

PAOLA SOUZA SANTOS

**EFEITO DE ADOÇANTES ARTIFICIAIS NÃO CALÓRICOS NA
PERMEABILIDADE INTESTINAL: UM ESTUDO *IN VITRO* UTILIZANDO A
LINHAGEM CELULAR
CACO-2**

Bragança Paulista

2015

PAOLA SOUZA SANTOS

**EFEITO DE ADOÇANTES ARTIFICIAIS NÃO CALÓRICOS NA PERMEABILIDADE
INTESTINAL: UM ESTUDO *IN VITRO* UTILIZANDO A LINHAGEM CELULAR
CACO-2**

Prof. Dr. JOSÉ PEDRAZZOLI JUNIOR

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco (USF) para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Bragança Paulista

2015

WB 400
S237e

Santos, Paola Souza.

Efeito de adoçantes artificiais não calóricos na permeabilidade intestinal: um estudo in vitro utilizando a linhagem celular CACO-2 / Paola Souza Santos . -- Bragança Paulista, 2015.
26p.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco.

Orientação de: José Pedrazzoli Júnior.

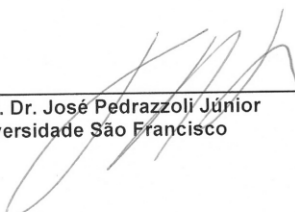
1. Adoçantes. 2. Permeabilidade intestinal.

3. Junções oclusivas. 4. CACO-2.

I. Pedrazzoli Júnior, José. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelas bibliotecárias do Setor de Processamento Técnico da Universidade São Francisco.

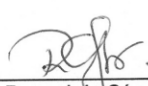
SANTOS, S., Paola. "Efeito de adoçantes artificiais não calóricos na permeabilidade intestinal: um estudo *in vitro* utilizando a linhagem celular CACO-2". Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em vinte e nove de janeiro de dois mil e quinze pela Banca examinadora constituída pelos professores:



Prof. Dr. José Pedrazzoli Júnior
Universidade São Francisco



Profa. Dra. Thalita Rocha
Universidade São Francisco



Profa. Dra. Raquel de Cássia dos Santos
Universidade São Francisco

Campus Bragança Paulista
Campus Campinas - Unidade Cambui
Campus Campinas - Unidade Swift
Campus Itatiba
Campus São Paulo

Av. São Francisco de Assis, 218 - Jd. São José - CEP 12916-900 / Tel.: 11 2454 8000 / Fax: 4034 1825
R. Cel. Silva Teles, 700 prédio C - Cambui - CEP 13024-001 / Tel.: 19 3779 3370
R. Waldemar César da Silveira, 105 - Swift - CEP 13045-510 / Tel.: 19 3779 3300 / Fax: 3779 3321
R. Alexandre Rodrigues Barbosa, 45 - Centro - CEP 13251-900 / Tel.: 11 4534 8000 / Fax: 4534 8015
R. Antonieta Leitão, 129 - Freguesia do Ó - CEP 02925-160 / Tel.: 11 3411 2950 / Fax: 3411 2978

Agradecimentos

À Deus, por sempre me conceder sabedoria nas escolhas dos melhores caminhos, coragem para acreditar, força para não desistir e proteção para me amparar.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. José Pedrazzoli Júnior** pela orientação e oportunidade.

A **Professora. Dra. Alessandra Gambero** pela pessoa especial, que nos inspira pelo exemplo pessoal e profissional. Obrigada pela oportunidade, por não ter permitido que eu interrompesse o processo, pela confiança e por compartilhar sua sabedoria.

A minha mãe **Rosinéia**, aos meus irmãos **Pablo** e **Mônica**, minha avó **Ana Maria** e meu namorado **Orlando** pelos conselhos e incentivos, pelo amor, apoio, confiança e motivação incondicional. Que sempre me impulsiona em direção às vitórias dos meus desafios.

As minhas amigas e companheiras de pesquisa **Érica Gotardo, Caroline Oliveira, Cíntia Caria, Simone Acedo, Tanila Santos, Patrícia Zanotti, Eloá Ramalho, Raquel Santos, Raíssa Ramalho** e **Ana Paula Ferreira**, por toda cooperação, pelo convívio diário e pela troca de experiências, por se tornarem verdadeiras amigas e mais leve meu trabalho. Obrigada por dividir comigo as angústias e alegrias. Foi bom poder contar com vocês! Meu muito obrigado.

À **CAPES** pelo auxílio e apoio científico.

Finalmente, gostaria de agradecer a **Unidade Integrada de Farmacologia e Gastroenterologia** por abrirem as portas para que eu pudesse realizar este sonho que era a minha DISSERTAÇÃO DE MESTRADO. Proporcionaram-me mais que a busca de conhecimento técnico e científico, mas uma LIÇÃO DE VIDA.

“A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original.”
Albert Einstein

RESUMO

A relação entre o consumo de adoçantes artificiais e obesidade tem sido explorada através de estudos observacionais retrospectivos ou prospectivos que apresentam resultados conflitantes. A causalidade reversa, ou seja, indivíduos com alto risco de ganhar peso que optam por consumir bebidas com adoçantes não-calóricos visando o controle do peso, continua sendo um problema de interpretação destes estudos. Estudos experimentais também têm sido conduzidos e têm demonstrado que a administração de adoçantes a animais de experimentação, em alguns casos, resulta em maior ganho de peso. Hipóteses que possam explicar esta reação a ingestão de compostos sem valor nutritivo incluem possíveis alterações na microbiota intestinal, desregulação na sinalização e produção de hormônios com função metabólica/saciedade e alterações na permeabilidade intestinal/capacidade absorptiva. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi estudar o efeito de adoçantes artificiais não calóricos na permeabilidade intestinal: um estudo *in vitro* utilizando a linhagem celular caco-2. As Células Caco-2 foram cultivadas, previamente incubadas com sacarina, sucralose, acesulfame K e aspartame e empregadas em ensaios para determinação da citotoxicidade através do ensaio de MTT (redução do corante 3-(4,5-dimetil tiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium brometo para o sal insolúvel formazan), integridade de monocamada celular por medida da resistência elétrica transepitelial (TEER) e permeabilidade da monocamada celular pela quantificação da permeação de FITC-dextran. A expressão proteica de moléculas de oclusão (claudina, JAM-A, ocludina) foi avaliada por Western blot. Frutose e glicose foram usadas como controle. Dos adoçantes empregados neste estudo, somente a sacarina foi capaz de comprometer a integridade da monocamada de células Caco-2 aumentando a permeabilidade ao FITC-dextran. O efeito observado não foi decorrente de citotoxicidade do composto adoçante, nem resultante da menor expressão de moléculas de oclusão. Conclui-se que a sacarina pode modificar a integridade intestinal e a capacidade de absorção de nutrientes.

Palavras-chave: ADOÇANTES, PERMEABILIDADE INTESTINAL, JUNÇÕES OCLUSIVAS, CACO-2.

ABSTRACT

The relationship between the consumption of artificial sweeteners and obesity has been explored through retrospective or prospective observational studies that showed conflicting results. The reverse causality, ie, individuals with high risk of obesity prefer to consume beverages with non-caloric sweeteners aimed weight control, remains an issue of interpretation of these studies. Experimental studies have also been conducted and have shown that the sweeteners administration to experimental animals, in some cases, resulting in increased weight gain. Hypotheses that may explain it include possible changes in intestinal microbiota, dysregulation in signaling and production of hormones with metabolic / satiety function and alterations in intestinal permeability / absorptive capacity. Thus, the aim of this project was to study the possible action of artificial sweeteners as intestinal permeability modifiers using a *in vitro* approach with Caco-2 cells. Caco-2 cells were cultivated, incubated previously with saccharin, sucralose, acesulfame K and aspartame and employed in MTT cytotoxicity assays (reducing the tetrazolium dye MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide to its insoluble formazan), monolayer integrity assay through measurement of transepithelial electric resistance (TEER) and permeability assay using FITC-dextran. Junction protein expression (claudin, JAM-A, occluding) was evaluated by Western blot. Fructose and glucose was used as control. The results show that only saccharin was able to damage Caco-2 monolayer integrity and increased FITC-dextran permeability. The observed effect was not due cytotoxicity neither due occlusions protein expression reductions. In conclusion, saccharin could be able to alter the intestinal integrity and modify nutrient absorption.

