06/2020	Aprovado na reunião "on line" do dia 22/06/2020. Validade: 22/06/2020 à 21/06/2025.
------------	--

Belo Horizonte, 01/02/2021.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br