Key-words: SWEETENERS, INTESTINAL PERMEABILITY, TIGHT JUNCTIONS, CACO-2.

Listas de abreviaturas

ADA- Associação Americana de Diabetes
ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP- Adenosina Trifosfato
BCRJ- Banco de Células do Rio de Janeiro
Caco-2- Adenocarcinoma do Colón Humano
Células HT- Células de Adenoma Carcinoma de Colón
CO₂. Gás carbônico
DNA- Molécula de Ácido Desoxirribonucléico
DTT- Ditioneitol
EDTA- Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EPM- Erro Padrão da Média
FDA-Administração de Alimentos e Medicamentos
FITC-Dextran - Isotiocianato de Fluoresceína-Dextrano
GLP-1- Peptídeo Similar ao Glucagon
GIP - Peptídeo Insulinotrópico Glicose-Dependente
HCL- Ácido Clorídrico
HFCS- Xarope de Milho Rico em Frutose
HT-29- Adenocarcinoma Colorretal Humano
IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IMC- Índice de Massa Corporal
IP₃R3- receptor tipo 3 do inositol trifosfato
JAM- Junção de molécula de Adesão
LPS- Lipopolissacarídeo
MEM- Meio Essencial Mínimo
Millicell-ERS- Aparelho de Resistência Elétrica
MS- Ministério da Saúde
MTT- 3-(4,5-dimetil tiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium
NaCl- Cloreto de Sódio
NaF- Fluoreto de Sódio

Na₄P₂O₇- Pirofosfato de Tetrassódio
NaVO₄- Ortovanadato de Sódio
NT- Não Tratadas
O₂- Oxigênio
OMS- Organização Mundial de Saúde
PKC- Proteína Quinase C
PMSF- Fluoreto de Fenilmetilsulfonilo
SDS- sulfato de sódio dodecil
SDS-PAGE- Aplicação em gel de poliacrilamida
TEER- Resistência Elétrica Transepitelial
TGI- Trato Gastrointestinal
TJs- Junções Oclusivas
TLR-4- Receptores do tipo-toll
T1R2- Receptores Gustativos Metabotrópicos
T1R3- Receptores Gustativos Metabotrópicos
TRPM5- Canal de Receptor de Potencial Transiente M5
USA- Estados Unidos da América
ZO-1- Zônula de Oclusão 1

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química dos adoçantes artificiais e naturais.

Figura 2. Função de barreira das junções oclusivas (tight junctions).

Figura 3. Medida de Resistência Elétrica Transepitelial (TEER) em monocamadas de células Caco-2.

Figura 4. Quantificação de FITC-Dextran no meio de cultura do compartimento inferior do dispositivo de cultura contendo células Caco-2.

Figura 5. Níveis de citotoxicidade dos adoçantes em cultura celular de Caco-2.

Figura 6. Expressão das proteínas de junção celular (JAM-A, Claudina e Ocludina) em culturas celulares de Caco-2 incubadas com glicose ou sacarina.

| SUMÁRIO | Páginas |
|--|----------------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2. OBJETIVOS..... | 10 |
| 2.1 Objetivos Gerais..... | 10 |
| 2.2 Objetivos Específicos..... | 10 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS..... | 11 |
| 3.1 Linhagens de células intestinais Caco-2..... | 11 |
| 3.2 Incubação com os adoçantes..... | 11 |
| 3.3 Avaliação da integridade da monocamada celular..... | 11 |
| 3.4 Ensaio de permeabilidade paracelular com FITC-Dextran..... | 12 |
| 3.5 Avaliação da citotoxicidade dos adoçantes nas células Caco-2..... | 12 |
| 3.6 Avaliação da expressão de moléculas de junção celular..... | 12 |
| 3.7 Análise Estatística..... | 13 |
| 4. RESULTADOS..... | 14 |
| 4.1 Integridade da monocamada durante incubação com os adoçantes..... | 14 |
| 4.2 Avaliação da permeabilidade paracelular | 15 |
| 4.3 Avaliação da citotoxicidade dos adoçantes | 16 |
| 4.4 Avaliação da expressão proteica das moléculas de junção celular..... | 17 |
| 5. DISCUSSÃO..... | 18 |

| | |
|------------------------------------|----|
| 6. CONCLUSÃO..... | 21 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 22 |

1. INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a obesidade e as doenças associadas constituem uma epidemia mundial, atingindo todas as camadas sociais, tanto em países desenvolvidos, como nos países em desenvolvimento. “Estatísticas Mundiais de Saúde 2012”, afirmam que a obesidade é a causa de morte de 2,8 milhões de pessoas por ano. Hoje, 12% da população mundial são consideradas obesas e no Brasil, a obesidade atinge 15,8% da população adulta (IBGE, 2010).

O progresso industrial nas últimas décadas tem gerado uma série de mudanças no estilo de vida e padrão alimentar da população geral em escala global. Esse progresso, por conseguinte, levou a um expressivo aumento no consumo de produtos refinados e industrializados, fato que tem sido relacionado ao aumento da incidência de doenças crônicas não transmissíveis, tais como obesidade, doenças cardiovasculares e câncer (Annalisa *et al.* 2014).

A evolução da indústria alimentícia favoreceu a substituição da sacarose, obtida através do refinamento da beterraba ou da cana de açúcar, por adoçantes calóricos mais baratos, derivados do milho, como o xarope de milho com elevada concentração de frutose (*high-fructose corn syrup – HFCS*) este tem sido muito utilizado compondo cerca de 40% dos adoçantes calóricos presentes em alimentos e bebidas (Payne *et al.* 2012). O consumo de bebidas e alimentos adoçados artificialmente é apontado como principal fator de contribuição para o aumento da obesidade (Ferder *et al.* 2010).

Uma estratégia ao consumo das bebidas adoçadas com açúcar são as bebidas adoçadas artificialmente com substâncias com baixo ou nenhum valor calórico, onde o enfoque de vendas se baseia no potencial de perda de peso e aumento do bem-estar. Assim, consumidores que desejam desfrutar do sabor doce no dia-a-dia e não desejam aumentar seu consumo energético optam pelo consumo de adoçantes não calóricos, auxiliando no controle do peso, prevenção de cáries, controle do diabetes e outras doenças crônicas (Associação Americana de Diabetes, ADA, 2010).

No entanto, pesquisas realizadas com jovens e adultos tem sugerido que indivíduos que consomem adoçantes artificiais não calóricos tendem a apresentar altos índices de massa corporal (IMC) e maior propensão a fazer dietas para perda de peso.

Mas devemos considerar que estudos transversais de associação entre o consumo de adoçantes artificiais não calóricos e obesidade são tendenciosos, visto que não é possível avaliar se o consumo de adoçantes artificiais não calóricos induz a obesidade e risco de saúde ou vice-versa. Estudos observacionais prospectivos desta associação revelaram resultados conflitantes, sem associação positiva ou inversa. A causalidade reversa, ou seja, indivíduos com alto risco de ganhar peso optam por consumir adoçantes artificiais não calóricos visando o controle do peso, continua sendo um problema na interpretação destes estudos (de Konning *et al.*, 2011; Mozaffarian *et al.*, 2011; Zanini *et al.*, 2011)

Os adoçantes artificiais não calóricos utilizados como substitutos do açúcar de mesa são potentes estimuladores de receptores gustativos para o doce atuando com uma potência muitas vezes maior que o açúcar. O mecanismo molecular de recepção e transdução do sabor doce envolve receptores associados à proteína G presentes nas células que formam os botões gustativos denominados receptor tipo 1 membro 2 (T1R2) e membro 3 (T1R3). Quando os adoçantes artificiais ou naturais se ligam ao T1R2 ou ao T1R3, eventos intracelulares envolvendo a ativação da proteína G gustaducina, a fosfolipase C, o receptor tipo 3 do trifosfato inositol (IP₃R3) e o canal de receptor de potencial transiente M5 (TRPM5) são ativados. A célula gustativa se despolariza e libera o neurotransmissor ATP (Adenosina Trifosfato) que ativará receptores purinérgicos na fibra nervosa gustatória gerando a informação do doce ao Sistema Nervoso Central (Yoshida *et al.*, 2013).

A vantagem da substituição dos adoçantes calóricos por estes, provém do seu elevado teor de doçura o que favorece a sua utilização em quantidades muito reduzidas, resultando em uma oferta mínima ou nula de calorias. Por esse motivo, têm sido amplamente utilizados na fabricação de diversas bebidas e outros produtos alimentícios, tais como refrigerante *diet*, iogurtes e gomas de mascar. Dos adoçantes mais utilizados e atualmente aprovados e regulamentados pela *Food and Drug Administration* (FDA), podemos citar o acessulfame K, aspartame, sacarina, sucralose e neotame (Pereira *et al.*, 2013). No Brasil, a regulamentação do uso de adoçantes é de responsabilidade do Ministério da Saúde (MS), por meio da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), com base em normas internacionais sobre o uso de

aditivos em alimentos. Os tipos de edulcorantes não calóricos atualmente permitidos para comercialização no Brasil são esteviosídeo, taumatina, acessulfame K, aspartame, sacarina, sucralose e neotame (ANVISA, 2010).

A sacarina, o adoçante artificial mais antigo foi descoberto em 1879. Apresenta um teor de doçura 500 vezes maior que a sacarose e é lentamente absorvida pelo intestino e excretada inalteradamente de forma rápida na urina. Até a década de 50 era pouco utilizada em produtos alimentícios, pois o seu sabor doce é acompanhado por um resíduo amargo. Assim, que houve a necessidade de melhorar sua palatabilidade com manutenção reduzida de seu valor calórico, portanto, passou a ser uma possível alternativa para a redução do consumo de calorias (Sclafani *et al.*, 2010).

O aspartame, amplamente utilizado na indústria alimentícia, principalmente pela semelhança entre o seu sabor e o da sacarose, foi aprovado pela FDA em 1981 como adoçante de mesa e em bebidas carbonadas em 1983, com dose máxima de 50mg/kg/dia. O aspartame é metabolizado no trato gastrointestinal seu metabolismo ocorre pela ação de esterases e peptidases e gera em três componentes: ácido aspártico e fenilalanina e, metanol (Anton *et al.*, 2010). Esses componentes podem ser absorvidos, resultam em um baixíssimo aporte calórico de 4 Kcal/g. Contudo, a presença do aminoácido fenilalanina torna seu uso impróprio para portadores de fenilcetonúria (Scheurer, 2014).

O acessulfame de potássio, ou acessulfame-K, é 200 vezes mais doce que a sacarose não é metabolizado pelo organismo humano, não fornece aporte calórico (ADA, 2010). É frequentemente utilizado em combinação com outros edulcorantes, pois da mesma forma que a sacarina, o acessulfame-K apresenta sabor residual amargo quando utilizado isoladamente. Contudo, quando pequenas quantidades desses adoçantes são misturadas a outros adoçantes artificiais com teor de doçura superior, o resultado do sabor e perfil de doçura é semelhante ao da sacarose (Scheurer *et al.*, 2014).

A sucralose, um substituto dissacarídeo sintetizado a partir da sacarose resultando na inversão da configuração do carbono-4 de glico para um galacto-análogo, é 600 vezes mais doce que a sacarose e seu consumo têm aumentado devido a sua falta de calorias, estabilidade em altas temperaturas e utilizada em uma ampla

variedade de alimentos e bebidas, suplementos vitamínicos alimentares e dietas médicas). Aplicado como um edulcorante de mesa em formulações secas, aromatizantes, conservantes, condimentos, vegetais enlatados e em produtos pasteurizados. Possui características importantes, como não interagir com outros alimentos, sendo estável na presença de etanol, durante o processo de pasteurização, esterilização e cozimento, pode ser armazenado por mais de um ano mantendo 99% do seu sabor original e não interfere na utilização ou absorção de glicose, metabolismo de carboidratos ou a secreção de insulina (Rodero *et al.*; 2010). As estruturas químicas dos adoçantes artificiais e naturais estão apresentadas na Figura 1.

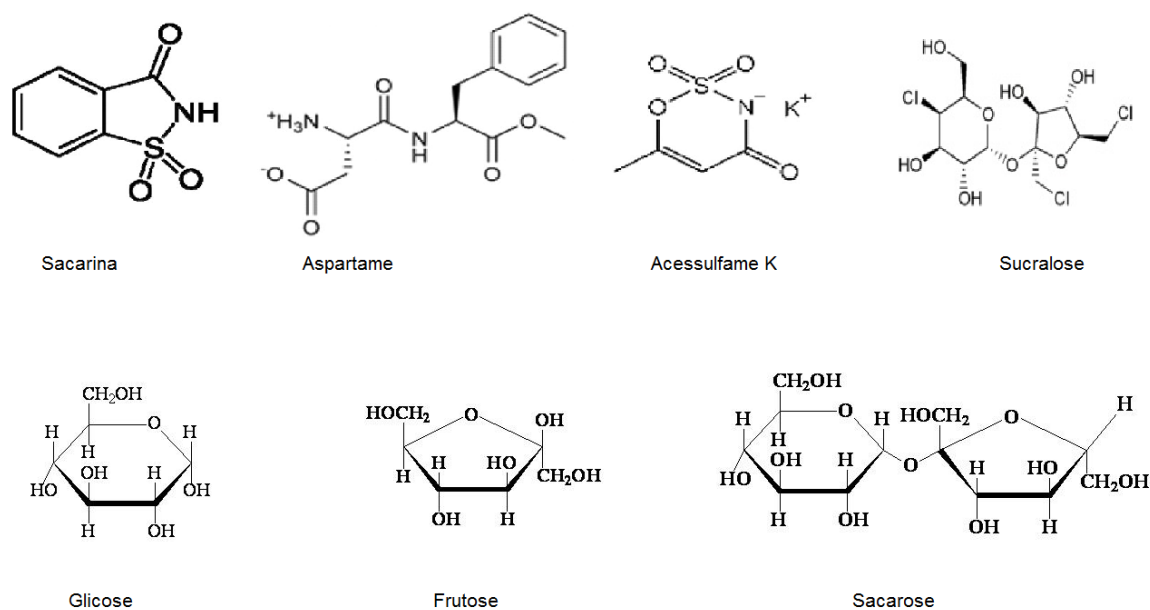


Figura 1. Estrutura química dos adoçantes artificiais e naturais. Retirado de : <http://infinito-e-diverso-els.blogspot.com.br/2011/02/adoçantes-artificiais.html>.

Estudos clínicos têm demonstrado resultados conflitantes quanto a possível interferência dos adoçantes na homeostasia glicêmica. Mulheres jovens, saudáveis, com IMC normal foram submetidas à ingestão de água, sucralose, sacarose e a combinação de sacarose e sucralose, receberam uma refeição padrão e tiveram os níveis glicêmicos avaliados, bem como os níveis plasmáticos de insulina, glucagon,

triacilgliceróis e grelina. Nestes indivíduos a administração de sucralose não promoveu resultados diferentes da administração de água (Brown e Payne 2011). Voluntários saudáveis também apresentaram esvaziamento gástrico e padrão sérico hormonal (GLP, GIP e insulina) após a administração intragástrica de sucralose. Pacientes com diabetes mellito também não demonstraram alterações glicêmicas após a ingestão pontual ou crônica de sucralose (Ma *et al.*, 2010). No entanto, um estudo que utilizou voluntários obesos com sensibilidade normal a insulina, a administração prévia de sucralose à ingestão oral de glicose resultou em aumento dos níveis glicêmicos e em aumento dos níveis de insulina. Estudos semelhantes foram conduzidos com outros adoçantes como o aspartame e a sacarina. Pacientes diabéticos não-insulino dependentes não apresentaram alterações glicêmicas após a ingestão de uma única dose de aspartame ou sacarina (Pepino *et al.*, 2013).

Estudos utilizando animais de experimentação também foram realizados com a intenção de correlacionar o uso de adoçantes e o ganho de peso/controlar glicêmico. Estes estudos mostraram que ratos que consumiram bebidas adoçadas com sacarina ganharam mais peso e tiveram acúmulo de gordura visceral devido a uma maior ingestão de alimentos (Swithers *et al.*, 2012). Outro estudo mostrou que o consumo diário de valores máximos permitidos de sacarina, ciclamato, acessulfame K e aspartame por ratos resultaram em maior ganho de peso (Polyak *et al.*, 2010).

O aumento do ganho de peso em indivíduos ou animais de experimentação que consomem bebidas ou alimentos adoçados artificialmente é explicado pelas alterações na sinalização dos hormônios relacionados à saciedade, como o peptídeo similar ao glucagon (GLP)-1 e a grelina (Brown *et al.*, 2012; Swithers *et al.*, 2012; Moran e Dailey, 2011; Ma *et al.*, 2010). Outra hipótese é que estas substâncias poderiam interferir e modificar a microbiota intestinal levando ao ganho de peso. Em ratos suplementados por 12 semanas com Splenda® (nome comercial do adoçante artificial à base de sucralose), observou-se uma redução no número total de bactérias anaeróbias e aeróbias (Abou-Donia *et al.*, 2008). Não somente as modificações na microbiota, mas também alterações na barreira absorptiva poderiam interferir com o ganho de peso e alterações metabólicas.

Animais suplementados com frutose, mas não com glicose, desenvolveram esteatose hepática decorrente do aumento de translocação de endotoxinas bacterianas e ativação de receptores do tipo-toll (TLR-4) hepáticos (Spruss *et al.*, 2012). Animais suplementados com dieta hiperlipídica ou frutose também apresentaram redução na expressão de proteínas de junção celular como claudina-1 e ocludina envolvidas no controle da permeabilidade intestinal, no entanto, há relatos prévios de que os adoçantes seriam também capazes de contribuir com as alterações de permeabilidade intestinal observada durante a obesidade, mas partindo do pressuposto que não são substâncias absorvidas pelo intestino, poderiam ser fonte de fermentação (Kim *et al.*, 2012).

O epitélio intestinal é responsável pela absorção dos nutrientes a partir do lúmen para a circulação sanguínea. Enterócitos são as células epiteliais intestinais que se polarizam expondo a membrana da borda em escova altamente especializada em processos de absorção, mas também capaz de atuar como uma barreira de proteção, evitando a passagem de agentes patogênicos (Danielsen e Hasen, 2010). O espaço entre as células do epitélio intestinal precisa estar bem selado, impedindo que o conteúdo luminal extravase. Também é importante que a união entre essas células suporte tensões sem se romper. Por último, já que as células de um tecido atuam de modo integrado, é importante que haja comunicação e cooperação metabólica entre elas (Alberts, 2010). A ruptura desta barreira resulta em permeabilidade epitelial desordenada, que poderia alterar a capacidade de absorção de nutrientes, permitir a absorção de toxinas e desencadear respostas relacionadas à ativação do sistema imunológico. A seletividade de permeação dessa barreira é controlada pelas chamadas junções oclusivas (*tight junctions*) que controlam a permeabilidade paracelular (Figura 2).

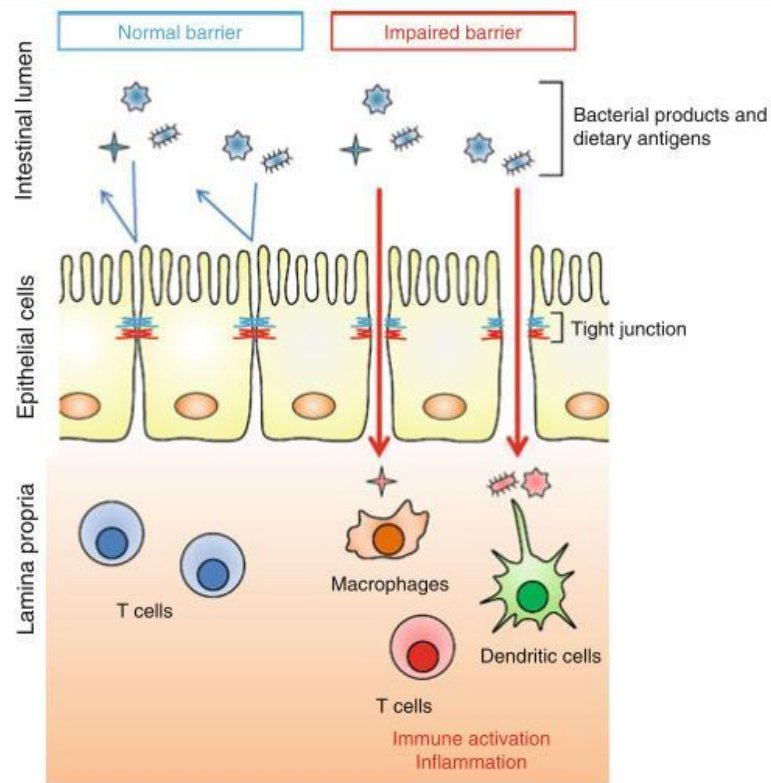


Figura 2. Função de barreira das junções oclusivas (*tight junctions*). O epitélio intestinal promove uma barreira que não permite a entrada de antígenos, bactérias e toxinas que estão no lúmen intestinal. Outros componentes formam a barreira celular em adição às junções oclusivas e regulam a passagem de íons, solutos e água pela via paracelular. Defeitos na barreira intestinal estão associados ao desencadeamento de doenças sistêmicas e intestinais (Retirado de: Suzuki, 2013).

As junções oclusivas são compostas por complexos de proteínas localizadas na terminação apical da membrana lateral das células epiteliais. Quatro famílias de proteínas transmembrana integrais - claudina, ocludina, molécula de adesão juncional (JAM) e tricelulina foram identificadas (Suzuki, 2013). Os domínios intracelulares destas proteínas interagem com proteínas do citoesqueleto e proteínas que ativam vias intracelulares de sinalização, controlando processos como a integridade da monocamada celular, polarização celular, mas também acionando diversas cascatas de

fatores de transcrição que podem controlar inclusive o ciclo celular (Cani e Delzenne, 2009).

As claudinas são as principais moléculas de adesão celular das junções oclusivas e seu principal papel é a regulação da seletividade paracelular a íons pequenos. Perturbações e disfunções dessa proteína acabam prejudicando a barreira de proteção da membrana e levando a vários processos patológicos, como o câncer (Alberts, 2010). A ocludina, primeira proteína transmembranar da junções oclusivas identificada, possui seus domínios amino- e carboxi-terminais (N- e C-terminal, respectivamente) no citoplasma, interage diretamente com o citoesqueleto de actina em células epiteliais de cólon. A ocludina pode ser fosforilada em resíduos de serina e treonina por proteína quinase C (PKC), modulando positivamente a função de barreira das junções oclusivas (Suzuki *et al.*, 2009). A JAM pertence à superfamília das imunoglobulinas e é caracterizada por dois domínios extracelulares de imunoglobulina, um domínio transmembrana e um domínio intracelular carboxi-terminal. É dividida em três subfamílias JAM-A, B e C (Suzuki, 2013). Como vimos, alterações da barreira intestinal podem representar uma porta aberta para os micróbios ou para as moléculas derivadas de bactérias a partir do lúmen intestinal (por exemplo, LPS, peptidoglicanos, e flagelina). Alguns estudos expuseram que a ruptura da barreira intestinal poderia ser a responsável pela endotoxemia metabólica presente na obesidade e diabetes tipo 2 (Everard e Cani, 2013). Deste modo, é de suma importância melhorar nossa compreensão das possíveis alterações provocadas pelo consumo de adoçantes artificiais na permeabilidade intestinal. Estas informações podem contribuir para o estabelecimento de uma ligação entre o consumo destas substâncias, alterações no padrão de absorção de nutrientes ou componentes bacterianos e de que forma isto se repercute na obesidade e alterações metabólicas atualmente.

Métodos *in vitro* têm sido considerados adequados em investigações iniciais de alguns eventos biológicos por conseguir mimetizar as características observadas *in vivo*. Estudos de permeabilidade intestinal podem ser conduzidos *in vitro* utilizando a linhagem celular Caco-2. Durante sua cultura, há formação de uma monocamada de células aderidas por junções, que quando cultivadas em membranas porosas, se diferenciam espontaneamente em enterócitos, mimetizando o epitélio do trato

gastrointestinal. Ensaio com a Caco-2 são empregados não somente em estudos de permeabilidade paracelular mas também em estudos de absorção por processos passivos (transcelular) e transportadores ativos (Balimane *et al.*, 2000). Este modelo tem auxiliado a pesquisa de moléculas que apresentem potencial terapêutico, uma vez que permite prever sua absorção *in vivo* contribuindo para triagem de moléculas previamente aos estudos pré-clínicos. Também tem sido empregado em estudos de substâncias que podem potencialmente perturbar ou melhorar a integridade da monocamada de células epiteliais intestinais (Price *et al.*, 2014).

Visto que o consumo de adoçantes artificiais pode provocar alterações intestinais, o presente estudo pretende compreender melhor o papel e o efeito de adoçantes artificiais não calóricos (sacarina, sucralose, aspartame e acesulfame K) sobre a permeabilidade intestinal utilizando células Caco-2.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar o efeito de adoçantes artificiais como indutores de alterações na permeabilidade intestinal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar *in vitro* o efeito dos adoçantes não calóricos sacarina, sucralose, aspartame e acesulfame K na integridade da monocamada celular, na permeabilidade paracelular e na expressão de proteínas de junção oclusiva em linhagem celular Caco-2.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Linhagens de células intestinais Caco-2

A linhagem celular de adenocarcinoma humano Caco-2 foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) e cultivada a 37°C em atmosfera de 95% de O₂ e 5% de CO₂, com MEM (*Minimum Essential Medium Eagle*, Sigma) suplementado com penicilina e estreptomicina (Invitrogen), 20% de soro fetal bovino (Invitrogen), 1% de aminoácidos não-essências (Sigma). Antes de atingirem 80% de confluência em frascos de cultura, foram tripsinizadas com solução de 0,25% de tripsina, 0,02% de EDTA e transferidas para insert transwell ou placas de cultura (4×10^5 cells / cm²). As células foram mantidas em placas ou “inserts” por pelo menos 15 dias antes da realização dos ensaios (Kowapradit *et al.*, 2010).

3.2 Incubação com os adoçantes

Foram utilizados os adoçantes artificiais acessulfame K, aspartame, sucralose, sacarina, na concentração de 10 mM. Para controle, a glicose e frutose também foram empregadas a mesma concentração (Zheng e Sarr, 2012).

3.3 Avaliação da integridade da monocamada celular

A integridade em monocamadas de células Caco-2 foi mensurada em tempo 0 e após 30, 60, 90, 120, 150, 180 e 210 minutos da adição dos adoçantes. O ensaio foi realizado em duplicata e a resistência elétrica transepitelial (TEER) foi medida utilizando o voltímetro Millicell-ERS (Millipore)®. Medidas de TEER também serviram de parâmetro inicial nos ensaios de permeabilidade descrito a seguir. As células foram deixadas para se diferenciarem em 15 dias após a semeadura e o ensaio foi realizado quando os valores basais de TEER apresentaram valores acima de 400 Ω.cm² (Kowapradit *et al.*, 2010).

3.4 Ensaio de permeabilidade paracelular com FITC-Dextran

Alterações de permeabilidade foram avaliadas utilizando-se 1mg/ml de FITC-Dextran adicionado no compartimento apical do sistema de “insert” após o estabelecimento da monocamada de células Caco-2, conforme descrito anteriormente. As células foram incubadas com os adoçantes na concentração de 10mM e em seguida foi coletado um volume estipulado do compartimento inferior (basolateral) do sistema “transwell” a cada 30 minutos durante 3 horas e meia. O nível de fluorescência foi avaliado em um leitor de fluorescência (excitação: 485 nm e emissão: 535 nm). Os valores foram convertidos em concentrações de FITC-Dextran (mg/mL), utilizando uma curva padrão (Zhao *et al.*, 2012).

3.5 Avaliação da citotoxicidade dos adoçantes nas células Caco-2

A toxicidade dos compostos foi verificada utilizando o teste de redução do sal de tetrazólio (MTT). As células Caco-2 foram expostas aos adoçantes (10 mM) durante 3 horas e meia em atmosfera adequada, o sobrenadante foi descartado e cada poço recebeu uma solução de MTT (5 mg/ml em tampão fosfato) por mais 3 horas e meia (Zheng e Sarr, 2012; Kowapradit *et al.*, 2010). O sobrenadante foi novamente descartado e cada poço recebeu uma solução de 10 % de sulfato de sódio dodecil (SDS) EM 0.01 M de HCl. As amostras foram incubadas por 18 h a 37 C e absorbância foi lida a 540 nm em um leitor de microplaca (Multiscan MS; Labsystems, Joensuu, Finland) (Mosmann, 1983).

3.6 Avaliação da expressão de moléculas de junção celular

A expressão proteica das moléculas de junção celular foi realizada por Western blotting em extrato obtido de culturas realizadas conforme descrito anteriormente, mas em frascos T-25. Após 15 dias, as células foram incubadas ou não com sacarina e

glicose, ambas na concentração de 10 mM por 3 horas e meia posteriormente coletadas e homogenizadas a 4° C em tampão de solubilização contendo Tris 100 mM (pH 7.4), Triton X-100 1%, NaCl 100 mM, aprotinina 0.1 mg, 35 mg PMSF/mL, Na₃VO₄ 10 mM, NaF 100 mM, Na₄P₂O₇ 10 mM e EDTA 10 mM. O material insolúvel foi removido por centrifugação durante 20 min, 9000 g a 4° C. As concentrações de proteína dos sobrenadantes foram determinadas pelo método do Biureto, seguindo as instruções do kit comercial (Bioclin, Brasil). Os sobrenadantes transferidos para tubos contendo tampão de Laemmli com DTT 100 mM e mergulhados em água fervente por 5 minutos para posterior aplicação em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e separação por eletroforese. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. A membrana de nitrocelulose foi incubada com os anticorpos de interesse *anti-claudina*, *anti-occludina*, *anti-JAM-A* (Invitrogen, Carlsbad, CA) e *anti-actina* (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) *overnight* a 4°C antes de serem reveladas com kits comerciais de quimioluminescência (GE Healthcare Bio-Sciences AB). Os valores de intensidade óptica obtidos na leitura das bandas foram corrigidos pela intensidade óptica da leitura das bandas incubadas com o anticorpo *anti-β-actina*.

3.7 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média acompanhado do respectivo erro padrão da média (EPM). Diferenças estatisticamente significante foram determinadas utilizando-se teste T pareado de *Student*. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4. RESULTADOS

4.1 Integridade da monocamada durante incubação com os adoçantes

A medida de Resistência Elétrica Transepitelial (TEER) nas células Caco-2 foi menor com a sacarina em relação aos outros grupos. Os demais adoçantes utilizados não modificaram os valores de TEER, ou seja, não foram capazes de alterar a integridade da monocamada de células.

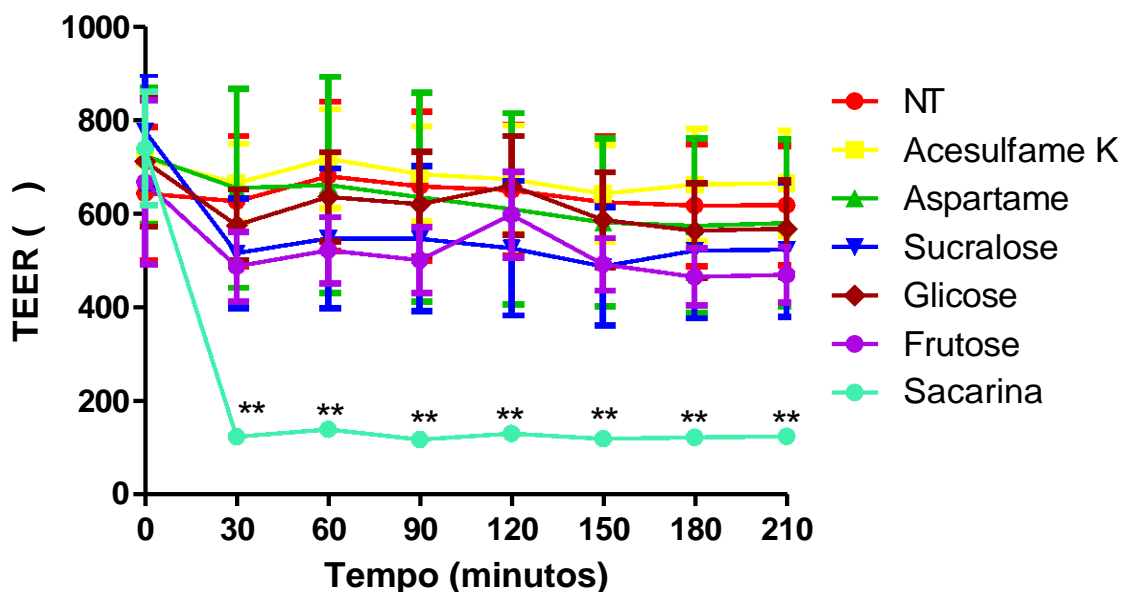


Figura 3. Medida de Resistência Elétrica Transepitelial (TEER) em monocamadas de células Caco-2 expostas ou não (NT) a diferentes adoçantes na concentração de 10 mM em tempo 0 e após 30, 60, 90, 120, 150, 180 e 210 minutos. Os resultados estão apresentados em forma de média e erro padrão da média, em ensaio realizado em duplicata (n=2). ** p< 0,01 quando comparados aos valores de NT.

4.2 Avaliação da permeabilidade paracelular

Em relação aos valores da fluorescência obtidos do compartimento inferior do dispositivo de cultura das células Caco-2 expostas ou não aos adoçantes na concentração final de 10 mM, que revelou que a sacarina foi capaz de gerar um aumento nestes valores quando comparada às células não tratadas, resultante da permeação do FITC-Dextran pela monocamada de células. Os demais adoçantes utilizados não modificaram os valores de fluorescência do meio de cultura do compartimento inferior do dispositivo de cultura, ou seja, não foram capazes de alterar a permeabilidade da monocamada de células.

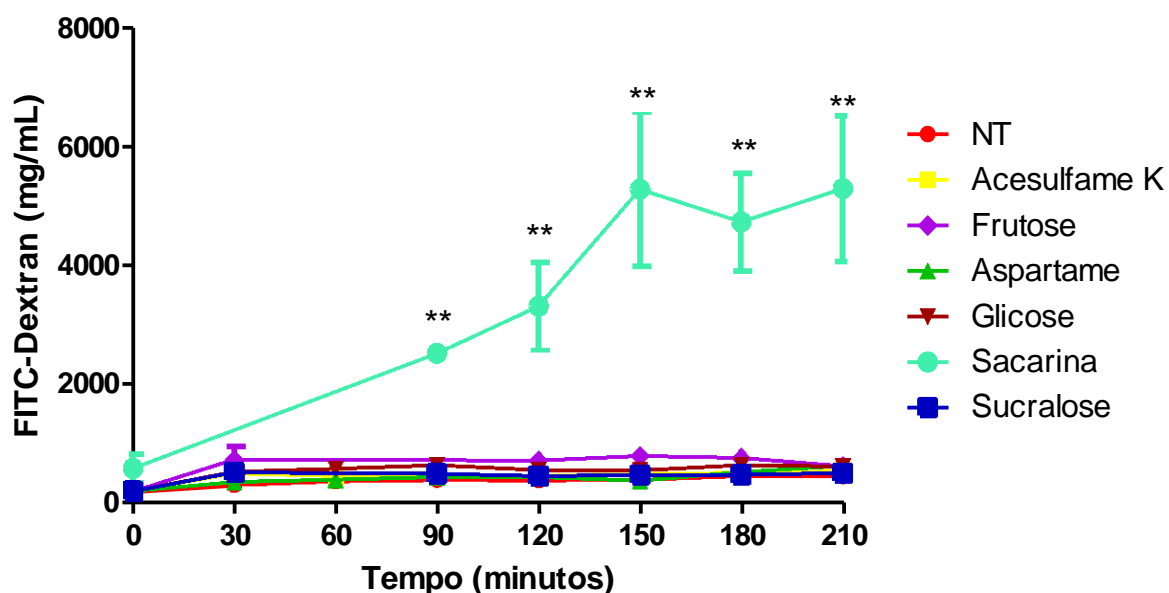


Figura 4. Quantificação de FITC-Dextran no meio de cultura do compartimento inferior do dispositivo de cultura contendo células Caco-2 expostas ou não (NT) a diferentes adoçantes na concentração de 10 mM antes (tempo 0) e após 30, 60, 90, 120, 150, 180 e 210 minutos. Os resultados estão apresentados em forma de média e EPM (n=3). **p<0,01 quando comparados aos valores de NT.

4.3 Avaliação da citotoxicidade dos adoçantes

O ensaio de citotoxicidade *in vitro* com as células Caco-2, não observamos efeitos citotóxicos dos adoçantes na concentração de 10mM no período de incubação por 3 horas e meia (Figura 5).

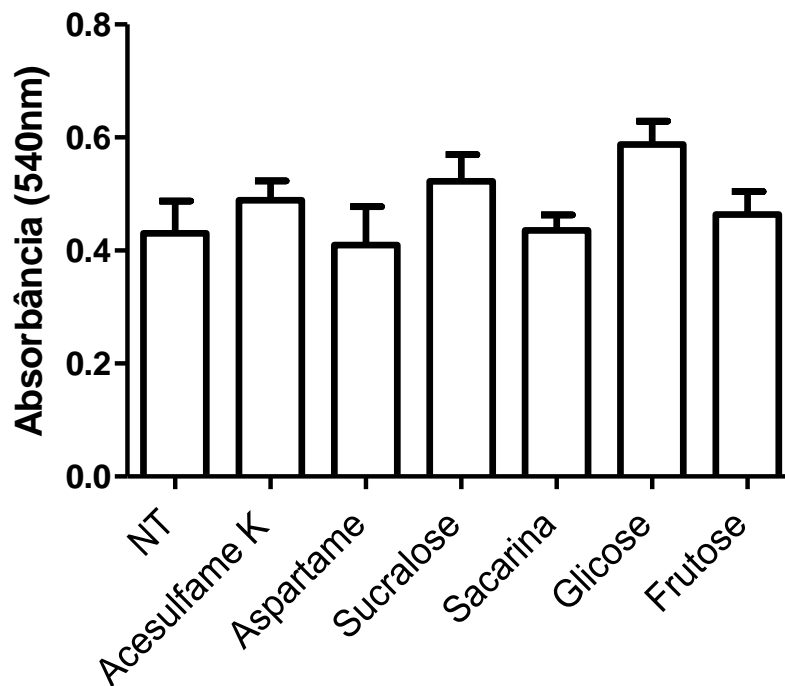


Figura 5. Níveis de citotoxicidade dos adoçantes na concentração de 10mM incubados ou não (NT) por 3 horas e meia em cultura celular de Caco-2. Os valores estão expressos na forma de média seguido do EPM (n=3).

4.4 Avaliação da expressão proteica das moléculas de junção celular

Podemos observar na Figura 6, a expressão proteica de proteínas relacionadas com a junção de oclusão celular JAM-A, Claudina e Ocludina de culturas de Caco-2 incubadas com glicose e sacarina. Não foi possível observar diferenças estatísticas entre os resultados obtidos.

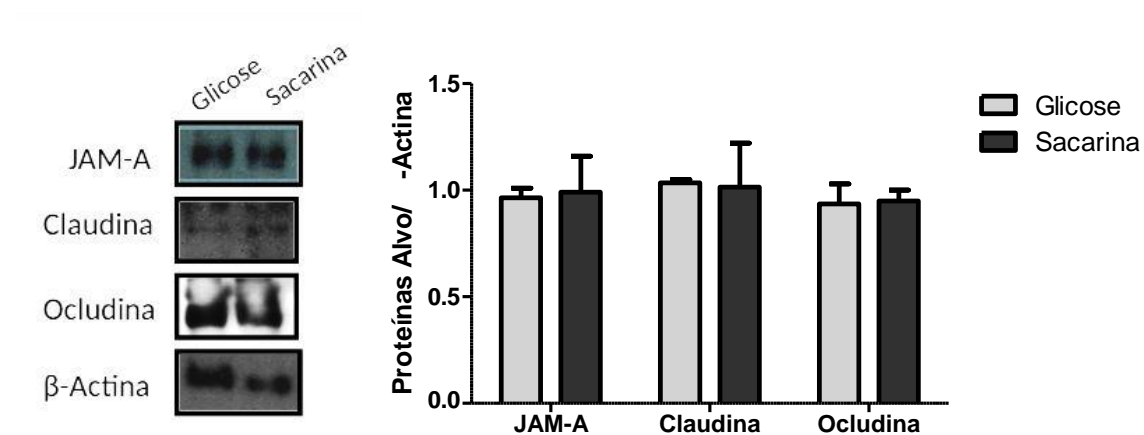


Figura 6. Expressão das proteínas de junção celular (JAM-A, Claudina e Ocludina) em culturas celulares de Caco-2 incubadas com glicose ou sacarina nas concentrações de 10 mM por 3 horas e meia. Os valores expressos em média seguido do erro padrão foram corrigidos pelos valores obtidos na expressão de β -actina.

5. DISCUSSÃO

O trato gastrointestinal é o sistema mais exposto ao mundo exterior. Diariamente, milhares de compostos derivados de alimentos e microorganismos fazem contato com este sistema e interagem de modo bidirecional podendo prejudicar suas funções, levando a mudanças que envolvem desde alterações nos processos de absorção de nutrientes até mudanças na produção de hormônios com funções de controle metabólico. Esta condição de exposição constante a agentes luminiais requer um sistema defensivo que separa este conteúdo do hospedeiro, permitindo a absorção de nutrientes, mas controlando a interação entre a flora bacteriana e o sistema imunitário mucoso, por exemplo, inibindo a translocação de agentes infecciosos. (Scaldaferri *et al.*, 2012).

Estudos recentes têm proporcionado novas evidências que sugerem que a alteração na função da barreira do epitélio intestinal está associada com a absorção de endotoxinas e desencadeamento de inflamação hepática que pode estar relacionado com as alterações dos níveis de glicose e aumento de peso corporal. A composição da microbiota intestinal também se altera na obesidade, com mudanças na sua diversidade, nos níveis de filos, gênero ou espécie, o que reforça a ideia de que a manutenção da barreira intestinal seja uma etapa importante de controle destas alterações (Raybould, 2012).

O epitélio intestinal é organizado em monocamada de células, com uma espessura de apenas 20 mm, agregando cinco diferentes tipos de células, incluindo os enterócitos, as células endócrinas, M, G e de *Paneth*. Enterócitos são os mais abundantes e agem como uma barreira física que inibe a translocação do conteúdo luminal para os tecidos internos formando uma estrutura singular, pois eles são ligados por junções oclusivas caracterizadas por proteínas transmembranas que interagem com as células adjacentes e com proteínas adaptadoras intracelulares, que estão ligadas ao citoesqueleto. Todos juntos formam uma rede de conexão. Alterações dessas junções aumentam a permeabilidade da mucosa, causando a passagem luminal de moléculas, o que pode ativar uma resposta inflamatória (Scaldaferri *et al.*, 2012).

Como mostrado em nossos resultados, a incubação de células Caco-2 com diferentes adoçantes evidenciou que a sacarina foi capaz de causar alterações na integridade e no padrão absorptivo da monocamada celular, sugerindo que este adoçante artificial não calórico possa, *in vivo*, também alterar a barreira intestinal. Os demais adoçantes empregados neste estudo, aspartame, acessulfame k, sucralose, glicose e frutose, na mesma concentração não promoveram esta resposta. Um trabalho recentemente publicado avaliou a ação de cinco adoçantes artificiais, o ciclamato, a sacarina, a sucralose, o acessulfame K e o aspartame (0-50 mM) em três linhagens celulares, incluindo a Caco-2, objetivando avaliar os efeitos sobre a morfologia, viabilidade e estabilidade do DNA nas células. As linhagens celulares HT-29 e a Caco-2 foram as mais vulneráveis à ação dos adoçantes, sendo que concentrações superiores a 10 mM dos adoçantes foram capazes de reduzir a viabilidade celular (verificada também pelo ensaio de MTT) após tempos de 48 e 72 horas de incubação. Adicionalmente, a sucralose e a sacarina foram capazes de induzir um aumento das quebras de DNA nas linhagens de células intestinais, avaliado pelo ensaio do Cometa (Van, 2014). Os tempos de incubação e doses utilizados neste trabalho publicado foram maiores do que empregamos em nosso trabalho, o que pode explicar a ausência de efeito citotóxico observado com a Caco-2.

Não há trabalhos prévios na literatura utilizando os adoçantes artificiais e avaliações de permeabilidade e integridade de monocamada celular de Caco-2. Deste modo, continuamos a nossa avaliação verificando se as proteínas de junção oclusivas estariam sendo inibidas pela sacarina. Pudemos verificar que não há inibição da expressão proteica de JAM-A, claudina e ocludina nas células incubadas com a sacarina quando comparado a células incubadas com glicose. Um trabalho realizado utilizando células Caco-2 e antígenos alimentares onde o objetivo foi investigar mecanismos absorptivos registrou uma perturbação na integridade da monocamada das células Caco-2, verificada pela queda dos valores de TEER e passagem do antígeno. A avaliação da expressão de proteínas de junções oclusivas constatou que também não havia inibição da expressão total destas e sim alterações conformacionais, ou seja, a co-localização das proteínas de junção oclusivas ocludina, claudina e JAM-A em

relação a proteína de adesão intracelular ZO-1 tinha sido alterada nas células Caco-2 expostas aos antígenos alimentares (Prince *et al.*,2014).

Como a exposição das células Caco-2 a sacarina resultou em perturbação da monocamada e aumento da permeabilidade ao FITC-Dextran, sem indícios de toxicidade ou inibição da expressão das proteínas de junções oclusivas, nossa hipótese é que possam estar ocorrendo alterações conformacionais nestas proteínas de junção, o que aumentaria a passagem de macromoléculas por via paracelular. Considerando que o ensaio *in vitro* utilizando monocamadas de células intestinais Caco-2 é preliminar, estudos adicionais serão necessários para confirmar se a sacarina também promove alterações no epitélio absorptivo *in vivo*.

6. CONCLUSÃO

A sacarina foi capaz de alterar a integridade da monocamada de células epiteliais intestinais Caco-2 *in vitro*. Os demais adoçantes utilizados neste estudo, a sucralose, o aspartame, o acesulfame K, a glicose e a frutose não promoveram nenhuma alteração.

A sacarina também aumentou a permeabilidade paracelular na monocamada de maneira independente de um efeito citotóxico e da inibição da expressão proteica de JAM-A, claudina e ocludina.

Nossa sugestão é que alterações conformacionais destas proteínas de junção oclusiva sejam responsáveis pelos efeitos observados. Como se trata de um estudo inicial *in vitro* é prudente sugerir uma investigação nesta área, para verificar se o consumo de sacarina pode realmente modificar a capacidade de permeação de nutrientes ou toxinas pelo epitélio intestinal *in vivo*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abou-Donia, M.B.; El-Masry, E.M.; Abdel-Rahman, A.A.; McLendon, R.E.; Schiffman, S.S. Splenda alters gut microflora and increases intestinal p-glycoprotein and cytochrome p-450 in male rats. **Journal Toxicology and Environmental Health**, 71(21): 1415-1429, 2008.

Alberts, B. Cell Biology: The Endless Frontier. **Molecular Biology of the Cell**. Vol. 21, 3785. University of California, San Francisco, 2010.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº. 18, de 24 de março de 2010. Regulamento Técnico que autoriza o uso de aditivos edulcorantes em alimentos, com seus respectivos limites máximos. Diário Oficial da União, 2010.

Annalisa, N.; Alessio, T.; Claudette, T.D.; Erald, V.; Antonino de, L.; Nicola, D.D. Gut microbioma population: an indicator really sensible to any change in age, diet, metabolic syndrome, and life-style. **Mediators of Inflammation**, 2014.

Anton, S.D.; Martin, C.K.; Han, H.; Coulon, S.; Cefalu, W.T.; Geiselman, P.; Williamson, D.A. Effects of stevia, aspartame, and sucrose on food intake, satiety, and postprandial glucose and insulin levels. **Institutes Health of National**. 55(1): 37–43, 2010.

American Dietetic Association. Position of the American Dietetic Association: Use of Nutritive and Nonnutritive Sweeteners. **Journal of the American Dietetic Association**. 104 (2): 255-275, 2010.

Balimane, P.V.; Chong, S.; Morrison, R.A. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, 2000.

Brown, S. D.; Payne, A.G. Immediately restored single implants in the aesthetic zone of the maxilla using a novel design: 1-year report. **Clinical Oral Implants Research** 22(4): 445-454, 2011.

Brown, R.J.; Walter, M.; Rother, K.I. Effects of diet soda on gut hormones in youths with diabetes. **Diabetes Care**, 35(5): p. 959-964, 2012.

Cani, P.D.; Delzenne, N.M. The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. **Current Pharmaceutical Design**, 15: 1546-1558, 2009.

Danielsen, E.M.; Hansen, G. H. Lipid raft organization and function in the small intestinal brush border. **Journal Physiology Biochemistry**, 64 (4): 377-382, 2010.

de Koning, L.; Malik, V. S.; Rimm, E. B. Sugar-sweetened and artificially sweetened beverage consumption and risk of type 2 diabetes in men. The **American Journal Clinical Nutrition** 93(6): 1321-1327, 2011.

Everard, A.; Cani, P.D. Diabetes, obesity and gut microbiota. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, 27 (20) : 73–83, 2013.

Ferder, L. The role of high-fructose corn syrup in metabolic syndrome and hypertension. **Current Hypertension Report** 12(2): 105-112, 2010.

IBGE. Análise da Disponibilidade Domiciliar de Alimentos e Estado Nutricional no Brasil. 2010. [Acessado em: 14 nov. 2014]. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_aval_nutricional/default.shtm.

Kim, K.A.; Gu, W; Lee, I.A.; Joh, E.H.; Kim, D. High fat diet-induced gut microbiota exacerbates inflammation and obesity in mice via the TLR4 signaling pathway. **PLoS One**, 7(10): e47713, 2012.

Kowapradit, J.; Opanasopit, P.; Ngawhirunpat, T.; Apirakaramwong, A.; Rojanarata, T.; Ruktanonchai, U.; Sajomsang, W. In vitro Permeability Enhancement in Intestinal Epithelial Cells (Caco-2) Monolayer of Water Soluble Quaternary Ammonium Chitosan Derivatives. **AAPS PharmSciTech**, 11 (2), 2010.

Ma, J.; Chang, J. ; Checklin, H.L.; Young, R.L.; Jones, K.L.; Horowitz, M.; Rayner, C.K. Effect of the artificial sweetener, sucralose, on small intestinal glucose absorption in healthy human subjects. **British Journal of Nutrition**, 104(6): 803-806, 2010.

Moran, T.H.; Dailey, M.J. Intestinal feedback signaling and satiety. **Physiology & Behavior**, 105(1): 77-81, 2011.

Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, 65 (19) 55-63, 1983.

Mozaffarian, D.; Hao, T.; Rimm, E.B. Changes in diet and lifestyle and long-term weight gain in women and men. **The New England Journal of Medicine** 364 (25): 2392-2404, 2011.

Payne, C.M.; Baban, J.; Horn, S.J. Hallmarks of processivity in glycoside hydrolases from crystallographic and computational studies of the *Serratia marcescens* chitinases. **The Journal Biological Chemistry** 287(43): 36322-36330, 2012.

Pepino, M.Y. Sucralose affects glycemic and hormonal responses to an oral glucose load. **Diabetes Care**, 2013.

Pereira, M.A. Diet beverages and the risk of obesity, diabetes, and cardiovascular disease: a review of the evidence. **Nutr Rev**, 71(7): 433-440, 2013.

Polyak, E. Effects of artificial sweeteners on body weight, food and drink intake. **Acta Physiol Hung**, 97(4): 401-407, 2010.

Price, B.D.; Ackland, M.L.; Burks, W.; Knightd, M.I. Peanut allergens alter intestinal barrier permeability and tight junction localisation in Caco-2 cell cultures. **Cell Physiol Biochem**, 33(6):1758-77, 2014.

Raybould, H,E. Gut microbiota, epithelial function and derangements in obesity. **Physiology and Cell Biology**, 2012.

Rodero, B,A.; Batigália, F.; Azoubel, R.; Moura, A,S.; Rodero, S,L.; Júnior, S,L. Effects of sucralose ingestion on fetal and placental weights and umbilical-cord length: experimental study. **Jornal Internacional de Morfologia**, 28 (3): 823-827, 2010.

Scaldaferri, F.; Pizzoferrato, M.; Gerardi, V.; Lopetuso, I.; Gasbarrini. The gut barrier new acquisitions and therapeutic approaches. **Journal of Physiology**, 2012.

Sclafani, A.; Bahrani, M.; Zukerman, S.; Ackroff, K. Stevia and saccharin preferences in rats and mice. **Chemical Sense**, 35(5):433-43, 2010.

Scheurer, M.; Schmutz, B.; Happel,O.; Brauch, HJ.; Wülser, R.; Storck, F.R.; Transformation of the artificial sweetener acesulfame by UV light, **Science of the Total Environment**, p. 425–432, 2014.

Spruss, A.; Kanuri, G.; Stahl, C.; Bischoff, S.C.; Bergheim, I. Metformin protects against the development of fructose-induced steatosis in mice: role of the intestinal barrier function. **Lab Invest**, 92(7): 1020-1032, 2012.

Suzuki, T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. **Cellular and Molecular life Science**. 70:631–659, 2013.

Suzuki,T.; Elias, B.C.; Seth, A.; Shen, L.; Turner, J.R.; Dominic, D.; Guntaka, R.; Radhakrishna, R. PKC η regulates occludin phosphorylation and epithelial tight junction integrity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Vol.109, 61-66, 2009.

Swithers, S.; Faboy, A. F.; Clark, K.; Cooper, S.; Davidson, T.L. Experience with the high-intensity sweetener saccharin impairs glucose homeostasis and GLP-1 release in rats. Department of Psychological Sciences, Purdue University, West Lafayette, IN, United States. **Behavioural Brain Research**, 1– 14, 2012.

VAN, E. A. The effect of five artificial sweeteners on Caco-2, HT-29 and HEK-293 cells. **Drug Chemical Toxicol**, 2014.

Yoshida, T.; Kano, M.; Watanabe, M.; Yoshioka, M. The interaction between serotonergic and cannabinoidergic modulations involved in the fear extinction. **Japanese journal of psychopharmacology**, 33(3): 95-9, 2013.

Zanini, Rde. V.; Araújo, C.L.; Martínez-Mesa, J. Use of diet sweeteners by adults in Pelotas, Rio Grande do Sul State, Brazil: a population-based study. **Cad Saude Publica**, 27(5): 924-934, 2011.

Zhao, H.; Zhang, H.; Wu, H.; Li, H.; Liu, L.; Guo,J.; Li, C.; Shih, D.Q.; Zhang, X. Protective role of 1,25(OH)₂vitamin D₃ in the mucosal injury and epithelial barrier disruption in DSS-induced acute colitis in mice. **BMC Gastroenterology**, 12:57, 2012.

Zheng,Y.; Sarr, M.G. Effect of the artificial sweetener, acesulfame potassium, a sweet taste receptor agonist, on glucose uptake in small intestinal cell lines. **J Gastrointest Surg**. 17(1): 153-158, 2013.